

بررسی تأثیر ایمونودولاتوری غلظت‌های مختلف عصاره پلی ساکارییدی قارچ گانودرما لوسیدوم بر عملکرد ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c

شهرزاد زمانی تقی زاده^۱، دکتر احمد زواران حسینی^۲، زهیر محمد حسن^۳، سمیه شاهرخی^۴، محمد شفیع جدیدی^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس (مؤلف مسئول) zamani_imnl@yahoo.com

۲- استاد گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشجوی PhD، گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- دانش آموخته کارشناس ارشد ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

زمینه و هدف: قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) به عنوان یک ایمونودولاتور طبیعی مطرح شده است. هنوز بطور دقیق مشخص نشده است که چه ترکیبی از این عصاره مسئول اثرات ایمونودولاتوری آن می‌باشد ولی به نظر می‌رسد که گیرنده ۳ کمپلمان (CR3) سطح سلولهای مچری سیستم ایمنی به عنوان پذیرنده بتا گلوکانها (β -glucan) که ترکیب اصلی این عصاره را تشکیل می‌دهد، عمل می‌نماید. از آنجایی که فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) در تنظیم عملکردهای ماکروفاژها از جمله تولید نیتریک اکساید نقش مهمی ایفا می‌کند، ما تأثیر این عصاره را بر *viability*، فعالیت آنزیم G6PD و تولید نیتریک اکساید (NO) در ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c تیمار شده بررسی کردیم.

روش بررسی: ابتدا ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c جدا شده و با غلظتهای (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml) از عصاره پلی ساکارییدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) تیمار شدند و درصد زنده بودن ماکروفاژها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از تست MTT بررسی شد و دوز مؤثر 0.1 μ g/ml تعیین گردید. برای تعیین فعالیت ویژه آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) ماکروفاژها به مدت ۲۴ ساعت با دوز 0.1 μ g/ml از GL-PS انکوبه شدند سپس ماکروفاژها را توسط سونیکاسیون لیز کرده و فعالیت ویژه آنزیم G6PD با سنجش تغییر جذب NADPH در طول موج 339 nm و تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد در عصاره رویی سلولی بدست آمد. همچنین بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون، میزان تولید نیتریک اکساید (NO) با استفاده از روش رنگ سنجی گریس سنجیده شد.

یافته‌ها: بر طبق نتایج حاصله دوز ۱/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره پلی ساکارییدی گانودرما لوسیدوم در مقایسه با سایر دوزها، بیشترین تأثیر را روی درصد زنده بودن (ضریب تحریک) ماکروفاژهای صفاقی داشت ($p < 0.05$). همچنین مشخص شد که دوز ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر GL-PS منجر به افزایش تولید NO و افزایش فعالیت ویژه آنزیم G6PD می‌شود ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: قارچ گانودرما لوسیدوم، به عنوان یک قارچ دارویی، در کشورهای آسیای شرقی بویژه در چین بطور گسترده‌ای جهت افزایش کیفیت زندگی و طول عمر مصرف می‌شود. ما بعد از انجام این تحقیق نتیجه گرفتیم که عصاره GL-PS اثر ایمونودولاتوری بر فعالیت ماکروفاژها دارد. بنابر این می‌توان از عصاره پلی ساکارییدی این قارچ به عنوان یک عامل تقویت‌کننده سیستم فاگوسیتی در برابر عوامل عفونی و پاتوژنهایی چون انگل لیشمانیا استفاده کرد که تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها در برابر آنها نقش مهمی در دفاع علیه آنها دارد.

