Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲ ، شماره ۳ ، پاییز ۱۳۸۶
صفحات: ۲۲۸ – ۲۱۹

نقش دی هیدرواپی اندروسترون بر تکثیر انگل لیشمانیاماژور درماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c

شهرزاد زمانی‌تقی‌زاده‌رابع* .MS.c ، احمد زواران‌حسینی✍ .Ph.D ،
سیدعلیرضا مصباح‌نمین .Ph.D**

چکیـــده

هدف: در این پژوهش ارتباط مهار آنزیم گلوکز۶- 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 غلظت‌های۵۰ و ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰ میکرو مولار از مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون تیمار شدند. بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون، درصد زنده بودن در ماکروفاژها با استفاده از تست MTT بررسی شد. همچنین بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون میزان کاهش فعالیت آنزیم گلوکز۶- فسفات دهیدروژناز(G6PD) تعیین شد. سپس ماکروفاژها را با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور آلوده کرده و میزان تولید نیتریک اکساید (NO) بعد از ۱۸ساعت 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 آنزیمG6PD 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<۰/۰۰۱) .

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، آنـزیم گلـوکز۶- فـسفات دهیـدروژناز، نیتریـک اکـساید، ماکروفاژهـای صفاقی موش BALB/c ، دی هیدرو اپی اندروسترون

دریافت مقاله: ۸۴/۶/۸، اصلاح مقاله: ۸۶/۹/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۰/۶

✍ نویسنده مسئول: استاد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ـایران
* کارشناس ارشد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
* * استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
آدرس پست الکترونیکی: zavarana@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماکروفاژها سلولهای ایمنی هستند که در دفاع علیه عوامل عفونی مختلف نقش مهمی ایفا می‌کنند. مکانیسم‌های میکرب‌کشی ماکروفاژها عمدتا شامل تولید رادیکال های 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 (۵-۳). در این تحقیق به منظور مهار فعالیت آنزیم G6PD از دی هیدرواپی اندروسترون (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 (۸-۶). همچنین در بررسی‌های قبلی مشخص شده است که در افرادی که دچار نقص در آنزیم G6PD می‌باشند، میزان ابتلا به عفونت‌های مختلف از جمله توکسوپلاسما، ریکتزیا و هلیکوباکتر پیلوری و نیز شدت بیماری حاصله افزایش می‌یابد (۱۱-۹). 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 (۱۷-۱۲).

روش بررسی

در این تحقیق از موشهای BALB/c ماده (۸-۹هفته‌ای) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده گردید. مهار کننده مورد استفاده دی هیدرواپی اندروسترون (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 (± 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 ازآماری غیرپارامتریک من- ویتنی 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 (۸-۹هفته‌ای) 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 ۱×۱۰^{۶} رسید و درصد زنده بودن آنها تعیین شد.

نحوه نمونه‌برداری و تکثیر انگل. از موشهای BALB/c آلوده به انگل لیشمانیاماژور 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 سانتی گراد قرار داده و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا ماژور بررسی شد. برای رشد بیشتر،

www.SID.ir

Archive of SID

ابتدا پروماستیگوتها به محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم جنین گاو (FCS) و بعد از رشد اولیه، به محیط حاوی RPMI 1640 ٪۲۰-۱۰ 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 ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰ میکرومولار) و در هر گروه بصورت سه تایی تیمار شدند (۶-۸). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ٪۵ قرار گرفت. بعد از این مدت درصد سایتوتوکسیسیتی سلولها توسط تست MTT تعیین شد. محلول حاوی MTT (3-(4,5-tetrazolium-2-yl)-2,5diphenil tetrazolium bromide) با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۴ساعت 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 نیتریک اکساید (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 نیتریک اکساید است، همراه با انگل لیشمانیا ماژور، اس- نیتروزو- استیل- پنیسیل 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 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 نیتریت 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 ۱۰دقیقه 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 ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰ میکرو مولار) 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 ۰۵ /۰ 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

www.SID.ir

Archive of SID

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).

