تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای موش(Balb/c) و منوسیت های انسان متعاقب برخورد با کاندیدا آلبیکنس

ایرج پاکزاد*، دکتر احمد زواران حسینی**، دکتر علیرضا خسروی***

چکیده

سیستم واسطه های فعال نیتروژن (RNI) در اثر تحریک ماکروفاژ ها و منوسیت ها، با القای آنزیم نیتریک اکساید سینتاز القا پذیر (iNOS) فعال شده و تولید واسطه هایی مانند نیتریک اکساید و نیتروزآمین می کنند. در این مطالعه تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای موش Balb/c و منوسیت های انسان بر ضد کاندیدا آلبیکنس بررسی گردید. ماکروفاژها و منوسیت ها در داخل میکروپلیت ۹۶ خانه ای با محیط کشت RPMI- 1640 در گروههای ششگانه کشت داده شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO2 دار، مایع رویی کشت برای اندازه گیری (NO) جمع آوری شد و میزان NO با روش گریس اندازه گیری گردید. بین گروههای آزمون و کنترل در تولید NO و کشتار کاندیدا آلبیکنس تفاوت معنی داری وجود داشت ($P \leq 0.01$) .

این بررسی نشان داد کاندیدا آلبیکنس قادر به القای آنزیم نیتریک سینتاز می باشد. هم چنین، بین مقدار NOتولیدی و میزان کشتار میکروارگانیسم رابطه معنی داری وجود داشت که نشان دهنده نقش NO در کشتار کاندیدا آلبیکنس در این سلولها می باشد.

واژه های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، نیتریک اکساید، منوسیت، ماکروفاژ

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس به طور طبیعی در سطح مخاط افراد سالم وجود دارد، این قارچ بسیار فرصت طلب می باشد و در شرایط ضعف سیستم ایمنی و تغییرات فیزیولوژیک ایجاد بیماری می کند [۱].

نوتروفیل ها،مونونوکلئرها اولین خط دفاعی علیه عفونت قارچی و باکتریایی هستند [۱]. از جمله مکانیسم های کشتار این سلولها، مسیر واسطه های فعال نیتروژنی (RN) و مسیر واسطه های فعال اکسیژنی می باشد[۱].

نیتریک اکساید(NO) اخیراً به عنوان فاکتوری میکروب کش در ماکروفاژهای انسان و موش در برابر بسیاری از پاتوژن ها مورد مطالعه قرارگرفته است [۱].

فعالیت ضد میکروبی ماکروفاژها، زمانی که دارای نقص در آنزیم های وابسته به ROI هستند بر ضد انگل های داخل سلولی از قبیل لیشمانیا و توکسوپلاسما باقی می ماند. این فعالیت وابسته به L-آرژنین می باشد. نیتریک اکساید، گازی با نیمه عمر کوتاه می‌باشد که فعالیت ضد میکروبی یا سیتوتو-کسیسیتی آن وابسته به L-آرژنین می باشد[۷].

* دانشجوی PhD باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس
** دانشیار گروه ایمنی شناسی دانشگاه تربیت مدرس
*** دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

نیتریک اکسایدسینتاز القاء پذیر (iNOS) ماکروفاژها را قادر به تولید NO از L- آرژینین و O_2 می نماید. در ماکروفاژهای فعال شده تصور می شود افزایش غلظت NOدر کشتار باکتری ها، پروتوزوئرها و قارچ ها نقش داشته باشد[۹].

آنزیم کاتالیزکننده این سیستم، نیتریک اکساید سینتاز (NOS)، به وسیله سیگنال های سیتوکاینی القا می شود [۸]. القاکننده های این سیستم عبارتند از: TFN-a، IFN- γ لیپوپلی ساکارید(LPS) و مورامیل دی پپتد [۴].

اگرچه تولید NO تنها مکانیسم دفاعی ماکروفاژهای موشی و منوسیت های انسانی علیه پاتوژن ها نمی باشد، این سیستم تنها بر ضدمحدودی از پاتوژنها فعال می شود[۱].

در این مطالعه، نقش سیستم RNI ماکروفاژهای موشی و منوسیت انسانی و تحریک این سیستم و مهار آن با N^G-MMLA در مقابل کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

استخراج ماکروفاژها

مواد و وسایل لازم جهت استخراج ماکروفاژها:

۱- مـوش Balb/c (از مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی تهیه شد) ۲- محیط کشت RPMI-1640 (سیگما).

