

## Ocena przydatności testów kolorymetrycznych MTT i XTT do badań prowadzonych *in vitro* na tachyzoitach *Toxoplasma gondii*<sup>1</sup>

### The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted *in vitro* with *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Katarzyna Dzitko, Dominika Dudzińska, Marcin Grzybowski, Henryka Długońska

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Autor do korespondencji: Katarzyna Dzitko; E-mail: dzika@biol.uni.lodz.pl

**ABSTRACT.** Tetrazolium salts are widely used as indicators of metabolic activity for both eukaryotic and prokaryotic cells. Live cells reduce the tetrazole ring in MTT or XTT salts and then a colored formazane formed can be assessed spectrophotometrically. Despite widespread use of MTT/XTT reduction tests biochemical mechanisms of the reaction are still unknown, and each test application case requires standardization of experimental conditions. In the present study we tested *in vitro* the utility of both MTT and XTT salts to determine the influence of selected extracellular agents for *T. gondii* tachyzoites and their host cells (i.e. mouse L929 fibroblasts). The results showed that MTT is reduced more intensively than XTT by host and parasite cells. The attenuation of *T. gondii* tachyzoites resulted in a decrease of reduction level of both tetrazolium salts, particularly of XTT. Using MTT we found also that *T. gondii* is not susceptible to extremely toxic substance, sodium azide. Our results confirmed a high usefulness of MTT reduction tests in numerous studies on eukaryotic cells.

**Key words:** tetrazolium salts: MTT and XTT, reduction, host cells, *T. gondii*

#### Wprowadzenie

Liczne badania laboratoryjne o charakterze podstawowym i klinicznym wymagają określenia aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek eukariotycznych, które są wskaźnikiem działania na te komórki czynników wzrostowych, komponentów podłoża odżywczych, antygenów (lub mitogenów), czy czynników cytotoksycznych, w tym leków. Poszukiwanie czułych ilościowych metod doprowadziło do opracowania testów, opierających się na wbudowywaniu do puli DNA <sup>3</sup>[H]-tymidyny lub 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU). Niedogodnością tych oznaczeń jest konieczność użycia materia-

łów radioaktywnych i kosztownej aparatury oraz skomplikowana i długotrwała procedura. Poszukiwanie prostszych technik zaowocowało opracowaniem metod kolorymetrycznych opartych na obserwacji, że sole tetrazoliowe jako akceptory elektronów są przekształcane przez żywe komórki do kolorowych związków formazanowych. W 1986 roku zastosowano po raz pierwszy sól MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazolowy), która jako związek o ładunku dodatnim z łatwością wnika do komórki i jest tam redukowana do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu [1]. Niedogodność związaną z koniecznością rozpuszczenia kryształów formazanu w rozpuszczalnikach

<sup>1</sup> Artykuł powstał podczas realizacji problemu badawczego MNiSW nr N N401 2323 34 i został z niego dofinansowany

organicznych usunięto w dwa lata później przez zastąpienie MTT inną solą – XTT (sól sodowa 2,3-bis [2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu), która ulega przekształceniu w produkt rozpuszczalny w środowisku wodnym [2]. XTT oraz inne sole tetrazoliowe drugiej generacji, ze względu na ujemny ładunek, słabo penetrują do wnętrza komórek. Proces redukcji zachodzi więc głównie na powierzchni komórki lub w błonie plazmatycznej z udziałem przezbłonowego łańcucha transportu elektronów [3]. Testy oparte na redukcji MTT i XTT są coraz częściej używane w praktyce laboratoryjnej [3], m.in. do określania wrażliwości drobnoustrojów na leki [4], mierzenia żywotności [5,6], czy intensywności proliferacji komórek eukariotycznych w odpowiedzi na cytokiny [7]. Ich zastosowanie do określonego zadania badawczego powinno być poprzedzone badaniem wstępnym, mającym na celu optymalizację warunków eksperymentu.

Celem podjętych badań było sprawdzenie, czy testy MTT i /lub XTT mogą być użyte do określania wpływu różnych czynników zewnętrznych na żywotność pozakomórkowych tachyzoitów *Toxoplasma gondii* oraz do oceny proliferacji komórek żywicielskich, w warunkach *in vitro*.