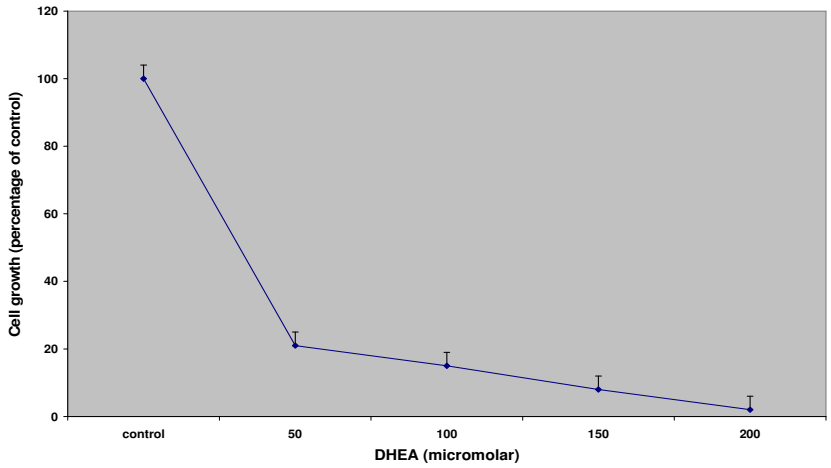
شمارش تعداد آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در ماکروفاژها. ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c همراه با محیط کشت RPMI 1640 حاوی FBS ۱۰٪ غیر فعال شده با حرارت، به داخل پلیت‌های ۱۶خانه‌ای ریخته شدند. بعد از ۳-۲ ساعت محیط رویی کشت دور ریخته شده و محیط حاوی انگل‌های لیشمانیا ماژور به نسبت ۲۰:۱ (آماستیگوت به ماکروفاژ) 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 سانتی گراد و حضور CO2 ۵٪ انکوبه شد. از روز ۱تا 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 ×۱۰۰ 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.

آزمون های آماری. نتایج حاصل از تستها با استفاده از نرم افزارSPSS و رو شهای آنالیز آماری غیر پارامتریک Mann-Witney و ANOVA 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 برروی ماکروفاژهایی که با غلظت‌های مختلف مهار کننده دی هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰و ۱۵۰و 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<۰/۰۰۱). همچنین بین میزان سایتوتوکسیسیتی ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف از مهار کننده با هم نیز تفاوت قابل توجهی (P<۰/۰۰۱) وجود داشته است.

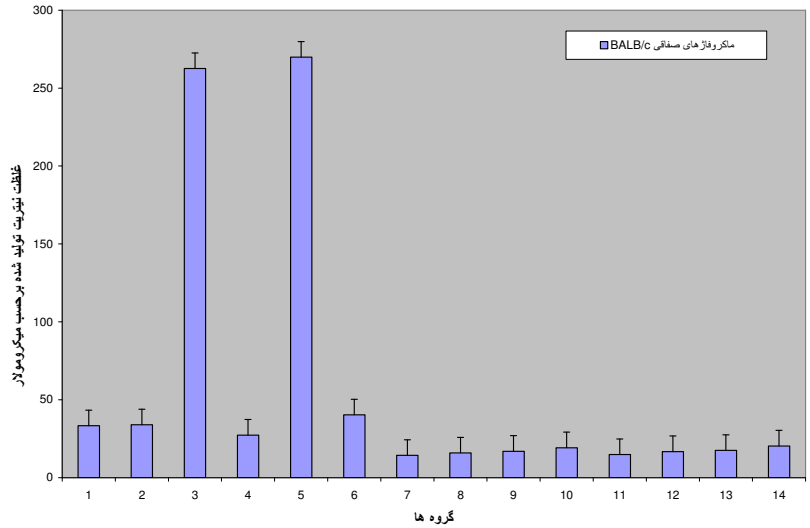
نتایج حاصل از سنجش غلظت نیتریک اکساید (NO). نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهار کننده دی‌هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰ میکرو مولار) بعد از ۱۸ ساعت که در نمودار ۲ آمده است، نشان داد که تیمار ماکروفاژها با این مهار کننده میزان تولید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



نمودار۱. تاثیر DHEA بر مهار رشد سلولی.