روش استخراج ماکروفاژها: ابتدا موشهای Balb/c ۶ تا ۸ هفته ای را با اتر بیهوش کرده و پس از ضد عفونی، آنها را روی یونی لیت خوابانده، سپس ۱۰ml محیط کشت RPMI-1640 وارد صفاق نموده بعد از ۲ تا ۳ دقیقه مایع صفاق جمع آوری گردید و سه بار با دور g * ۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و متعاقب آن، تعداد سلولها و درصد زنده بودن آنها تعیین گردید و سلولها در عدد ۲×۱۰^۶ تنظیم شدند.

کشت ماکروفاژها

مواد و وسایل لازم: ۱- میکروپلیت ۹۶ خانه ای (Nunc)۲- IFN- γ ۳- ان – جی – منومتیل - L- آرژینین ۴- سرم جنین گاو (FSC) (سیگما) ۵- محیط کشتRPMI-1640 ۶- سوش کاندیدا آلبیکنس با شماره استاندارد ICV_{23} (از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد). در میکروپلیت ۹۶ خانه ای طبق جدول زیر ماکروفاژها، انتروفرون گاما و مهار کننده مسیر نیتریک اکساید N^GMMLA اضافه گردید:

محتویات / گروهها	ماکروفاژها	کاندیدا آلبیکنس	انتروفرون گاما IFN- γ	مهار کننده N^GMMLA
گروه اول	۲×۱۰^۵ سلول	۲×۱۰^۵ سلول	+(25IU)	-
گروه دوم	۲×۱۰^۵ سلول	۲×۱۰^۵ سلول	+(25IU)	+(5 μ m)
گروه سوم	۲×۱۰^۵ سلول	۲×۱۰^۵ سلول	-	-
گروه چهارم	۲×۱۰^۵ سلول	۲×۱۰^۵ سلول	-	+(5 μ m)
گروه پنجم	۲×۱۰^۵ سلول	-	-	-
گروه ششم	۲×۱۰^۵ سلول	-	-	+(5 μ m)

در هر گروه، آزمایش سه مرتبه تکرار شد. پلیت-های کشت در انکوباتور $37^{o}C$ و پنج درصد CO_2 به مدت چهار ساعت انکوبه شدند. بعد از چهار ساعت مایع رویی کشت هر چاهک جمع آوری و در $20^{o}C$- نگهداری شد.

لیز ماکروفاژها و کشت کاندیدای آزاد شده و شمارش کلنی:

در این مرحله آب مقطر استریل +ml ۰/۰۱ توئین وml ۰/۰۱ آلبومین سرم گاوی (BSA) با آب مقطر ساده بمدت دو تا پنج دقیقه درون چاهک ها ریخته تا ماکروفاژها لیز شوند و کاندیداها آزاد شوند،سپس از این سوسپانسیون حاصل از لیز رقت تهیه کرده و بر روی محیط کشت سابورو کلرامفنیکل سیکلوهگزامید کشت داده شد و در $37^{o}C$ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و سپس کلنی ها شمارش شدند.

روش تعیین درصد کشتار

بر اساس فرمول زیر درصد کشتار در هر گروه محاسبه شد.

$$\text{درصد کشتار} = \frac{\text{کلنی کانت آزمون} - \text{کلنی کانت کنترل}}{\text{کلنی کانت کنترل}} \times ۱۰۰$$

کلنی کانت گروه کنترل از طریق کشت چهار ساعته سلول های کاندیدا آلبیکنس بدون ماکروفاژ و منوسیت در داخل خانه های میکروپلیت و سپس کشت آن روی محیط سابورو به دست آمد[۱، ۶].

روش استخراج منوسیت ها

موادو وسایل لازم: ۱- نمونه های خون انسان ۲- فایکول (سازمان انتقال خون) ۳- محیط کشت RPMI-1640 .

روش استخراج به این صورت بودکهml ۱۰ خون را از هر نمونه انسان تهیه و به لوله هایی که حاویIUM ۱۰-۵ هپارین است اضافه و سپس خون ها با حجم مساوی از محیط کشت RPMI-1640 رقیق شدند، ۳ml فایکول در یک لوله ریخته و بعد به آرامی یا سرنگ یا پیپت پاستور استریل در حالی که نوک سرنگ یا پیپت پاستور به دیواره لوله چسپیده بودml ۷ خون رقیق شده به سطح فایکول منتقل گردید. سپس با دور g ×۴۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه ابری سفید رنگ را به آرامی توسط پیپت پاستور جدا نموده و در درون لوله حاوی محیط کشت RPMI-1640 ریخته، سپس سلول ها با محیط کشت در دور g ×۲۰۰ در دقیقه بمدت پنج دقیقه سانتریفوژ و شستشو شد.