کلید واژه‌ها: عصاره پلی ساکاریدی گانودرما لوسیدوم، آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز، نیتریک اکساید، تست MTT
 وصول مقاله: ۸۴/۱۱/۲۹ اصلاح نهایی: ۸۵/۷/۲۹ پذیرش مقاله: ۸۵/۹/۳۰

مقدمه

قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) جزو بازیدیومیست‌ها بوده و متعلق به زیر گونه گانودرماتاسه گونه آفیلوفورالها است (۱). عصاره آبی پلی ساکاریدی آن بطور وسیعی در کشورهای آسیای شرقی به ویژه چین در طب سنتی برای پیشگیری از بیماری‌های مختلف از جمله فشار خون بالا، برونشیت، آرتروز، نفریت، زخم معده، بیماری تومورژنیک و اسکرودرما استفاده می‌شود (۷-۱). گانودرما لوسیدوم اثراتی چون فیروتیک، کاهش کلسترول و کاهش قند خون نیز دارد (۸-۱۰). اپی توپ کربوهیدراتی اصلی که مسئول فعالیت ضد توموری آن است و نیز گیرنده سطح سلولی برای آن هنوز کاملاً مشخص نشده است، با این حال، نشان داده شده است که گیرنده CR3 (گیرنده کمپلمان ۳) از طریق زنجیره‌های جانی نامشخصی به β -گلوکان پلی ساکاریدها متصل می‌شود (۱۱). بنظر می‌رسد که گانودرما لوسیدوم بسیار بی‌خطر باشد زیرا تجویز خوراکی عصاره آن هیچ اثر سمی نشان نداده است (۱۲،۱۳). 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^۱ (NO) می‌باشد ولی بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که تولید نیتریک اکساید مهمترین مکانیسم لیشمانیا کشی ماکروفاژهای آلوده می‌باشد (۱۴،۱۵). مسیر متابولیکی پنتوز فسفات که در اکثر سلولها وجود دارد، مهمترین منبع تولیدکننده NADPH در داخل سلولها می‌باشد. NADPH تولید شده کوآنزیم فعالیت بسیاری از آنزیم‌های مهم از جمله کمپلکس آنزیمی نیتریک اکساید سنتاز^۲ (NOS) در داخل ماکروفاژها است (۱۶،۱۷). آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز^۳ (G6PD) آنزیم محدودکننده سرعت و مهمترین آنزیم این مسیر متابولیکی بوده و در مطالعات پژوهشی مختلف نشان داده شده که مهار این آنزیم منجر به کاهش شدید میزان NADPH داخل سلولی و نیز کاهش میزان تولید نیتریک اکساید می‌شود (۱۸،۱۹). همچنین در بررسی‌های قبلی مشخص شده که در افرادی که دچار نقص در آنزیم G6PD می‌باشند میزان ابتلا به عفونتهای مختلف از جمله توکسوپلازما، ریکتزیا و هلیکوباکترپیلوری و نیز شدت بیماری حاصله افزایش می‌یابد (۲۰-۲۲). در این مطالعه اثر ایمنومدولاتوری عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم بر درصد زنده بودن،

1. nitric oxide
 2. nitric oxide synthase
 3. glucose-6-phosphate dehydrogenase

سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفت. بعد از این مدت درصد زنده بودن (ضریب تحریک) ماکروفاژها توسط تست MTT تعیین شد. محلول حاوی MTT^۴ با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به تمام چاهک‌ها اضافه شد و کاملاً مخلوط شد تا تمام بلورهای آبی تشکیل شده حل شوند سپس جذب نوری گروه‌های تست (ماکروفاژهای تیمار شده) و کنترل (ماکروفاژهای تیمار نشده) توسط دستگاه Multiscan MS ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و به صورت ضریب تحریک گزارش گردید. اندکس تحریک^۵ برای گروه تیمار شده با مواد فعال کننده و درصد سایتوتوکسیسیته برای گروه تیمار شده از فرمولهای زیر محاسبه شد:

$$SI = \frac{\text{جذب سلولهای تحریک شده}}{\text{جذب سلولهای تحریک نشده}} \quad (1, 2, 3, 4, 5)$$

۳- سنجش غلظت نیتریک اکساید (NO) برای انجام این تست ماکروفاژها با غلظت مؤثر 0.1 µg/ml از عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) تیمار شدند. از ماکروفاژهای تیمار شده با SNAP^۶ تقویت‌کننده مسیر تولید نیتریک

فعالیت ویژه آنزیم G6PD و تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای موش BALB/c بررسی شد.