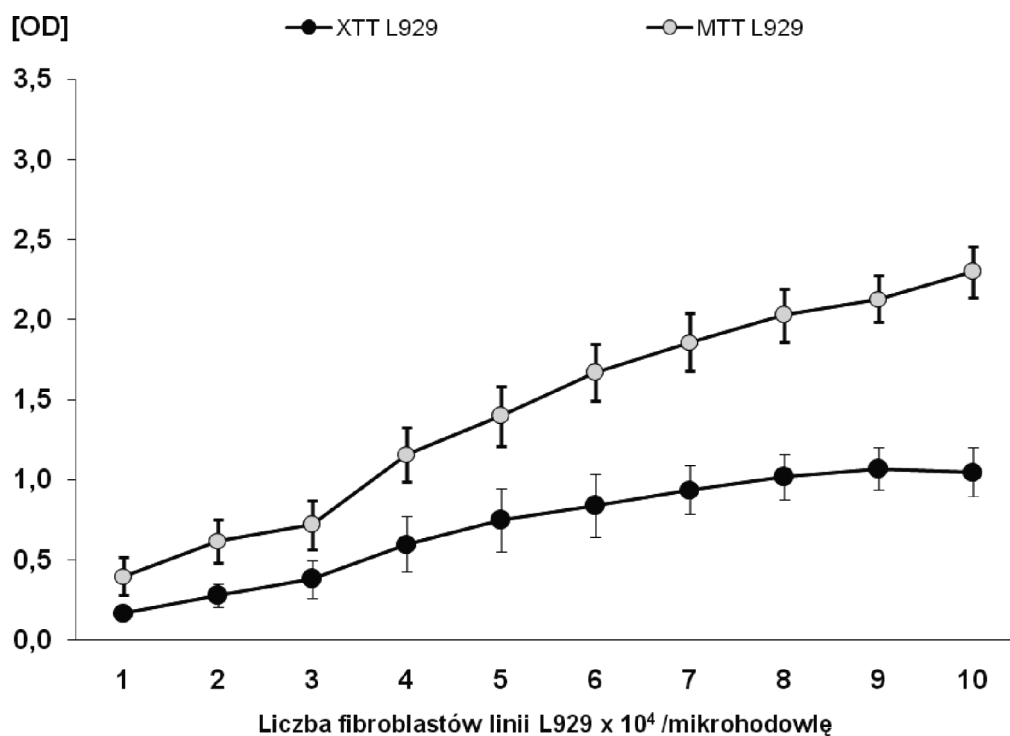
## Material i metody

Fibroblasty mysie linii L929 (ATTC<sup>®</sup>, katalog No. CCL-1), powszechnie używane w laboratoriach do namnażania *Toxoplasma gondii*, hodowano *in vitro* w podłożu IMDEM z dodatkiem 5–10% FCS (Fetal Calf Serum), 2 mM L-glutaminy, 50 μM 2-merkaptioetanolu, 100 mg/L streptomycyny i 100 kU/L penicyliny (do testu MTT) lub w podłożu RPMI 1640 z dodatkami jw., ale bez czerwieni fenolowej jako wskaźnika pH płynu (do testu XTT).

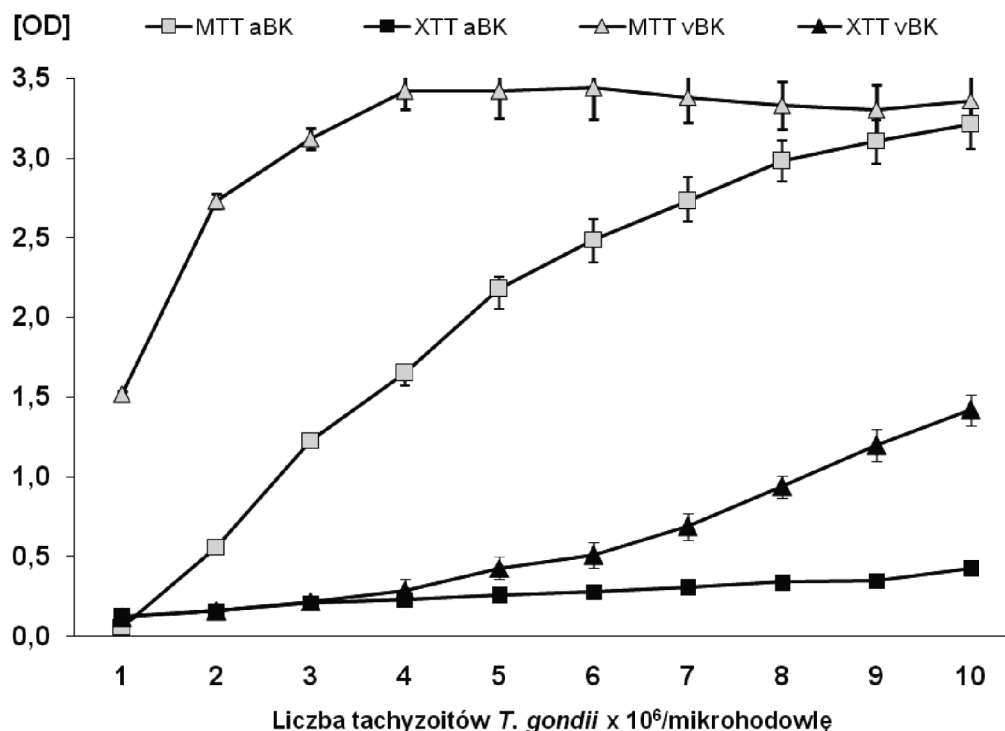
Tachyzoity *Toxoplasma gondii* szczepu BK (genotyp I) z kolekcji własnej. W badaniach użyto dwóch wariantów fenotypowych tego szczepu: 1/ wariantu o wysokiej zjadliwości, (vBK), LD100 dla myszy BALB/c i C57BL/6 – 10 tachyzoitów, namnażano go do badań w myszach laboratoryjnych; 2/ wariantu atenuowanego (aBK) otrzymanego przez długotrwałą (kilkanaście lat) propagację wyłącznie w hodowlach fibroblastów mysich L929, LD100 dla ww. myszy – 10 000 tachyzoitów, namnażano go do opisanych poniżej eksperymentów w takich samych komórkach żywicielskich.

