

نقش دی هیدرواپی اندروسترون بر تکثیر انگل لیشمانیا ماژور در ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c

شهرزاد زمانی تقی زاده رابع* MS.c.، احمد زواران حسینی^۱ Ph.D.،
سیدعلیرضا مصباح نمین** Ph.D.

چکیده

هدف: در این پژوهش ارتباط مهار آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون با میزان تولید نیتریک اکساید و نیز میزان تکثیر آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در ماکروفاژهای آلوده بررسی شد.

روش بررسی: ابتدا ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c جدا و با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار از مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، درصد زنده بودن در ماکروفاژها با استفاده از تست MTT بررسی شد. همچنین بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون میزان کاهش فعالیت آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD) تعیین شد. سپس ماکروفاژها را با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور آلوده کرده و میزان تولید نیتریک اکساید (NO) بعد از ۱۸ ساعت با استفاده از روش رنگ سنجی گریس سنجیده شد. از غلظت ۱۰۰ میکرو مولار برای بررسی تاثیر مهار کننده بر میزان تکثیر انگل در ماکروفاژها از روز ۱ تا روز ۷ استفاده شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت دی هیدرو اپی اندروسترون درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها افزایش یافته و فعالیت آنزیم G6PD کاهش یافت. همچنین میزان تولید NO توسط ماکروفاژها با افزایش غلظت دی هیدرو اپی اندروسترون نسبت معکوس داشت. بررسی تعداد انگل در ماکروفاژها نشان داد که میزان تکثیر انگل از روز ۱ تا روز ۷ بررسی نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: فعالیت آنزیم G6PD با استفاده از مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون کاهش می‌یابد. همچنین فعالیت آنزیم G6PD با کاهش تولید NO و افزایش درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها همراه می‌باشد و از آنجایی که NO نقش اصلی را در فعالیت لیشمانیا کشی ماکروفاژها به عهده دارد بنابراین با مهار آنزیم G6PD فعالیت لیشمانیا کشی ماکروفاژها کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز، نیتریک اکساید، ماکروفاژهای

صفاقی موش BALB/c، دی هیدرو اپی اندروسترون

دریافت مقاله: ۸۴/۶/۱۸، اصلاح مقاله: ۸۶/۹/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۰/۶

ک* نویسنده مسئول: استاد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

* کارشناس ارشد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

** استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

آدرس پست الکترونیکی: zavarana@modares.ac.ir

مقدمه

ماکروفاژها سلولهای ایمنی هستند که در دفاع علیه عوامل عفونی مختلف نقش مهمی ایفا می‌کنند. مکانیسم‌های میکرب‌کشی ماکروفاژها عمدتاً شامل تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و تولید نیتریک اکساید (NO) می‌باشد (۱). مسیر متابولیکی پنتوز فسفات که در اکثر سلولها وجود دارد، مهمترین منبع تولید کننده NADPH در داخل سلولها می‌باشد. NADPH تولید شده کوآنزیم فعالیت بسیاری از آنزیمهای مهم از جمله کمپلکس آنزیمی نیتریک اکساید سنتاز (NOS) در داخل ماکروفاژها است (۲). آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) آنزیم محدود کننده سرعت و مهمترین آنزیم این مسیر متابولیکی است و در بررسی‌های مختلف نشان داده شده که افزایش فعالیت آن منجر به افزایش میزان NADPH داخل سلولی می‌شود (۳-۵). در این تحقیق به منظور مهار فعالیت آنزیم G6PD از دی‌هیدروآپی‌اندروسترون (DHEA) استفاده کردیم که مهار کننده غیررقابتی آنزیم G6PD بوده و بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های مختلف توسط این ماده منجر به کاهش چشمگیر میزان NADPH داخل سلولی می‌شود. همچنین این ماده در *in vivo* نیز قابل استفاده است و در نتیجه می‌توان با توجه به نتایج این تحقیق در بررسی‌های بعدی از آن در *in vivo* نیز استفاده کرد (۶-۸). همچنین در بررسی‌های قبلی مشخص شده است که در افرادی که دچار نقص در آنزیم G6PD می‌باشند، میزان ابتلا به عفونت‌های مختلف از جمله توکسوپلازما، ریکتزیا و هلیکوباکتر پیلوری و نیز شدت بیماری حاصله افزایش می‌یابد (۹-۱۱). در این مطالعه اثر مهار فعالیت آنزیم G6PD در فعالیت میکروب‌کشی ماکروفاژها، از انگل لیشمانیا ماژور به عنوان یک مدل استفاده شد زیرا انگل لیشمانیا ماژور عامل ایجاد لیشمانیوزیس است که هنوز در شهرهای مختلف ایران وجود داشته و تلاش برای کنترل آن همچنان ادامه دارد. همچنین ماکروفاژها مهمترین سلولهایی هستند که توسط این انگل‌ها آلوده می‌شوند، یعنی در واقع مخزن انگل لیشمانیا هستند و مهمترین مکانیسم لیشمانیاکشی آنها تولید نیتریک اکساید می‌باشد و همانطور که ذکر شد تولید نیتریک

اکساید به در دسترس بودن کوآنزیم NADPH به مقدار کافی در سلولها بستگی دارد (۱۲-۱۷).