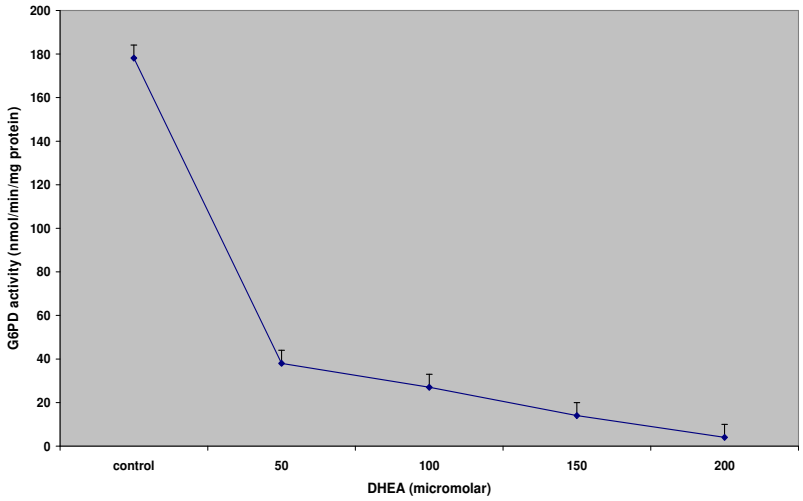
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲. میزان تولید نیتریت (بر حسب میکرومولار) توسط ماکروفاژها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون با غلظت های مختلف مهار کننده آنزیم G6PD (دی هیدرو اپی اندروسترون).

گروه ۱، ماکروفاژ؛ گروه ۲، ماکروفـاژ + انگـل لیـشمانیا؛ گـروه ۳، ماکروفاژ + انگل لیـشمانیا مـاژور+ SNAP؛ گـروه ۴، ماکروفـاژ+ انگل لیشمانیا مـاژور+ NMMA؛ گـروه ۵، ماکروفـاژ+SNAP + IFN-γ؛ گروه ۶، ماکروفاژ + LPS + IFN-γ ؛ گروه ۷، ماکروفـاژ + DHEA بـا غلظـت ۲۰۰ میکـرو مـولار؛ گـروه ۸، ماکروفـاژ+ DHEA با غلظت ۱۵۰ میکرو مولار؛ گروه ۹، ماکروفاژ+ DHEA با غلظـت ۱۰۰ میکـرو مـولار؛ گـروه ۱۰، ماکروفـاژ+ DHEA بـا غلظت ۵۰ میکرو مـولار؛ گـروه ۱۱، ماکروفـاژ+ انگـل لیـشمانیا + DHEA با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار ؛ گروه ۱۲، ماکروفاژ + انگـل لیـشمانیا + DHEA بـا غلظـت ۱۵۰ میکـرو مـولار؛ گـروه ۱۳، ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + DHEA با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار ؛ گروه ۱۴، ماکروفاژ + انگـل لیـشمانیا + DHEA بـا غلظـت ۵۰ میکرو مولار ($n = 4$ ، داده‌ها به صورت میانگین ± انحـراف معیـار نشان داده شده‌اند، $P<0/001$).