Sole tetrazoliowe: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), SIGMA oraz zestaw TOX-2 (SIGMA) złożony z XTT

Rys. 1a



Rys. 1b



Rys. 1. Intensywność redukcji soli tetrazoliowych MTT i XTT w zależności od liczby komórek/studzienkę: 1a. fibroblasty L929; 1b. tachyzoity dwóch wariantów szczepu BK *T. gondii*: aBK i vBK.

Fig.1. Intensity of MTT and XTT tetrazolium salts reduction dependent on the cell number/well: 1a. L929 fibroblasts; 1b. tachyzoites of two *T. gondii* BK strain variants: aBK and vBK.

(2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt) + 1% PMS (phenazine methosulfate). Oznaczenia z użyciem XTT wykonano wg instrukcji producenta (SIGMA), a z MTT wg metody Mosmanna zmodyfikowanej przez Loosdrechta i wsp. [8], stosując 4-godzinny okres inkubacji badanych komórek z obiema solami.

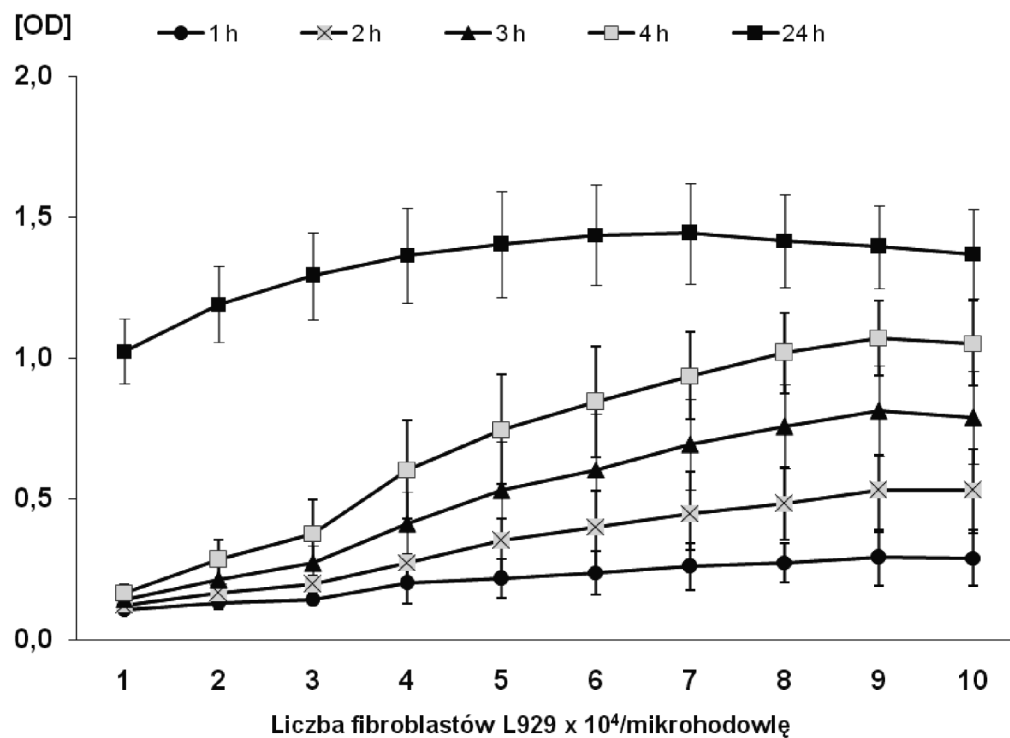
W podjętych w tej pracy badaniach postanowiono porównać intensywność redukcji MTT i XTT, zależnie od liczebności komórek w próbie ( $1-10 \times 10^6$  tachyzoitów *T. gondii* i od  $1-10 \times 10^4$  fibroblastów mysich) oraz czasu inkubacji (1–24 h), a następnie sprawdzić, przy zastosowaniu wyznaczonych doświadczalnie optymalnych warunków przeprowadzenia testu, jak wybrane czynniki egzogenne wpływają na żywotność badanych komórek. Wybór tych czynników wynikał bezpośrednio z prowadzonych przez nas badań nad rolą hormonów w odporności przeciw *T. gondii*. Dane przedstawione na rysunkach stanowią średnie z 3–6 eksperymentów, z których każdy obejmował 4 powtórzenia.