روش بررسی

در این تحقیق از موشهای BALB/c ماده (۸-۹ هفته‌ای) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده گردید. مهار کننده مورد استفاده دی‌هیدروآپی‌اندروسترون (مهار کننده آنزیم G6PD) استفاده بود. برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از تست‌ها از نرم افزار SPSS 11.0 استفاده شد. Viability سلولی، تولید نیتریک اکساید و تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا در ماکروفاژها (\pm خطای استاندارد) در هر گروه ۴ تایی محاسبه شد. از t-Test و آنالیز آماری یک طرفه برای آنالیز نتایج حاصله از سنجش مرگ سلولی، فعالیت آنزیم و تکثیر داخل ماکروفاژی انگل و از آماری غیرپارامتریک من-وینتی برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید استفاده شد. در تمام حالات ($P < 0.05$) به عنوان پاسخ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c.

موش‌های BALB/c ماده (۸-۹ هفته‌ای) برای جداسازی ماکروفاژهای صفاقی مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا به صفاق موش RPMI تزریق شد و سپس مایع صفاقی موش تحت شرایط استریل آسپیره شد. سوسپانسیون سلولی آسپیره شده را دوبار با PBS شستشو داده و بعد از سانتریفوژ سلولها با دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی را دور ریخته و توده سلولی ته لوله در ۱ سی‌سی RPMI حاوی FCS ۱۰٪ به حالت سوسپانسیون درآورده شد. سپس ماکروفاژها شمارش شد و به تعداد 1×10^6 رسید و درصد زنده بودن آنها تعیین شد.

نحوه نمونه‌برداری و تکثیر انگل. از موشهای BALB/c

آلوده به انگل لیشمانیا ماژور به عنوان مخزن استفاده شد. ابتدا موش کشته شده، طحال آن در شرایط استریل جدا شده و در داخل محیط کشت NNN قرار داده شد. محیط مذکور را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور بررسی شد. برای رشد بیشتر،

کنترل منفی استفاده شد زیرا این ماده مهار کننده تولید NO می‌باشد. میزان تجمع NO₂ به عنوان شاخص میزان تولید NO در مایع رویی سلولهای کشت داده شده، توسط روش رنگ سنجی گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی ماکروفاژهای کشت داده شده با ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی [نفتیل] اتیلن آمید دی هیدروکلراید (۱ mg/ml)، سولفانیل آمید (۱ mg/ml)، اسید فسفوریک ۵٪ و آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد سپس جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

تعیین فعالیت آنزیم G6PD. برای سنجش فعالیت آنزیم G6PD (برحسب nmol of NADPH/min/mg protein) ماکروفاژهای صفاقی موش را به تعداد (cells/well) 5×10^5 در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) تیمار شدند و هر گروه بصورت سه تایی بررسی شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵٪ قرار گرفت و بعد از این مدت ماکروفاژها از ته پلیت جدا شده و فعالیت آنزیم G6PD در عصاره سلولی ماکروفاژهای لیز شده تعیین شد. برای انجام این تست نیز همانند تست سنجش میزان تولید NO از دو گروه ماکروفاژ استفاده شد: ماکروفاژ همراه با مهار کننده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا همراه با مهار کننده. ماکروفاژهای صفاقی جدا شده از ته هر چاهک سانتریفوژ شده (۲۰۰ g) به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد) سپس در PBS به حالت سوسپانسیون در آمدند و برای لیز شدن تحت سونیکاسیون (6 times, 10-s burst with 1-min intervals) قرار داده شدند. عصاره سلولی قبل از سنجش به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g با دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و تا زمان سنجش روی یخ نگهداری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره سلولی با ۰/۷۵ میلی لیتر از بافر تریس-اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار حاوی ۳ میلی مولار MgCl₂ (pH ۷/۸)، ۲۵ میکرولیتر از گلوکز-۶ فسفات ۰/۱۳ مولار و ۲۵ میکرولیتر از NADPH ۸ میلی مولار مخلوط و افزایش جذب NADPH بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد در طول موج ۳۳۹

ابتدا پروماستیگوتها به محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم جنین گاو (FCS) و بعد از رشد اولیه، به محیط حاوی RPMI 1640 ۱۰-۲۰٪ سرم جنین گاو غیر فعال شده، منتقل شدند. این پروماستیگوتها در مجاورت ماکروفاژها در ۳۷ درجه سانتی گراد وارد ماکروفاژها شده و سپس به فرم آماستیگوت تبدیل شدند (۱۸).