تعداد سلول ها و Viability آنها مانند ماکروفاژها تعیین گردید. سلول ها را در تعداد ml ۲×۱۰^{۶} تنظیم و تعداد ۲×۱۰^{۵} را به هر خانه گروه های سه تایی اضافه گردید سپس میکروپلیت ۹۶ خانه ای به مدت دوتا چهار ساعت در داخل انکوباتور $37^{o}C$ با پنج درصد CO_2 انکوبه شد. با توجه به این که منوسیت ها توانایی چسپیدن به سطوح پلاستیکی را دارا می باشند و لنفوسیت ها فاقد چنین خاصیتی هستند این سلول ها در مدت انکوباسیون دو تا چهار ساعته به سطح خانه‌ها می‌چسبند. محیط کشت داخل خانه ها که حاوی لنفوسیت ها می باشد به وسیله پیپت پاستور خارج گردید و محیط کشت تازه اضافه شد. با توجه به درصد منوسیت ها از کل منونوکلئرها، تعداد منوسیت ها در هر خانه ۲×۱۰^{۴} محاسبه شد.

کشت منوسیت ها

طبق جدول مربوط به ماکروفاژها منوسیت های چسبیده به دیواره میکروپلیت با سلول های کاندیدا آلبیکنس، IFN- γ و مهار کننده (N^{G}-MMLA) کشت داده شد. در هر خانه تعداد منوسیت ها ۲×۱۰^{۴} تنظیم گردید. مراحل لیزمنوسیت‌ها،

جمع‌آوری مایع رویی و شمارش کلنی مشابه ماکروفاژ بود. از روش Griess برای اندازه گیری NO_2 استفاده گردید[۱، ۵، ۸].ازآزمون های آماری مقایسه،میانگین، آنالیز واریانس یک طرفه (one- way)، T-Test و LSD در سطح ($P\leq .05$, $P\leq 0.01$) استفاده شد.

یافته های پژوهش

مقایسه میانگین شمارش کلنی: ازمقایسه شمارش کلنی در گروه های کشت ماکروفاژی و منو سیتی با کاندیدا آلبیکنس نتایج زیر به دست آمد:با استفاده از آزمون T-Test مشخص شد که گروه اول با گروه دوم، گروه سوم با چهارم، گروه اول با گروه سوم و گروه دوم با گروه چهارم دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P\leq 0.01$) می-باشند. بدین صورت که در گروه اول تعدادکلنی ۱۲ ± ۷۱۲ (درکشت ماکروفاژها)، ۳/۸ ± ۳۳۰ (در کشت منوسیت ها) می باشد و این نشان می دهد که در گروه اول ماکروفاژی و گروه دوم منوسیتی تعداد کلنی شمارش شده کمتر می باشد (نمودار و جدول نشان داده شده است).

از مقایسه گروه سوم ماکروفاژی با گروه چهارم آن و گروه سوم منوسیتی با گروه چهارم خودش مشابه نتیجه بالا بدست آمد.

هم چنین تعداد کلنی گروه اول ماکروفاژی ۱۲ ± ۷۱۲ و گروه سوم آن ۶/۴ ± ۸۰۰ ، تعداد کلنی گروه اول منوسیتی ۳/۸ ± ۳۳۰ و گروه سوم آن ۸/۷ ± ۳۵۴ می باشد. از مقایسه گروه-های اول با گروه های سوم نتیجه گرفته شد که در گروه های اول به دلیل وجود IFN- γ نسبت به گروه های سوم که فاقدگاما IFN- γ می باشند تعدا کلنی های شمارش شده کم تر می باشند. از مقایسه گروه های دوم ماکروفاژی و منوسیتی با گروه های چهارم آنها نتیجه بالا بدست آمد.

مقایسه درصد کشتار

با استفاده از آزمون T-Test مشخص شد که گروه اول با دوم، گروه سوم با چهارم، گروه اول با سوم، گروه دوم با چهارم (در هر دو کشت ماکروفاژی و منوسیتی) دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P\leq 0.01$) از لحاظ درصد کشتار می باشند، به دین صورت که در گروه اول ماکروفاژی درصد کشتار ۱/۰۶ ± ۲۶/۲۹ و گروه دوم آن ۴۸ /۱ ± ۲۹/۲۹ می باشد. این نشان می دهد در گروه های اول که فاقد مهار کننده NO می باشند نسبت به گروه های دوم که دارای مهار کننده می باشند تعدا سلول های مخمری بیشتری کشته شده است (نمودار ۱، جدول نشان داده نشده است). از مقایسه گروه سوم با چهارم (در هر دو گروه منوسیتی و ماکروفاژی) نتیجه بالا به دست آمد.