## Wyniki i podsumowanie

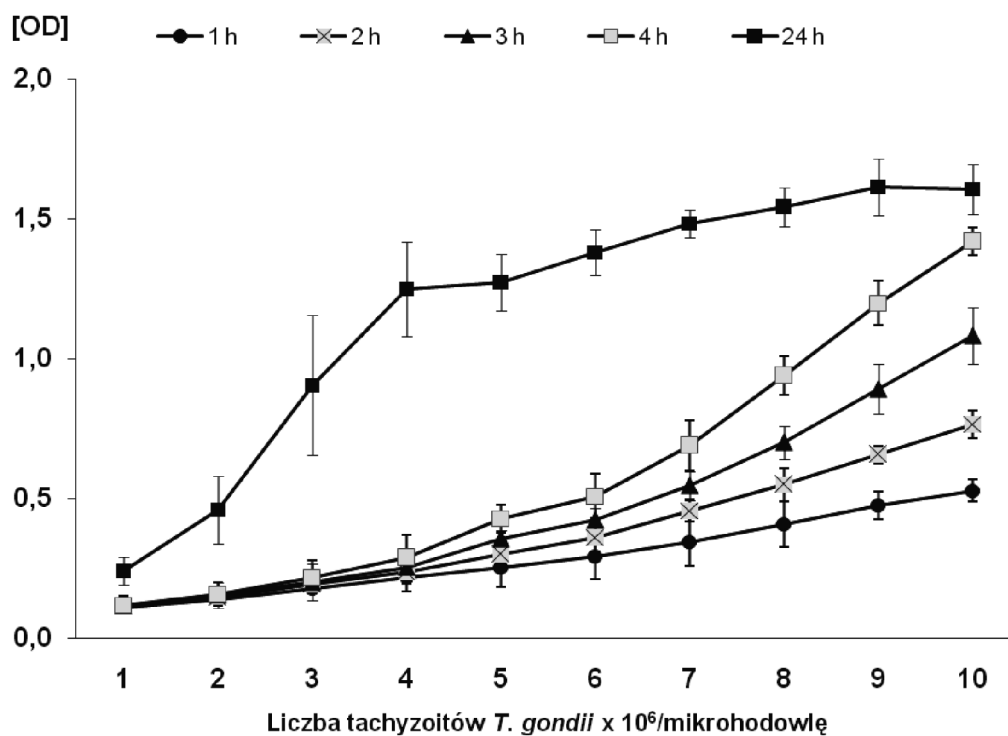
W I etapie porównano intensywność redukcji obu soli tetrazoliowych przez fibroblasty L929 oraz dwa warianty fenotypowe tachyzoitów *T. gondii* (aBK i vBK), stosując standardowy czas inkubacji z MTT i XTT tj. 4 godziny oraz różnie liczbowo inokulum. W każdym przypadku, sól MTT była metabolizowana intensywniej (Rys. 1a, b). Szczególnie wyraźnie było to widoczne u tachyzoitów, a zwłaszcza wariantu atenuowanego, który bardzo słabo przekształcał XTT (Rys. 1b).

Stopień redukcji MTT przez fibroblasty wzrastał wprost proporcjonalnie do liczebności inokulum, osiągając wartości absorbancji (OD) ok. 1,5 w przedziale  $5-6 \times 10^4$  komórek/studzienkę. Takie inokulum wydaje się optymalne, ponieważ umożliwia testowanie działania różnych czynników zewnętrznych na te komórki, od ich stymulacji (wzrost absorbancji) do inhibicji (spadek absorbancji). W przypadku pierwotniaków, wartość optymalna absorbancji była osiągnięta przy inokulum ok.  $3,5 \times 10^6$  tachyzoitów/studzienkę dla wariantu atenu-

Rys. 2a



Rys. 2b



Rys. 2. Intensywność redukcji soli tetrazoliowej XTT przez fibroblasty L929 (2a) i tachyzoity *T. gondii* vBK (2b) w zależności od czasu inkubacji

Fig. 2. Intensity of XTT tetrazolium salt reduction by L929 fibroblasts (2a) and *T. gondii* vBK tachyzoites (2b) dependent on the incubation time

owanego i tylko  $1 \times 10^6$ /studzienkę dla wariantu zjadliwego (Rys. 1a, b).