روش بررسی

۱- 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 سی سی RPMI حاوی FCS، ۱۰٪ به حالت سوسپانسیون درآورده شد سپس ماکروفاژها شمارش شده و به تعداد ۱×۱۰^۶ رسیده، درصد زنده بودن آنها تعیین شده و در تستهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی تستها به صورت سه تایی (n=3) انجام شده و حداقل سه بار تکرار شدند.

۲- تست MTT

در اوایل دهه ۱۹۸۰ موسمان به توضیح این روش پرداخت (۲۳). در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی بدست آمده از صفاق موش اضافه شده و ماکروفاژها در گروه‌های مجزا با غلظتهای مختلف (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml) از عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) تیمار شدند.

4. 4,5-tetrazolium-2-yl)-2,5diphenil tetrazolium bromide
5. Stimulation Index
6. S-Nitroso-Asethyl-Penicillamide

این مدت ماکروفاژها از ته پلیت جدا شده و فعالیت آنزیم G6PD در عصاره سلولی ماکروفاژهای لیز شده تعیین شد. بدین منظور، ماکروفاژهای صفاقی جدا شده از ته هر چاهک سانتیفوژ شده (g ۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد) سپس در PBS به حالت سوسپانسیون درآمده 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 سانتیگراد سانتیفوژ شده و تا زمان سنجش، روی یخ نگهداری شد. ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره سلولی با ۷۵/۰ میلی‌لیتر از بافر تریس- اسید کلریدریک ۵ مولار حاوی MgCl₂ ۳ میلی مولار (pH ۷/۸)، ۲۵ میکرو لیتر از گلوکز-۶- فسفات ۷/۴ میکرومولار و NADPH ۸/۷ میکرومولار مخلوط شده و افزایش جذب NADPH بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد در طول موج ۳۳۹ نانومتر قرائت شد. همچنین غلظت پروتئین سلولی در ۵۰ میکرو لیتر از عصاره سلولی ماکروفاژها به روش برادفورد تعیین شد و فعالیت ویژه آنزیم بدست آمد (۲۴). نتایج حاصل از تستها با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز آماری ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

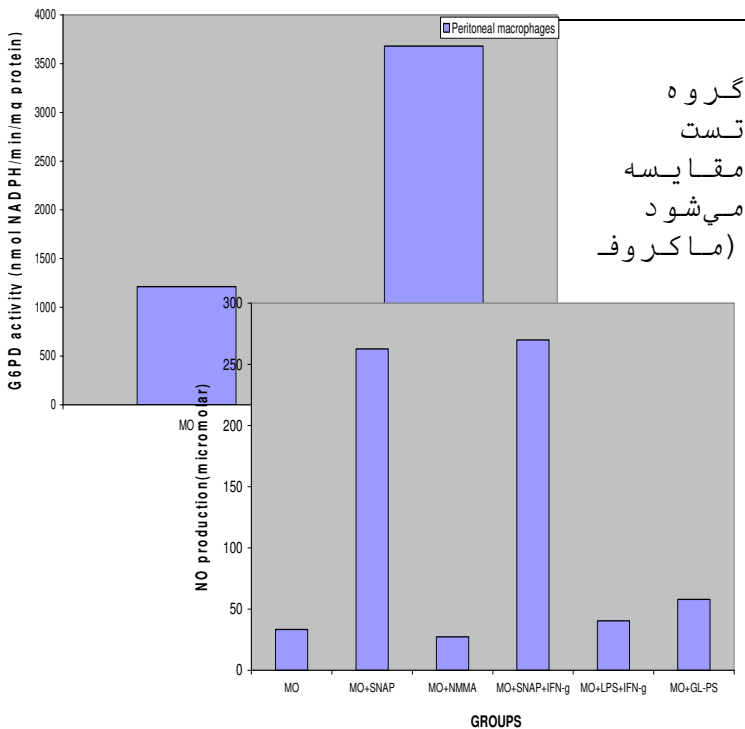
۱- نتایج حاصل از انجام تست MTT همانطور که در جدول ۱ مشخص شده است، نتایج حاصل از انجام تست MTT بر روی ماکروفاژهایی