هم چنین درصد کشتار گروه اول ماکروفاژی ۰۶/ ۱ ± ۲۸/۹۲ وگروه سوم آن ۰/۶۴۹ ± ۱۹/۹۹ و درصد کشتار گروه اول منوسیتی ۲/۷۴ ± ۳۴/۷ و گروه سوم آن ۲/۱۷۵ ± ۲۵/۲۸ می باشد. از مقایسه این اعداد نتیجه گرفته می شود که در گروه های اول به دلیل وجود IFN- γ درصد کشتار نسبت به گروه های سوم بیشتر می باشد از مقایسه گروه سوم با چهارم (درهردو گروه منوسینی و ماکروفاژی) نتیجه بالا به دست آمد. (نمودار ۱ و جدول ۱).

جدول ۱: میانگین درصد کشتار در گروه های منوسیتی

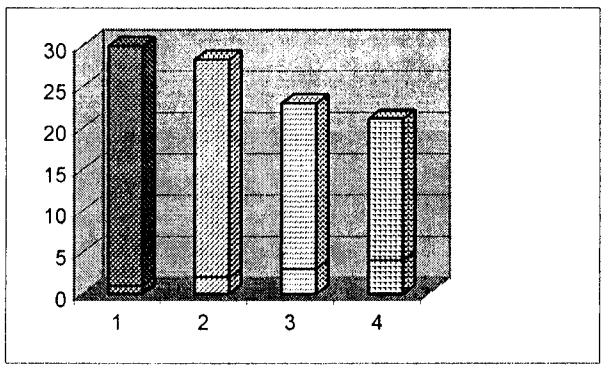
خانه / گروه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	میانگین	SD
اول	۳۴/۳	۳۴	۳۴/۱	۳۴/۲	۴۳/۱	۳۴/۵	۳۴/۱	۳۳/۳	۳۵	۳۲	۳۴	۳۳/۹	۳۴/۷	± ۲/۷۴
دوم	۲۹/۱	۲۸	۲۹/۸	۲۸/۷	۲۹/۲	۲۹/۱	۲۸/۲	۲۹/۲	۲۷/۲	۳۰	۲۹/۹	۳۳/۲	۲۹/۲۹	± ۱/۴۸
سوم	۳۰/۲	۲۵/۲	۲۴/۸	۲۵/۸	۲۶/۲	۲۶/۳	۲۷/۹	۲۴	۲۳	۲۳	۲۴	۲۳	۲۵/۲۸	± ۲/۱۷۵
چهارم	۲۴	۲۲	۲۳	۲۲/۱	۲۳/۸	۲۱/۹	۲۴/۸	۲۳/۹	۲۳/۸	۲۲/۱	۲۳	۲۲	۲۳/۰۳	± ۱/۰۱۳

مقایسه نیتریک اکساید

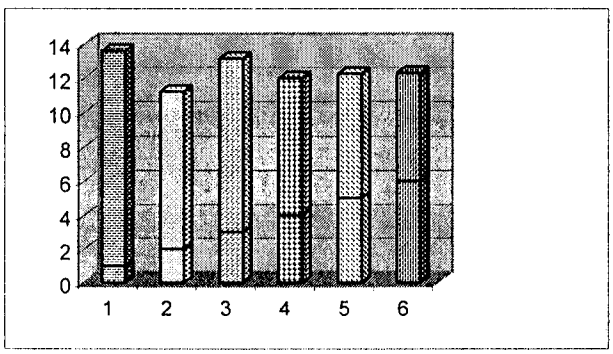
با استفاده از آزمون T-Test مشخص شد که گروه اول با دوم، گروه سوم با چهارم، گروه پنجم با ششم، گروه اول با سوم، گروه دوم با چهارم، گروه سوم با پنجم و گروه چهارم با ششم (در هردو گروه کشت ماکروفاژی و منوسیتی) دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P \leq 0.01$) از نظر تولید نیتریک اکساید هستند. بدین صورت که در گروه اول ماکروفاژ مقدار NO ۰/۸۳۸ ± ۲۹/۷۲ (بر حسب μm)، گروه دوم آن ۲/۲۹ ± ۱۹/۲ (بر حسب μm) و در گروه اول منوسیتی مقدار NO ۰/۸۳۴ ± ۱۲/۰۶ (μm) درگروه دوم مقدار NO ۰/۲۲ ± ۹/۲ می باشد (نمودار ۲). این نشان می دهد در گروه های اول که فاقد مهار کننده هستندنسبت به گروه های دوم مقدار نیتریک اکساید بیشتری تولید شده است. از مقایسه گروه سوم با چهارم و گروه پنجم با ششم نتیجه بالا به دست آمد (نمودار ۲).