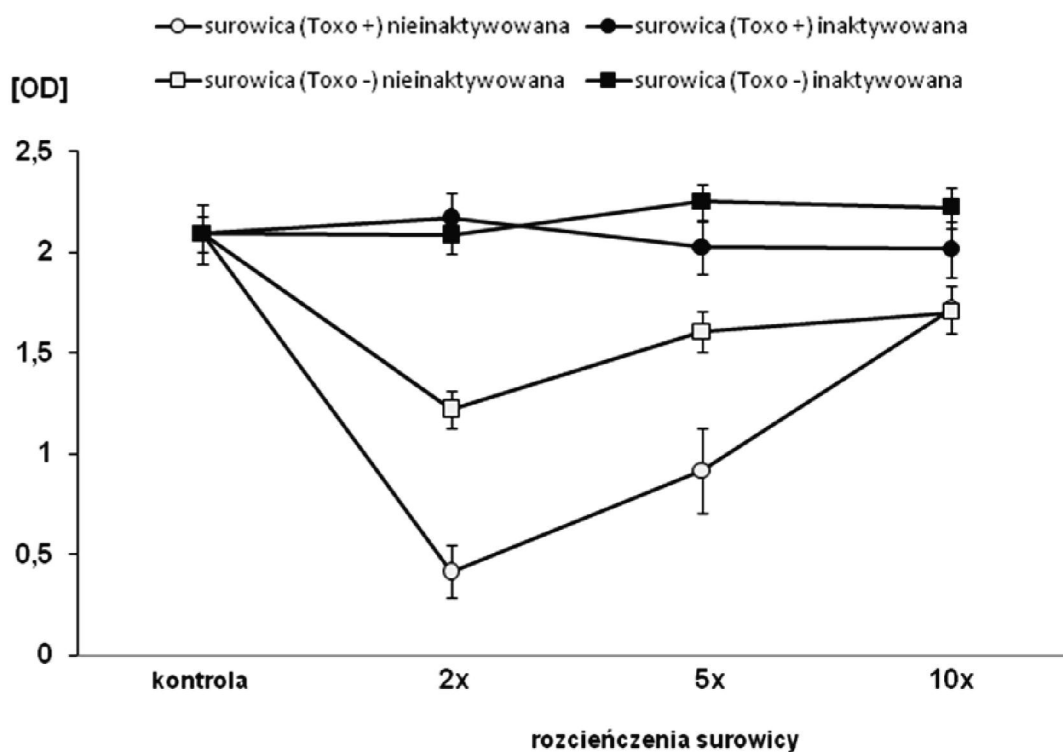
Biorąc pod uwagę znacząco niskie wartości absorbancji w przypadku użycia do badania soli XTT, postanowiono zbadać, jak zmiana czasu inkubacji (1, 2, 3, 4 i 24 godziny) wpływa na intensywność redukcji tego związku. W każdym punkcie czasowym (Rys. 2) wartość absorbancji była wprost proporcjonalna do liczby komórek w mikrohodowli. Przedłużenie czasu inkubacji aż do 24 h spowodowało, że osiągnięto pożądaną optymalną wartość absorbancji tj. zbliżoną do 1,5 zarówno dla komórek żywicielskich L929 (w szerokim zakresie inokulum  $5\text{--}10 \times 10^4$ /studzienkę, Rys. 2a), jak i tachyzoitów wariantu vBK (przy  $8\text{--}10 \times 10^6$ /studzienkę, Rys. 2b).

Na podstawie otrzymanych wyników zdecydowano użyć w dalszych badaniach sól MTT, prowadzić 4-godzinną inkubację oraz stosować inokulum  $5 \times 10^4$  komórek L929/studzienkę i  $4 \times 10^6$  komórek *T. gondii* aBK/studzienkę.

Uwzględniając wymienione powyżej parametry oraz cele cząstkowe badań własnych nad odpornością w toksoplazmozie sprawdzono przydatność testu MTT do oceny wpływu ludzkiej surowicy

i ludzkiej prolaktyny oraz azydku sodowego jako znanego inhibitora łańcucha oddechowego (próba kontrolna) na mysie fibroblasty L929 oraz tachyzoity *T. gondii*, po 3-godzinnej ekspozycji na dany czynnik.