تست MTT. در اوایل دهه ۱۹۸۰ موسمان به توضیح این روش پرداخت (۱۹). در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی بدست آمده از صفاق موش اضافه شده و سلولها در گروه‌های مجزا با غلظت‌های مختلف از مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و در هر گروه بصورت سه تایی تیمار شدند (۶-۸). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵٪ قرار گرفت. بعد از این مدت درصد سایتوتوکسیسیته سلولها توسط تست MTT تعیین شد. محلول حاوی MTT (3-(4,5-tetrazolium-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide) با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به تمام چاهکها اضافه شد و کاملا مخلوط شد تا تمام بلورهای آبی تشکیل شده حل شوند سپس پلیت توسط دستگاه Multiscan MS ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

سنجش غلظت نیتريك اكساید (NO). برای انجام این تست از دو گروه ماکروفاژ، یکی ماکروفاژ تیمار شده با مهار کننده و یکی ماکروفاژهای آلوده شده با انگل لیشمانیا که با مهار کننده تیمار شده بودند استفاده شد و هر گروه بصورت سه تایی بررسی شد. از ماکروفاژهای تیمار شده با SNAP که تقویت کننده مسیر تولید نیتريك اكساید است، همراه با انگل لیشمانیا ماژور، اس-نیتروزو-استیل-پنسیل آمید (SNAP) + اینترفرون گاما (IFN- γ) و نیز لیپوپلی ساکارید (LPS) + IFN- γ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد زیرا نشان داده شده است که این مواد تولید NO توسط ماکروفاژها را تحریک می کنند. از ان - متیل - ال - آرژنین (NMMA) نیز در ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا به عنوان

ANOVA و Mann-Witney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

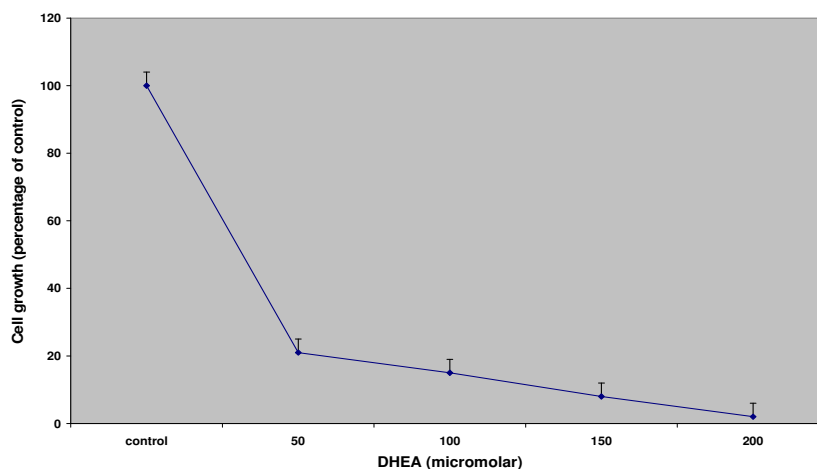
نتایج حاصل از انجام تست MTT. همانطور که در نمودار ۱ مشخص شده است، نتایج حاصل از انجام تست MTT بر روی ماکروفاژهایی که با غلظت‌های مختلف مهار کننده دی‌هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده بودند، نشان داد که با افزایش غلظت مهار کننده، درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است ($P < 0.001$). همچنین بین میزان سایتوتوکسیسیتی ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف از مهار کننده با هم نیز تفاوت قابل توجهی ($P < 0.001$) وجود داشته است.

نتایج حاصل از سنجش غلظت نیتریک اکساید (NO). نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهار کننده دی‌هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) بعد از ۱۸ ساعت که در نمودار ۲ آمده است، نشان داد که تیمار ماکروفاژها با این مهار کننده میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها را بطور قابل توجهی کاهش می‌دهد و این کاهش با افزایش غلظت مهار کننده رابطه مستقیم دارد.