اکساید) IFN- γ + و IFN- γ + LPS^۷ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد زیرا نشان داده شده است که این مواد تولید NO توسط ماکروفاژها را تحریک می‌کنند. از ماکروفاژهای تیمار شده با NMMA^۹ نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد زیرا این ماده مهارکننده تولید NO می‌باشد. میزان تجمع NO₂ به عنوان شاخص میزان تولید NO در مایع رویی سلولهای کشت داده شده، توسط روش رنگ سنجی گریس^{۱۰} و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین شد. ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی ماکروفاژهای کشت داده شده با ۵۰ میکرو لیتر از محلول حاوی [نفتیل] اتیلن آمید دی هیدروکلراید (۱/۰ 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.

۴- تعیین فعالیت آنزیم G6PD

برای سنجش فعالیت ویژه آنزیم G6PD (فعالیت ویژه برحسب U/mg) ماکروفاژهای صفاقی موش را به تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت مؤثر 0.1 $\mu\text{g/ml}$ از عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم تیمار شدند. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و CO₂، ۵٪ قرار گرفت. بعد از

7. lipopolysaccharide
8. interferon- γ
9. N-Methyl-L-Arginine
10. Griess method

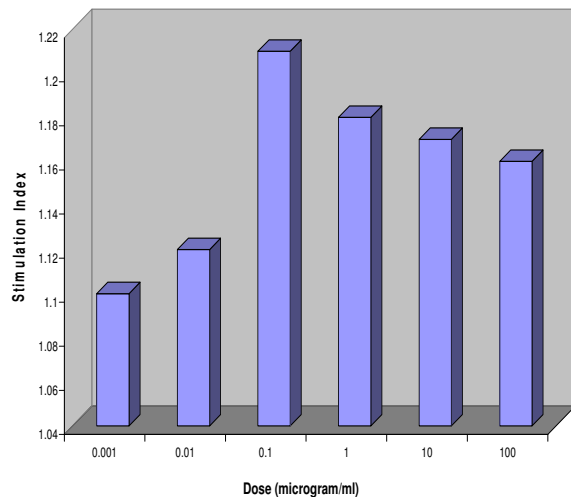


گروه تست مقایسه می‌شود (ماکروف)

که با غلظتهای مختلف (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml) ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) تیمار شدند نشان داد که تمام این دوزها درصد زنده بودن (ضریب تحریک) ماکروفاژها را افزایش معنی‌داری داده‌اند. (p<0/05). ولی دوز 0.1 µg/ml عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) بیشترین تأثیر را داشت (p<0/05) (نمودار ۱).

اثرهای تیمار نشده به تنهایی افزایش می‌دهد (p<0/05) (نمودار ۲).

نمودار ۲: میزان تولید نیتریت (بر حسب میکرومولار) توسط ماکروفاژها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون با تیمار ماکروفاژها با دوز 0.1 µg/ml از GL-PS



نمودار ۱: نتایج حاصل از انجام تست MTT بر ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c بعد از ۲۴ ساعت تیمار با دوز 0.1 µg/ml از GL-PS

MO، ماکروفاژ؛ MO+SNAP، ماکروفاژ+SNAP؛ MO+NMMA، ماکروفاژ+NMMA؛ MO+SNAP+IFN-g، ماکروفاژ+SNAP+IFN-g؛ MO+LPS+IFN-g، ماکروفاژ+LPS+IFN-g؛ MO+GL-PS، ماکروفاژ+GL-PS. دوز 0.1 µg/ml از GL-PS.