Świeża surowica ludzka zawierająca przeciwciała anty-*T. gondii* (Toxo+) wykazała silne działanie bójcze w stosunku do tachyzoitów *T. gondii*, a jej inaktywacja cieplna ( $56^\circ\text{C}$  20 min), prowadząca do zniszczenia m.in. dopełniacza, znacznie to działanie osłabiła. Surowica niezawierająca swoistych przeciwciał (Toxo-) miała słabsze działanie cytotoksyczne. Uległo ono całkowitemu wygaszeniu po inaktywacji (Rys. 3). Prolaktyna ludzka, w stężeniu 2–100 ng/ml (norma w surowicy ludzkiej do 20 ng/ml), nie wpływała ani hamująco ani stymulująco na fibroblasty L929, ani też nie działała cytotoksycznie na komórki tachyzoitów *T. gondii* (dane liczbowe nieprezentowane w pracy). Pewnym zaskoczeniem natomiast były wyniki uzyskane z azydkiem sodowym. Został on zaliczony do substancji bardzo toksycznych i niebezpiecznych dla środowiska (ustawa z dnia 11 stycznia 2001 r. o substancjach i preparatach chemicznych, Dz. U. nr



Rys. 3. Wpływ surowic ludzkich na aktywność metaboliczną tachyzoitów *T. gondii* aBK, określaną w teście redukcji MTT

Fig. 3. Influence of human sera on the metabolic activity of *T. gondii* aBK tachyzoites determined in MTT reduction test



11, poz. 84, z późniejszymi zmianami). Ze względu na bardzo dużą toksyczność wobec mikroorganizmów, azydek sodowy (w stężeniu rzędu 0,02–0,1%) wykorzystywany jest powszechnie w praktyce laboratoryjnej do zabezpieczania roztworów buforowych i innych odczynników (np. preparatów przeciwciał) przed rozwojem pleśni i bakterii. Tymczasem w ww. zakresie stężeń okazał się on zupełnie nietoksyczny w stosunku do tachyzoitów *T. gondii* (dane liczbowe niezamieszczone w pracy), podobnie jak zaobserwowano to wcześniej u innych pierwotniaków, w tym *Cryptosporidium* i *Eimeria* [9] oraz *Trypanosoma mega* [10].

Wyniki opisanych w pracy doświadczeń wskazują, że test MTT wykonany w wystandaryzowanych doświadczalnie warunkach może być z powodzeniem używany w badaniach mających na celu określenie wpływu różnych czynników egzogenych na tachyzoity *T. gondii* oraz komórki żywicielskie L929, często używane do namnażania *in vitro* tego pasożytniczego pierwotniaka. Niewątpliwe zalety testu MTT to przede wszystkim użycie bezpiecznych odczynników, prostota i powtarzalność oraz stosunkowo krótki czas trwania oznaczeń. Konieczność solubilizacji produktu redukcji MTT jest tylko niewielką niedogodnością.

Prezentowane w literaturze porównanie testów z użyciem soli tetrazoliowych pierwszej i drugiej generacji przyniosło dość zróżnicowane wyniki, zależnie od rodzaju komórek i sposobu przeprowadzania oznaczeń. Na przykład Wang i wsp. [11] stwierdzili wyższą przydatność testu XTT i MTS, w porównaniu z MTT, do oznaczania gęstości, żywotności i proliferacji szczurzych hepatocytów. Mimo dość silnej redukcji MTT, jej intensywność słabo korelowała z liczbą komórek i ich żywotnością, oznaczanymi metodą izotopową i z użyciem błękitu trypanu, ale co znamienne, współczynnik korelacji znacząco wzrastał przy użyciu zawiesin komórkowych o niskiej gęstości. Z kolei Taybali i Seligy [12] zaobserwowali, że w ocenie efektu cytotoksycznego insektycydów lepiej sprawdzał się test MTT niż XTT, natomiast Stevens i Olsen [13] uznali testy MTT i XTT jako równocenne przy określaniu aktywności bakteriobójczej neutrofilów bydłych. Chociaż ocena wartości testu XTT jest z reguły wysoka, to w badaniach prowadzonych na komórkach drożdżowych wskazano na pewne jego ograniczenia, wynikające nie tylko ze zróżnicowania gatunkowego i szczepowego drożdży, ale również z niepełnej rozpuszczalności w wodzie produktu redukcji XTT i niekiedy braku liniowej zależno-

ści pomiędzy wartością OD a liczbą komórek w próbce [14]. Zwrócono także uwagę, że komponenty podłoża mogą interferować z procesem redukcji XTT [15].