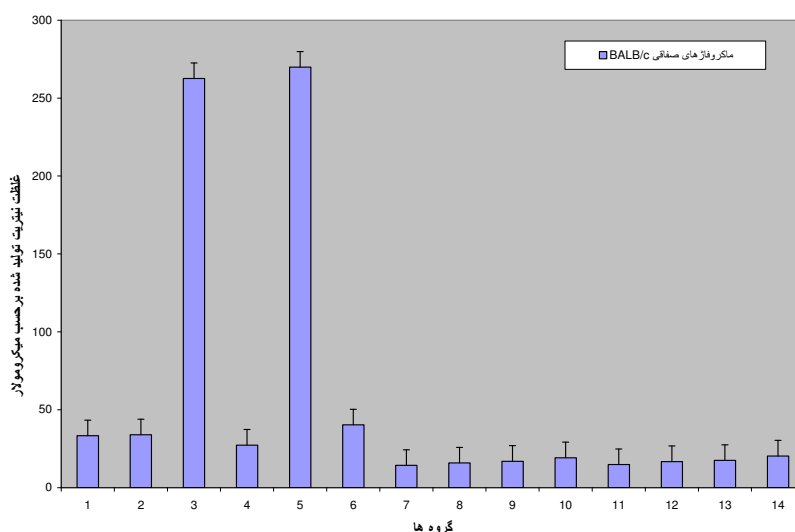
نانومتر قرائت شد. همچنین غلظت پروتئین سلولی در ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره سلولی ماکروفاژها به روش برادفورد تعیین شد و فعالیت آنزیم بدست آمد (۲۰).

شمارش تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در ماکروفاژها. ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c همراه با محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS غیر فعال شده با حرارت، به داخل پلیت‌های ۱۶ خانه‌ای ریخته شدند. بعد از ۳-۲ ساعت محیط رویی کشت دور ریخته شده و محیط حاوی انگل‌های لیشمانیا ماژور به نسبت ۱:۲۰ (آماستیگوت به ماکروفاژ) که در فاز ایستا بودند همراه با محیط حاوی غلظت‌های مختلف مهار کننده افزوده شد. تمام گروه‌ها بصورت سه تایی بررسی شدند. میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵٪ CO_2 انکوبه شد. از روز ۱ تا روز ۷ ماکروفاژهای هر چاهک با قرار دادن میکروپلیت روی یخ و سپس پیپتاژ با PBS سرد از ته پلیت جدا و روی اسلاید قرار داده شدند و بعد از فیکس کردن با متانول با استفاده از رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و تعداد آماستیگوت‌ها در ۲۰۰ ماکروفاژ با عدسی روغنی $\times 1000$ شمارش شدند و نتایج آن در گروه‌های شاهد و آزمایش در روز اول و هفتم ثبت شد و به صورت درصد با استفاده از بررسی در زیر میکروسکوپ تعیین شد.

آزمون‌های آماری. نتایج حاصل از تست‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و روش‌های آنالیز آماری غیر پارامتریک



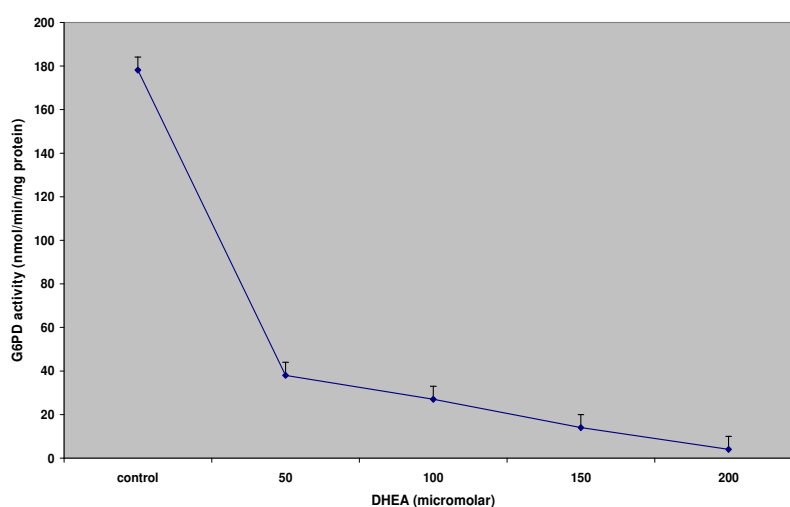
نمودار ۱. تاثیر DHEA بر مهار رشد سلولی.



نمودار ۲. میزان تولید نیتريت (بر حسب میکرومولار) توسط ماکروفازها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون با غلظت های مختلف مهار کننده آنزیم G6PD (دی هیدرو اپی اندروسترون).