۲- نتایج حاصل از سنجش غلظت نیتریک اکساید (NO) نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با دوز 0.1 µg/ml عصاره پلی‌ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم (GL-PS) بعد از ۱۸ ساعت که در جدول ۱ آمده است، نشان داد که تیمار ماکروفاژها با این عصاره میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها را بطور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل که در آنالیز آماری با

۳- نتایج حاصل از تعیین فعالیت آنزیم G6PD سنجش فعالیت آنزیم G6PD در عصاره حاصل از لیز ماکروفاژهای تیمار شده با دوز 0.1 µg/ml عصاره پلی ساکاریدی قارچ گانودرما لوسیدوم نشان داد که استفاده از این عصاره افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژها تیمار شده نسبت

تولید نیتریک اکساید (NO) می‌باشد. مسیر متابولیکی پنتوز فسفات که در اکثر سلولها وجود دارد مهمترین منبع تولیدکننده NADPH خارج میتوکندریایی در داخل سلولها محسوب می‌شود. NADPH تولید شده کوآنزیم فعالیت بسیاری از آنزیمهای مهم از جمله کمپلکس آنزیمی نیتریک اکساید سنتاز (NOS) در داخل ماکروفها است. آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) آنزیم محدودکننده سرعت و مهمترین آنزیم این مسیر متابولیکی بوده و در بررسی‌های مختلف نشان داده شده که مهار این آنزیم منجر به کاهش شدید میزان NADPH داخل سلولی شده و افزایش فعالیت آنزیم G6PD منجر به افزایش تولید NADPH در سلولها می‌شود (۱۹-۱۶). در این تحقیق تلاش بر این بوده تا اثر افزایش فعالیت مسیر پنتوز فسفات (میزان تولید NADPH) به ویژه آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز را که آنزیم کنترل‌کننده این مسیر متابولیکی می‌باشد، در تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفها بررسی نماید. در بررسی‌های قبلی، تأثیر نقص G6PD در افزایش استعداد ابتلا و نیز افزایش شدت بیماری‌های عفونی مختلف از جمله ریکتزیاها (۲۹)، پنومونی ناشی از آسینتوباکتر (۳۰)، عفونت توکسوپلازما (۳۱) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری (۳۲) در بیماران به اثبات رسیده است. همچنین ثابت شده است که لکوسیت‌های این افراد دارای اختلال در فرایند کشتن عوامل عفونی بوده و میزان تولید رادیکالهای فعال اکسیژن

به گروه کنترل ایجاد کرده است ($p < 0.05$) (نمودار ۳).

نمودار ۳: فعالیت آنزیم G6PD (فعالیت ویژه) در ماکروفهای صفاقی موش BALB/c تیمار شده با دوز 0.1 µg/ml از MO .GL-PS، ماکروفهاژ: MO+GL-PS، ماکروفهاژ+ دوز 0.1 µg/ml از GL-PS

بحث

گانودرما لوسیدوم نوعی قارچ است که بطور وسیعی به عنوان یک قارچ دارویی، در کشورهای شرقی مختلف بویژه در چین بطور گسترده‌ای جهت افزایش کیفیت زندگی و طول عمر مصرف می‌شود. بررسی‌های متعددی نشان داده‌اند که میسلیومهای کشت داده شده و اسپوره‌های گانودرما لوسیدوم در درمان هپاتوپاتی و نئوپلازی بسیار مؤثر است. یکی از دلایلی که این قارچ مورد توجه دانشمندان قرار گرفته این است که پلی‌ساکاریدهای آن اثرات ضد توموری دارند (۲۶، ۲۵). شواهد متعددی نشان داده‌اند که $D-\beta$ گلوکان بدست آمده از این قارچ دارویی می‌تواند پاسخهای بیولوژیکی را از طریق اتصال به گیرنده غشایی نوع ۳ کمپلمان (CR3)، اینترگرین aMb2 یا CD11b/CD18 روی سلولهای ایمنی کارگزار القا کند. کشف گیرنده اختصاصی که این ترکیبات از طریق آنها اثرات خود را اعمال می‌کنند دیدگاه‌های جدیدی را برای تحقیقات آتی گشوده است (۲۸، ۲۷). ماکروفهاژها سلولهای ایمنی هستند که در دفاع علیه عوامل عفونی مختلف نقش مهمی ایفا می‌کنند. مکانیسم‌های میکربکشی ماکروفهاژها عمدتاً شامل تولید رادیکالهای فعال اکسیژن و