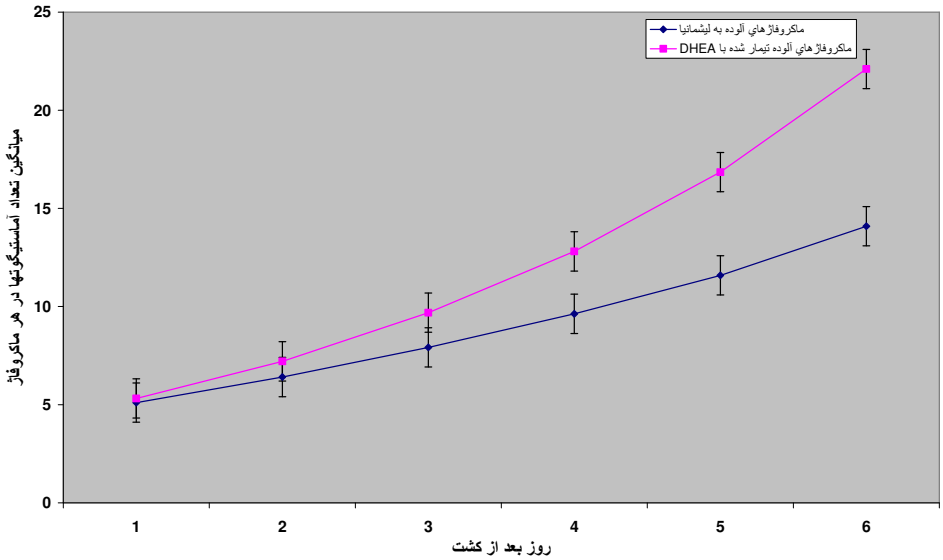
نمودار۳. تاثیر غلظتهای مختلف DHEA بر فعالیت آنزیم گلوکز-٦-فسفات دهیدروژناز (G6PD).

www.SID.ir

Archive of SID

ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c به مدت ۲۴ ساعت با غلظتهای۵۰ 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 (n = 4 ، p<۰/۰۰۱).

میزان NO تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف از مهار کننده، کاهش قابل توجهی نسبت به ماکروفاژهای گروه کنترل (P<۰/۰۰۱) داشت. همچنین بین میزان NO تولید شده توسط گروه‌های مختلف با یکدیگر نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). 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<۰/۰۵). بنابراین انگل لیشمانیاماژور به تنهایی نتوانست میزان تولید نیتریک‌اکساید را تا حد معنی‌داری افزایش دهد.



نمودار٤. اثر مهار فعالیت آنزیم G6PD بر تکثیر آماستیگوت‌های لیشمانیاماژور در ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا در طی ۷روز (از روز۱ تا ۷).

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 دی هیدرو اپی اندروسترون (۵۰ و ۱۰۰و ۱۵۰و 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 غلظت‌های مختلف مهار کننده در همان گروه با یکدیگر و نیز نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) داشت. اما استفاده از انگل لیشمانیا ماژور منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژهای آلوده نشد (P>۰/۰۵).

فعالیت G6PD در عصاره سلولی حاصل از ماکروفاژهای انکوبه شده با غلظتهای مختلف DHEA سنجیده شد (n = 4 ، داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده‌اند (P<۰۰۱/۰).

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

www.SID.ir

Archive of SID

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 اپی اندروسترون تیمار شده بودند با افزایش زمان از روز ۱ تا روز ۷ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) به طوری که از روز چهارم اکثر ماکروفاژهای آلوده توسط انگل لیشمانیا 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 معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵) که نشان دهنده کاهش فعالیت لیشمانیا کشی ماکروفاژهای آلوده‌ای است که با مهار کننده تیمار شده‌اند.

ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c جدا شده و در محیط حاوی غلظت ۱۰۰ میکرومولار دی هیدرو اپی اندروسترون و لیشمانیاماژور کشت داده شدند. دیاگرام بالا میانگین (± انحراف معیار) تعداد آماستیگوتهای انگل را در هر ماکروفاژ در مدت ۷ روز نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱، n = 4) .