غلظت ۵۰ میکرو مولار؛ گروه ۱۱، ماکروفاز+ انگل لیشمانیا + DHEA با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار؛ گروه ۱۲، ماکروفاز + انگل لیشمانیا + DHEA با غلظت ۱۵۰ میکرو مولار؛ گروه ۱۳، ماکروفاز + انگل لیشمانیا + DHEA با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار؛ گروه ۱۴، ماکروفاز + انگل لیشمانیا + DHEA با غلظت ۵۰ میکرو مولار (n = 4)، داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده اند، ($P < 0.001$).

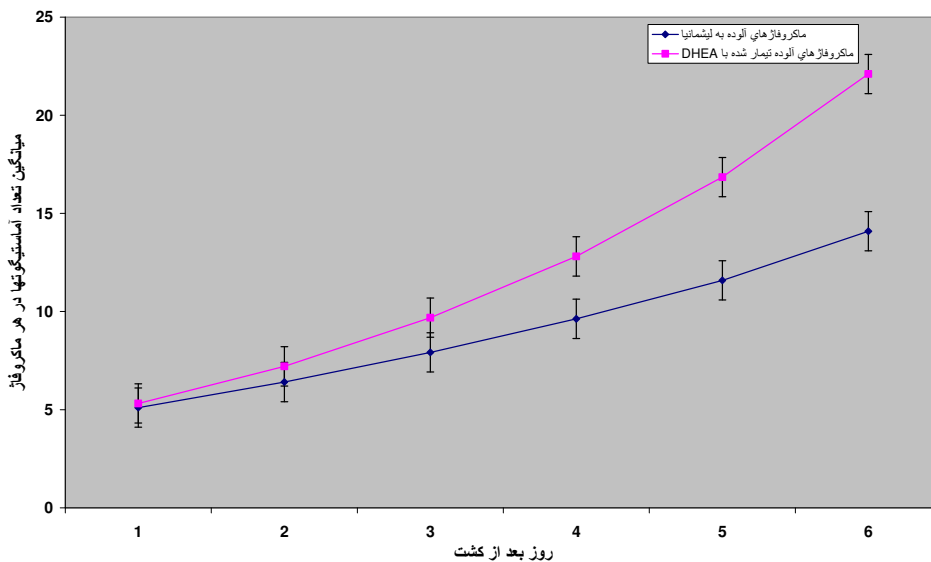
گروه ۱، ماکروفاز؛ گروه ۲، ماکروفاز + انگل لیشمانیا؛ گروه ۳، ماکروفاز + انگل لیشمانیا مازور + SNAP؛ گروه ۴، ماکروفاز+ انگل لیشمانیا مازور + NMMA؛ گروه ۵، ماکروفاز+ SNAP + IFN- γ ؛ گروه ۶، ماکروفاز + LPS + IFN- γ ؛ گروه ۷، ماکروفاز + DHEA با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار؛ گروه ۸، ماکروفاز+ DHEA با غلظت ۱۵۰ میکرو مولار؛ گروه ۹، ماکروفاز+ DHEA با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار؛ گروه ۱۰، ماکروفاز+ DHEA با



نمودار ۳. تاثیر غلظتهای مختلف DHEA بر فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD).

شده توسط گروه‌های مختلف با یکدیگر نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.001$). در گروه ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا که با غلظت‌های مختلف از مهار کننده تیمار شده بودند، میزان تولید NO نسبت به گروه فاقد انگل لیشمانیا که با همان غلظت از مهار کننده تیمار شده بودند و نیز نسبت به سایر غلظت‌های همان گروه کاهش معنی‌داری نشان نداد ($P < 0.05$). بنابراین انگل لیشمانیامازور به تنهایی نتوانست میزان تولید نیتریک‌اکساید را تا حد معنی‌داری افزایش دهد.

ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار DHEA تیمار شدند. تاثیر DHEA بر رشد سلولی توسط تست MTT مشخص شد. هر ستون و error bar نشان دهنده میانگین و انحراف معیار را نشان می‌دهد ($p < 0.001$, $n = 4$). میزان NO تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف از مهار کننده، کاهش قابل توجهی نسبت به ماکروفاژهای گروه کنترل ($P < 0.001$) داشت. همچنین بین میزان NO تولید



نمودار ۴. اثر مهار فعالیت آنزیم G6PD بر تکثیر آماستیگوت‌های لیشمانیامازور در ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا در طی ۷ روز (از روز ۱ تا ۷).

غلظت‌های مختلف مهار کننده در همان گروه با یکدیگر و نیز نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری ($P < 0.001$) داشت. اما استفاده از انگل لیشمانیا ماژور منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژهای آلوده نشد ($P > 0.05$). فعالیت G6PD در عصاره سلولی حاصل از ماکروفاژهای انکوبه شده با غلظت‌های مختلف DHEA سنجیده شد ($n = 4$ ، داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند ($P < 0.001/0$)).