Obserwowane różnice w intensywności i kinetyce redukcji różnych soli tetrazoliowych mogą wynikać zarówno z odmienności ich natury, jak i odmienności łańcucha transportu elektronów w różnych komórkach. Właściwości fizykochemiczne soli tetrazoliowych determinują zróżnicowaną lokalizację procesu ich redukcji (mitochondria, cytosol, błona zewnętrzna) oraz zróżnicowany udział komórkowych reduktantów w przekształcaniu tych związków. Jak wykazano, redukcja MTT zachodzi głównie przy udziale enzymów siateczki śródplazmatycznej, zależnych od NADH oraz NADPH i niewrażliwych na inhibitory oddechowe, w tym na azydki [15,16]. Przekształcanie XTT jest procesem bardziej złożonym, związanym fizycznie przede wszystkim z błoną plazmatyczną [3,15].

Metabolizm energetyczny i łańcuch transportu elektronów u licznych pierwotniaków odbiegają często od klasycznych schematów opisanych dla komórek ssaków i dodatkowo są zależne od stadium rozwojowego pasożyta, co wykazano dobitnie m.in. u tachyzoitów i bradyzoitów *Toxoplasma gondii* [17]. U niektórych pierwotniaków, podobnie jak roślin i grzybów, opisano alternatywne oksydazy (AOXs), niewystępujące u ssaków. Przenoszą one elektrony bezpośrednio z ubichinolu na tlen, z pominięciem kompleksów III i IV łańcucha oddechowego, bez translokacji protonów i syntezy ATP [18,19]. W stresowych warunkach, np. w obecności inhibitorów kompleksu III lub IV (leki, cyjanki, azydki, NO), oksydazy alternatywne mogą pełnić rolę oksydaz końcowych, ale jednocześnie same stanowią obiecujący element docelowy dla konstruowanych selektywnych leków przeciw pasożytniczych. Wykazano, że u bytujących we krwi świdrowców *Trypanosoma brucei* alternatywna oksydaza (TAO) jest jedyną końcową oksydazą [20]. U tachyzoitów *Toxoplasma gondii* stwierdzono natomiast brak kompleksu I wrażliwego na rotenon (oksydoreduktaza NADH: ubichinon zw. dehydrogenazą NADH typu I), przy obecności funkcjonalnych kompleksów II, III i IV [21,22]. Zarówno u *T. gondii*, jak i *Plasmodium*, w miejscu kompleksu I występuje alternatywny enzym – dehydrogenaza NADH typu II, niewrażliwa na rotenon [22]. Liczne modyfikacje klasycznego łańcucha transportu elektronów u pierwotniaków, w postaci jego uproszczenia lub rozgałęzienia, zwiększają ich zdolności

adaptacyjne do warunków środowiska, ale mogą także determinować ich aktywność metaboliczną oznaczaną różnymi metodami laboratoryjnymi, w tym z użyciem testów redukcji soli tetrazoliowych.

Azydki, podobnie jak cyjanki, blokują nieodwracalnie centrum aktywne końcowej oksydazy łańcucha oddechowego, oksydazy cytochromowej (kompleks IV łańcucha oddechowego), wskutek czego elektrony nie są przenoszone na tlen [23]. Verseci i wsp. [21] wykazał, że 2 mM cyjanek potasu blokuje całkowicie proces oddychania u tachyzoitów *T. gondii*. W niniejszej pracy stwierdzono natomiast brak wpływu azydku sodowego na zdolność tachyzoitów do redukcji MTT. Wynika to najprawdopodobniej z samej natury procesu redukcji tej soli, który zachodzi głównie poza mitochondrium i jest katalizowany w większości przez enzymy zależne od kofaktorów NADH i NADPH, generowanych w procesie glikolizy. Bardzo ograniczona ilościowo bioredukcja MTT w mitochondrium odbywa się we wczesnych etapach łańcucha oddechowego, przed punktem uchwytu dla azydków [3,16]. Nie wyklucza to możliwości funkcjonowania u *T. gondii* alternatywnej końcowej oksydazy niewrażliwej na cyjanki i azydki.