بحث

امروزه بیماری لیشمانیوز در کشور ما به عنوان یک پدیده مهم مورد توجه مراکز بهداشتی و درمانی کشور است. از آنجایی که ماکروفاژها سلول‌های اصلی مخزن انگل لیشمانیا می‌باشند (۲۱)، بنابراین شناخت عوامل موثر بر افزایش و یا کاهش مقاومت این سلولها به این انگل می‌تواند 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 متابولیکی می‌باشد، در ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیاماژور بررسی نماید. با توجه به شیوع لیشمانیوز و اهمیت تشخیص و درمان مناسب آن در مناطق آلوده، ما از انگل لیشمانیاماژور به عنوان یک مدل برای بررسی اثرات مهار شدن فعالیت آنزیم گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز در فعالیت میکرب‌کشی ماکروفاژها استفاده کردیم. مسیر پنتوز فسفات، مسیر متابولیکی اصلی تولید NADPH خارج میتوکندریایی در سلولها محسوب می‌شود و آنزیم اصلی در این مسیر که منجر به تولید NADPH می‌شود گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) می‌باشد بنابراین مهار G6PD منجر به کاهش شدید تولید NADPH در سلولها می‌شود (۲۲). در بررسی‌های قبلی، تاثیر نقص G6PD در افزایش استعداد ابتلا و نیز افزایش شدت بیماری‌های عفونی مختلف ازجمله ریکتزیاها (۱۰)، پنومونی ناشی از آسینتوباکتر (۲۳)، عفونت توکسوپلاسما (۹) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری (۱۱) در بیماران مبتلا به نقص G6PD به اثبات رسیده است. همچنین ثابت شده است که لکوسیت‌های این افراد دارای اختلال در فرایند کشتن عوامل عفونی بوده‌اند و میزان تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در آنها کمتر از سطح طبیعی بوده است (۲۹-۲۴). مطالعات مختلفی درباره مکانیسم‌های کشتن انگل لیشمانیا توسط ماکروفاژها صورت گرفته است، اسروی و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که کشتن انگل لیشمانیاماژور توسط ماکروفاژهای فعال شده عمدتا به تولید NO و تا حد کمتری به تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن از جمله سوپراکسید وابسته است (۱۳).

در این تحقیق به منظور مهار فعالیت آنزیم G6PD از دی هیدرواپی اندروسترون (DHEA) استفاده کردیم که که از جمله موثرترین مهار کننده‌های مسیر پنتوز فسفات بوده و 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 شده است. 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 (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 آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا استفاده کردیم. با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

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 می رود 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 مهارکننده DHEA بر روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c نشان دادند که با افزایش غلظت مهارکننده، درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها افزایش می‌یابد.

بطور کلی غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل و نیز با یکدیگر تفاوت معنی داری از نظر درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها دارند و میزان مهار با افزایش غلظت مهار کننده از۵۰ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار افزایش می یابد. ما برای بررسی غلظت نیتریت 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 نیتریت تولید شده که شاخص تولید NO است در مجاورت اس- نیتروزو- استیل- پنیسیل آمید (SNAP) در گروه های سوم (ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + SNAP) و پنجم (ماکروفاژ + IFN-γ + SNAP) در مقایسه با گروه کنترل می باشد که علت آن می تواند 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 می یابد ولی انگل لیشمانیا به تنهایی قادر به افزایش معنی دار میزان تولید نیتریت در گروه های مختلف نمی باشد.

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

نتیجه‌گیری

ما در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم که استفاده از مهار کننده دی هیدرواپی اندروسترون 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 لیشمانیاماژور افزایش می‌یابد. بنابراین توانایی لیشمانیاکشی ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا که با مهار کننده تیمار شده‌اند، کاهش می‌یابد.

References

1. Nathan CF, Gabay J. Antimicrobicidal 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.

۳. کاکس م و، نلسون د. اصول بیوشیمی لنینجر. دکتر رضا محمدی؛ دوم؛ انتشارات آییژ؛ ۱۳۸۲: صفحات ۶۶۹-۶۷۲.

4. Zamora R, Bult H, Herman AG. The role of prostaglandin E_2 and nitric oxide in cell death in

www.SID.ir

Archive of SID

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 androstenetriol. 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. Toxoplasmasis 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 dehydrogenas 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 indection: 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 ncreased 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.

www.SID.ir