نتایج حاصل از بررسی تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیامازور در ماکروفاژها. بعد از بررسی ماکروفاژهای رنگ‌آمیزی شده توسط رنگ گیمسا میانگین تعداد آماستیگوت‌ها

نتایج حاصل از تعیین فعالیت آنزیم G6PD. سنجش فعالیت آنزیم G6PD (فعالیت ویژه) در عصاره حاصل از لیز ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهار کننده دی‌هیدرواپی‌اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) نشان داد که استفاده از این مهار کننده کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژها ایجاد کرده است بطوری که با افزایش غلظت مهار کننده درصد مهار فعالیت آنزیم بیشتر شد. همانطور که در نمودار ۳ مشخص شده است، درصد مهار فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهار کننده در گروه حاوی ماکروفاژ همراه مهار کننده نسبت به

میکرب کشی ماکروفاژها استفاده کردیم. مسیر پنتوز فسفات، مسیر متابولیسی اصلی تولید NADPH خارج میتوکندریایی در سلولها محسوب می شود و آنزیم اصلی در این مسیر که منجر به تولید NADPH می شود گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) می باشد بنابراین مهار G6PD منجر به کاهش شدید تولید NADPH در سلولها می شود (۲۲). در بررسی های قبلی، تاثیر نقص G6PD در افزایش استعداد ابتلا و نیز افزایش شدت بیماری های عفونی مختلف از جمله ریکتزیاها (۱۰)، پنومونی ناشی از آسیتوباکتر (۲۳)، عفونت توکسوپلاسما (۹) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری (۱۱) در بیماران مبتلا به نقص G6PD به اثبات رسیده است. همچنین ثابت شده است که لکوسیت های این افراد دارای اختلال در فرایند کشتن عوامل عفونی بوده اند و میزان تولید رادیکال های فعال اکسیژن و نیتروژن در آنها کمتر از سطح طبیعی بوده است (۲۹-۲۴). مطالعات مختلفی درباره مکانیسم های کشتن انگل لیشرمانیا توسط ماکروفاژها صورت گرفته است، اسرووی و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که کشتن انگل لیشرمانیا مازور توسط ماکروفاژهای فعال شده عمدتاً به تولید NO و تا حد کمتری به تولید رادیکال های فعال اکسیژن از جمله سوپراکسید وابسته است (۱۳).

در این تحقیق به منظور مهار فعالیت آنزیم G6PD از دی هیدروایپی اندروسترون (DHEA) استفاده کردیم که که از جمله موثرترین مهار کننده های مسیر پنتوز فسفات بوده و مهار کننده غیرقابلی آنزیم G6PD بوده و بررسی های مختلف نشان داده اند که تیمار سلولهای مختلف توسط این ماده منجر به کاهش چشمگیر میزان NADPH داخل سلولی شده است. همچنین این ماده در *in vivo* نیز قابل استفاده است و در نتیجه می توان با توجه به نتایج این تحقیق در بررسی های بعدی از آن در *in vivo* نیز استفاده کرد (۸-۶). بعد از تیمار سلولها با این ماده سلولها را از نظر تست MTT، میزان تولید نیتریک اکساید و میزان فعالیت آنزیم G6PD مورد بررسی قرار دادیم. بعد از تعیین دوز اپتیمم این مهار کننده با توجه به تست MTT و نیز تعیین میزان فعالیت آنزیم G6PD، از این دوز جهت بررسی مقاومت ماکروفاژهای آلوده به تکثیر آماستیگوت های انگل لیشرمانیا استفاده کردیم. با استفاده از

در ماکروفاژهای آلوده بعد از بررسی توسط میکروسکوپ تعیین شد و همانطور که در نمودار ۴ مشخص شده است، میانگین تعداد آماستیگوتها در ماکروفاژهای آلوده که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از مهار کننده دی هیدرو ایپی اندروسترون تیمار شده بودند با افزایش زمان از روز ۱ تا روز ۷ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$) به طوری که از روز چهارم اکثر ماکروفاژهای آلوده توسط انگل لیشرمانیا تخریب شدند. همچنین مشخص شد که هر چه غلظت مهار کننده بیشتر باشد میزان تکثیر انگلها در ماکروفاژهای آلوده شده در هر روز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری دارد ($P < 0.05$) که نشان دهنده کاهش فعالیت لیشرمانیا کشی ماکروفاژهای آلوده ای است که با مهار کننده تیمار شده اند.

ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c جدا شده و در محیط حاوی غلظت ۱۰۰ میکرومولار دی هیدرو ایپی اندروسترون و لیشرمانیا مازور کشت داده شدند. دیاگرام بالا میانگین (\pm انحراف معیار) تعداد آماستیگوت های انگل را در هر ماکروفاژ در مدت ۷ روز نشان می دهد ($P < 0.001, n = 4$).

بحث

امروزه بیماری لیشرمانیوز در کشور ما به عنوان یک پدیده مهم مورد توجه مراکز بهداشتی و درمانی کشور است. از آنجایی که ماکروفاژها سلول های اصلی مخزن انگل لیشرمانیا می باشند (۲۱)، بنابراین شناخت عوامل موثر بر افزایش و یا کاهش مقاومت این سلولها به این انگل می تواند ما را در یافتن راهکاری جدید برای جلوگیری از پیشرفت و گسترش و یا حتی درمان این بیماری یاری کند. از این رو در این تحقیق تلاش بر این بوده است که اثر کاهش فعالیت مسیر پنتوز فسفات (میزان تولید NADPH) به ویژه آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز را که آنزیم کنترل کننده این مسیر متابولیسی می باشد، در ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشرمانیا مازور بررسی نماید. با توجه به شیوع لیشرمانیوز و اهمیت تشخیص و درمان مناسب آن در مناطق آلوده، ما از انگل لیشرمانیا مازور به عنوان یک مدل برای بررسی اثرات مهار شدن فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در فعالیت

NADPH تولید شده و فعالیت آنزیم G6PD را کاهش می‌دهد و میزان مهار با افزایش غلظت مهار کننده‌ها بیشتر می‌شود. نتایج حاصل از بررسی تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا در ماکروفاژهای آلوده در طی ۷ روز نشان داد که با افزایش غلظت مهار کننده تعداد آماستیگوت‌های موجود در هر ماکروفاژ در طی روز یک تا روز هفتم نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و با افزایش غلظت مهار کننده DHEA نسبت مستقیم دارد.

نتیجه گیری

ما در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم که استفاده از مهار کننده دی‌هیدرواپی‌اندروسترون سبب مهار فعالیت آنزیم G6PD، کاهش غلظت نیتریک اکساید تولید شده، کاهش میزان زنده بودن ماکروفاژها و افزایش تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژها بطور معنی‌داری می‌شود. بنابراین، کاهش فعالیت G6PD در نتیجه نقص ژنتیکی یا بیماری و یا از طریق استفاده از مهار کننده‌ها منجر به کاهش تولید نیتریک اکساید و میزان زنده بودن ماکروفاژها می‌شود و از آنجاییکه تولید نیتریک اکساید مهمترین عامل موثر در کشتن انگل در ماکروفاژهای آلوده می‌باشد، میزان رشد و تکثیر آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا مازور افزایش می‌یابد. بنابراین توانایی لیشمانیاکشی ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا که با مهار کننده تیمار شده‌اند، کاهش می‌یابد.

References

1. Nathan CF, Gabay J. Antimicrobial mechanisms of macrophages. mononuclear phagocytes 1992; 12: 256-267.
2. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997; 15: 323-350.
3. کاکس م و، نلسون د. اصول بیوشیمی لنینجر. دکتر رضا محمدی؛ دوم؛ انتشارات آبیژ؛ ۱۳۸۲؛ صفحات ۶۶۹-۶۷۲.
4. Zamora R, Bult H, Herman AG. The role of prostaglandin E₂ and nitric oxide in cell death in

این مهار کننده مشاهده شد که میزان NADPH تولید شده، فعالیت آنزیم G6PD و میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c کاهش معنی‌داری داشت. بنابراین آزمایشات ما با تحقیقاتی که توسط محققین مختلف صورت گرفته تطبیق می‌کند. NADPH تولید شده، کوآنزیم مهم آنزیم‌های تولید کننده رادیکال‌های فعال اکسیژن و نیتروژن از جمله سوپراکسید و نیتریک اکساید در ماکروفاژها می‌باشد که در دفاع ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا نقش اصلی را ایفا می‌کنند (۱۷-۱۲). بنابراین اینطور انتظار می‌رود که با کاهش فعالیت آنزیم G6PD و در نتیجه کاهش میزان NADPH در سلول‌ها، مقاومت ماکروفاژها به انگل لیشمانیا کاهش یابد. نتایج حاصل از تست MTT با استفاده از مهار کننده DHEA بر روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c نشان دادند که با افزایش غلظت مهار کننده، درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها افزایش می‌یابد.