Otrzymane wyniki wskazują ponadto, że w przypadku tachyzoitów *T. gondii* stopień redukcji soli tetrazoliowych zależy od zjadliwości tego pasożyta. Wariant atenuowany szczepu BK *T. gondii* redukował obie stosowane w pracy sole znacznie słabiej niż wariant zjadliwy. Nasze wcześniejsze badania nad proteomem tachyzoitów *T. gondii* wskazują, że atenuacja prowadzi do zmian ekspresji różnych białek, w tym strukturalnych (aktyna cytoszkieletu), wydzielniczych (m. in. antygeny GRA) i enzymatycznych (hydrolaza NTP1 i katalaza) [24]. Podczas atenuacji spada także aż 4-krotnie zawartość głównego antygeny powierzchniowego *T. gondii*, SAG1, który stanowi aż 5% puli białka pasożyta i odpowiada za jego aktywność inwazyjną [25]. Jest prawdopodobne, że taka radykalna zmiana składu i architektury pelliculi pasożyta skutkuje obserwowaną w pracy utratą zdolności redukcji XTT.

Podsumowując, dane literaturowe i własne wyniki wskazują, że żaden z testów redukcji soli tetrazoliowych nie stanowi uniwersalnej metody oznaczania aktywności metabolicznej różnych komórek. Wybór właściwej soli tetrazoliowej i warunków jej redukcji powinien być więc poprzedzony wstępnymi doświadczeniami, sprawdzającymi przydatność zastosowanej metody do konkretnych celów badawczych.

## Literatura

- [1] Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- [2] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48: 4827-4833.
- [3] Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11: 127-152.
- [4] De Logu A., Uda P., Pellerano M.L., Pusceddu M.C., Saddi B., Schivo M.L. 2001. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicine, isoniazid, and streptomycin in liquid medium. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 33-39.
- [5] Wolter T.P., von Heimburg D., Stoffels I., Groeger A, Pallua N. 2005. Cryopreservation of mature human adipocytes: *in vitro* measurement of viability. *Annals of Plastic Surgery* 55: 408-413.
- [6] Strote G., Bokhof A., Comley J.C. 1993. Viability of *Onchocerca volvulus* *in vitro*. *Parasitology* 107: 175-182.
- [7] Buttke T.M., McCubrey J.A., Owen T.C. 1993. Use of aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods* 157: 233-240.
- [8] van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H.J., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M.A.C. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Immunological Methods* 174: 311-332.
- [9] Brown S.M.A., McDonald V., Denton H., Coombs G.H. 1996. The use of a new viability assay to determine the susceptibility of *Cryptosporidium* and *Eimeria* sporozoites to respiratory inhibitors and extremes of pH. *FEMS Microbiology Letters* 142: 203-208.
- [10] Hill G.C., Degn H. 1977. Steady-state oxygen kinetics of terminal oxidases in *Trypanosoma mega*. *Journal of Protozoology* 24: 563-565.
- [11] Wang L., Sun J., Horvat M., Koutalistras N., Johnston B., Sheil A.G. R. 1996. Evaluation of MTS, XTT, MTT and <sup>3</sup>HTdR incorporation for assessing hepatocyte density, viability and proliferation. *Methods in Cell Science* 18: 249-255.
- [12] Taybali A.F., Seligy V.L. 1995. Semiautomated quantification of cytotoxic damage induced in cultured

- insect cells exposed to commercial *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Journal of Applied Toxicology* 15: 365-373.
- [13] Stevens M.G., Olsen S.C. 1993. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods* 157: 225-231.
- [14] Kuhn D.M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. 2003. Uses and limitations of XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 506-508.
- [15] Berridge M.V., Tan A.S., McCoy K., Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of the cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4: 14-19.
- [16] Berridge M.V., Tan A.S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 474-482.
- [17] Denton H., Roberts C.W., Alexander J., Thong K.W., Coombs G.H. 1996. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiology Letters* 137: 103-108.
- [18] McDonald A.E., Vanlerberghe G.C. 2004. Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: Presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life* 56: 333-341.
- [19] Mather M.W., Vaidya A.B. 2008. Mitochondria in malaria and related parasites: ancient, diverse and streamlined. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40: 425-433.
- [20] Chaudhuri M., Ajayi W., Hill G.C. 1998. Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 95: 53-68.
- [21] Verseci A.E., Rodrigues C.O., Uyemura S.A., Zhong L., Moreno S.N.J. 1998. Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 31040-31047.
- [22] Saleh A., Friesen J., Baumeister S., Gross, Bohne W. 2007. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1217-122.
- [23] Yoshikawa S., Orii Y. 1972. The inhibition mechanism of the cytochrome oxidase reaction. III. Combined effects of inhibitors on cytochrome oxidase. *Journal of Biochemistry* 71: 873-876.
- [24] Nishik N., Schade B., Dytnerka K., Długońska H., Reichmann G., Fischer H.G. 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes and Infection* 3: 689-699.
- [25] Windeck T., Gross U. 1996. *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. *Parasitology Research* 82: 715-719.

Wpłynęło 7 stycznia 2010

Zaakceptowano 12 kwietnia 2010