هم چنین در گروه سوم ماکروفاژی مقدار NO ۱/۴۴۴ ± ۲۷/۲۸ و گروه سوم منوسیتی مقدار NO ۰/۵۶ ± ۱۰/۱۶ می باشد از مقایسه این گروه ها با گروه اول هر دو نوع سلول نتیجه گرفته می شود که به دلیل وجود IFN- γ در گروه های اول مقدار NO نسبت به گروه های سوم بیشتر تولید شده است (نمودار ۲).

همین طور در گروه پنجم ماکروفاژی مقدار NO ۷/۷ ± ۲۸ و در گروه پنجم منوسیتی مقدار NO ۰/۴۱۳ ± ۷/۲۵ می باشد از مقایسه این گروه ها با گروه های سوم هر دو نوع سلول نتیجه گرفته می شود که به دلیل وجود سلول های مخمری کاندیدا آلبیکنس، ماکروفاژها و منوسیت ها نسبت به گروه های پنجم مقدار NO بیشتری تولید کرده اند (نمودار ۲).



نمودار ۱. مقایسه میانگین کشتار در گروههای مختلف ماکروفاژی



نمودار ۲. مقایسه میانگین تولید NO در گروههای مختلف منوسیتی

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، فعال شدن سیستم نیتریک اکساید (NO) ماکروفاژهای موشی و منوسیت های انسانی و تحریک این سیستم با IFN- γ و مهار آن با N^G-MMLA در مقابل کاندیدا آلبیکنس و هم چنین ارتباط بین تولید NO و میزان کشتار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ماکروفاژها و منوسیت های گروه اول نسبت به گروه دوم از لحاظ تولید NO ، شمارش کلنی و درصد کشتار دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P\leq 0.01$) می باشند، یعنی ، در گروه اول تعداد کلنی نسبت به گروه دوم کم تر و درصد کشتار و تولید NO بیشتر می باشد این امر بیانگر این است در گروه دوم که حاوی مهار کننده NO بوده مقدار NO کم تری تولید شده و متعاقب آن درصد کشتار کم تر گردیده است. از مقایسه گروه سوم با چهارم نتیجه بالا به دست آمد.این نتایج با نتایجی که تورس و سایر همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام دادند و بیان کردند که نیبریک اکساید (NO) در افزایش مقاومت‌موش دارای نقص سلول های B,T(SCID) به کاندیدیازیس مخاطی نقش مهمی داردمطابقت دارد [۵].

از مقایسه گروه اول با سوم و دوم با چهارم نتیجه گرفته شد که در گروه اول و دوم که دارای IFN- γ هستند نسبت به گروه دوم و چهارم که فاقد IFN- γ هستند درصد کشتار و تولید نیتریک اکساید و شمارش کلنی دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P\leq 0.01$) می باشد، این نشان می دهد که در گروه اول و دوم به دلیل وجود IFN- y ، مقدار تولید نیتریک اکساید (NO) و متعاقب آن درصد کشتار از گروه سوم و چهارم بیشتر می باشد. نتیجه گرفته شد که IFN- γ عامل تحریک مسیر نیتریک اکساید می باشد [۹] .

در سال ۱۹۹۸ کاپوزتا و سایر همکاران نشان دادند موشهایی که نقص در تولید IFN- γ دارند تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای صفاقی آن ها دچار اختلاف شده است. این نشان دهنده نقش IFN- γ در تولید نیتریک اکساید می باشد[۱].

از مقایسه گروه سوم با پنجم و گروه چهارم با ششم نتیجه گرفته شد که در گروه سوم و چهارم به دلیل وجود کاندیدا آلبیکنس مقدار نیتریک اکساید بیشتری نسبت به گروه پنجم و ششم تولید شده است و این امر بیانگر آن است که کاندیدا آلبیکنس موجب القای مسیر نیتریک اکساید می شود.