بطور کلی غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل و نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری از نظر درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها دارند و میزان مهار با افزایش غلظت مهار کننده از ۵۰ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار افزایش می‌یابد. ما برای بررسی غلظت نیتريت تولید شده در مایع رویی کشت ماکروفاژها از روش رنگ سنجی گریس استفاده کردیم. نتایج حاصل از سنجش غلظت نیتریک اکساید نشان دادند که بالاترین مقدار نیتريت تولید شده که شاخص تولید NO است در مجاورت اس- نیتروژو- استیل- پنیسیل آمید (SNAP) در گروه‌های سوم (ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + SNAP) و پنجم (ماکروفاژ + IFN- γ + SNAP) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد که علت آن می‌تواند موثر بودن دهنده NO در تولید آن در مقایسه با سایر عوامل محرک سلول باشد. همچنین مشخص شد که هر چه غلظت مهار کننده DHEA بیشتر باشد میزان تولید NO توسط ماکروفاژها بیشتر کاهش می‌یابد ولی انگل لیشمانیا به تنهایی قادر به افزایش معنی‌دار میزان تولید نیتريت در گروه‌های مختلف نمی‌باشد.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژها نشان داد که استفاده از این مهار کننده تا حد معنی‌داری غلظت

- J774 murine macrophages. *Euro J Pharmacol* 1998; 349: 307-315.
5. Matsubara S, Takayama T, Iwasaki R, Komatsu N, Matsubara D. Enzyme-cytochemically detectable glucose-6-phosphate dehydrogenase in human villous macrophages (Hofbauer cells). *Placenta* 2001; 22: 882-885.
6. Padgett DA, Loria RM. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstetriol. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 84: 61-68.
7. Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Research Reviews* 2004; 3: 171-187.
8. Biaglow J, Ayene I, Koch C, Donahue J, Stamato T, Tuttle S. G6PD deficient cells and the bioreduction of disulfides: Effects of DHEA, GSH depletion and phenylarsine oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 273: 846-852.
9. Tabbara KF, Sharara NA, Al-Momen AK. Toxoplasmosis in a group of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients. *Saudi Med J* 2001; 22: 330-332.
10. Walker DH, Hawkins HK, Hudson P. Fulminant Rocky Mountain spotted fever. Its pathologic characteristics associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107: 121-125.
11. Keenam JI, Peterson RA, Hampton MB. NADPH oxidase involvement in the pathology of *Helicobacter pylori* infection. *J Free Rad Bio Med* 2005; 38: 1188-1196.
12. Handman E, Bullen D. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology* 2002; 18: 332-334.
13. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, Odonnell C. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994; 24: 627-676.
14. WHO special programme for research & training in tropical diseases. work plan of the steering committee on vaccines for Leishmaniasis 1996.
15. Oliveria SH, Fonseca S, Romao PR. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Cell Immunol* 1997; 181: 68-75.
16. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure Fold Des* 2000; 8: 293-303.
17. Liang J, Yao G, Yang L, Hou Y. Dehydroepiandrosterone induces apoptosis of thymocyte through Fas/Fas-L pathway. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1467-1475.
18. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SMH, Sharidi I. Characterization of *Leishmania* isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. *Acta Tropica* 2000; 75: 301-7.
19. Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular

- growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- 20.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- 21.** Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Critic Rev Microbiol* 2002; 28: 187-248.
- 22.** Mac Micking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1993; 15: 323-350.
- 23.** Yang CH, Chen KJ, Wang CK. Community-acquired *Acinetobacter pneumonia*: a case report. *J Infect* 1997; 35: 316-318.
- 24.** Abu-Osba YK, Mallouh AA, Hann RW. Incidence and causes of sepsis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn infants. *J Pediatr* 1989; 114: 748-752.
- 25.** Siddiqui T, Khan AH. Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mil Med* 1998; 163: 434-435.
- 26.** Thakur A, Verma IC. Interaction of malarial infection and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trop Geogr Med* 1992; 44: 201-205.
- 27.** Heltzer ML, Sullivan KE. Unusual infections in a mother and son with G6PD and a defective oxidative burst. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 115: 85-91.
- 28.** Clark M, Root RK. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and infection: a study of hospitalized patients in Iran. *Yale J Biol Med* 1999; 52: 169-179.
- 29.** Vives JL, Pujades MA, Cardellach F, Rozman C, Carreras A. Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency associated with chronic hemolytic anemia, granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections: description of a new molecular variant (G6PD Barcelona). *Blood* 1982; 59: 428-434.
- 30.** Assreuy J, Cunha, FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, Odonnell C. production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994; 24: 627-676.