از این بررسی نتیجه گرفته شد که کاندیدا آلبیکنس قادر به القای مسیر نیتریک اکساید در ماکروفاژها و منوسیت ها می باشد و یک ارتباط معنی داری بین مقدار تولید نیتریک اکساید (NO) و درصد کشتار کاندیدا آلبیکنس وجود دارد . بدین معنی که هر چه مقدار نیتریک اکساید (NO) تولید شده بیشتر باشد درصد کشتار بیشتر می شود ($P\leq 0.01$). البته نقش مکانیسم های دیگر این سلول ها که ممکن است در کشتار کاندیدا آلبیکنس دخا لت داشته باشند و در این تحقیق مورد مطالعه قرار نگرفته اند را نباید نادیده گرفت.

منابع و مأخذ

۱- رزمجو الهام؛ مطالعه اثر آرژینین و سیترولین در in vitro, in vivo بر مهار تکثیر انگل، لیشمانیاماژور در موش BALB/c؛ پایان نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۶.

2-Domer,E.J.Lehrer,I.R.,1993.Introduction to Candida,Sytematic Candidasis,pp.49-116.In:Fungal Infection and Immune Response.Eds., Murphy,J.W., Fridman.H.andBendinelli.M,pub.C.R.C.press.1993

3-Kleni,A.K. and Witkin,S.S.1990.Prostaglandin E2 Enhances and Gamma Interferon Inhibits Germ Tube Formation in Candida 58(1):260-262. albicans.*Infect.Immun.*

4-Torres,A.V.Carson,J.Jwarner,T.,and Balish,E., 1995.Nitric Oxide Enhance Resistance of SCID Mice to Mucosal Candidiasis.J.Infect dis.,175:192-198.

5-Bogdan,C.Vodovotz,Y.paik, J.Xie,Q.W., 1994.Mechanism of Suppression of Nitric Oxide Synthase Expression by Interlukin-4 in primary Mouse Macrophage.*J.Leukoc.Biol.*,55:227-233.

6-Sheltio,J.E.,Kolls,J.K., Nitric Oxide and 1996. Olariu.R.,Beck,J.M., Host Defense Against pneumocystiscarrinii infection in a mouse model.*Infect.Dis.*173:432-439.

7-Albina, J.,Mills, C.D.,Henry, 1989.Regulation of W.L.,Caldwell,M.D., Macrophage physiology by L-Arginine:role of the Oxidative-L-Arginin Deiminase pathway.*J.Immunol.*, 143(11):3641-3646.

8-Hibbs,Jr.J.B.,Granger,D.L., Krahenbuhi, j.L. and Adams.L.B., 1992. Synthesis of Nitric Oxide From L-Arginine: a Cytokine Inducible pathway with antimicrobial activity.pp.279-292,In:Mononuclear Phagocytes,Ed.Fruth,R.V.,Kluwer Academic publishers, Chapter 37,Netherland.

9-Thiemeramann C., 1997. Nitric Oxide and Septic Shock.Elesvier,29(2):159-166.

Producing NO. in mice macrophages and human monocytes following confrontation with C.albicans

Pakzad I., Dr. zavaran Husseini A., Dr khossravi A.

ABSTRACT: In this study Balb/c mice macrophages and human monocytes were collected and cultured in six groups in 96-well microplates containing RPMI-1640 separatly. The first group involved macrophages, C.albicans and rIFN-y ,whereas its control group (the second group) contained macrophages,C.albicans and N^G –MMLA. The third group received macrophages and C.albicans whereas its control group (the fourth)included macrophages,C, albicans and N^G -MMLA. The fifth group had only macrophages and its control group (the sixth) involved macrophages and N^G –MMLA.

The same protocol was repeated for human monocytes separated on ficoll and incubated in 96-plate for adherency.The plates were incubated in 5% Co2 for 4hs at $37^{\cdot c}$, then supernatent of each well was removed and NO. production was assessed by Griess method.

Macrophages and monocyetes were laysed by distilled water and 1% BSA and each well was plated on sabauraud dextrose agar . The number of colony forming unit (CFU)was registered after 48 hours of incubation at 37^{*c}.

Statistical analysis resulted in a difference between experimental and control groups in NO production and killing of C.albicans ($p<0.05$).NO. production and candida killing percent was higher in experimental than that of the control groups ($p<0.05$). The results proved the role of NO. in candidacidal and candidastatic in mouse macrophages and human monocytes.

Key words: *C.albicans, Nitric Oxide,Balb/c, Macrophage.*