ماکروفازهای آلوده علیه پاتوژنها نقش مهمی ایفا می‌کنند با افزایش فعالیت آنزیم G6PD و در نتیجه افزایش میزان NADPH و افزایش تولید نیتریک اکساید، دفاع ماکروفازها علیه پاتوژنها افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که عصاره GL-PS خصوصیات ایمنومدولاتوری قوی دارد و تولید نیتریک اکساید و در نتیجه فعالیت میکربکشی ماکروفازها را تحریک می‌کند. این یافته با بسیاری از اثرات درمانی آن تطابق دارد. در اغلب بررسی‌ها، گزارش شده است که GL-PS می‌تواند پاسخ ایمنی محافظتی قوی را در مقابل پیشرفت بیماری القا کند. تحقیقات بیشتری برای بررسی تأثیر GL-PS بر الگوی تولید سایتوکاین، زیر گروه‌های لنفوسیتی و انتقال سیگنال داخل سلولی لازم است تا مکانیسم دقیق عملکرد این قارچ دارویی مشخص شود. تحقیق ما نشان می‌دهد که استفاده از این قارچ دارویی می‌تواند برای پروفیلاکسی و درمان بیماری در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی بسیار مفید باشد.

و نیترژن در آنها کمتر از سطح طبیعی می‌باشد (۳۳-۳۶). ما در این تحقیق بعد از تیمار ماکروفازها، اثر این عصاره را توسط تست MTT، میزان تولید نیتریک اکساید و میزان فعالیت آنزیم G6PD مورد بررسی قرار دادیم. در این بررسی اثر تحریکی غلظتهای مختلف GL-PS (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml) را بر ماکروفازها که جزو سلولهای کارگزار سیستم ایمنی هستند توسط تست MTT در *in vitro* بررسی کردیم. همانطور که نتایج حاصل از انجام تست MTT نشان دادند، تمام غلظتهای استفاده شده از GL-PS تا حد قابل توجهی سبب افزایش درصد زنده بودن و فعالیت (ضریب تحریک) ماکروفازهای صفاقی موش BALB/c می‌شوند و غلظت 0.1 µg/ml از GL-PS (دوز مؤثر) بیشترین اثر را دارد. با بررسی غلظت 0.1 µg/ml از GL-PS بر ماکروفازهای تیمار شده مشخص شد که این دوز سبب افزایش تولید NADPH، افزایش فعالیت آنزیم G6PD و افزایش تولید نیتریک اکساید در ماکروفازهای صفاقی می‌شوند. بنابراین با توجه به اینکه NADPH تولید شده، کوآنزیم مهم آنزیم‌های فعال اکسیژن و نیترژن از جمله سوپراکساید و نیتریک اکساید در ماکروفازها می‌باشد که در

References

1. Yang FC, Ke YF, Kuo SS. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by ganoderma lucidum in shake flask cultures. *Enzyme Microbe Technol* 2000; 27: 295-301.
2. Su CY, Shiao MS, Wang CT (2000). Potentiation of ganodermic acid S on prostaglandin E1-induced cyclic AMP elevation in human platelets. *Thromb Res* 2000; 99: 135-145.

3. El-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N and et al. Anti HIV 1 and anti HIV 1 protease substances from ganoderma lucidum. *Phytochemistry* 1998; 49: 1651-1657.
4. Arisawa M, Fujica A, Saga M, Fukumura H, Hayashi T, Shimizu M and et al. Three new lanostanoids from ganoderma lucidum. *J Nat Prod* 1986; 49: 621-625.
5. Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 65-96.
6. Kim YS, Eo SK, Oh KW, Lee CK, Han SS. Antiherpetic activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from ganoderma lucidum alone and in combinations with interferons. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 451-458.
7. Yen GC, Wu JY. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from ganoderma tsugae. *Food Chem* 1999; 65: 375-379.
8. Park EJ, Ko G, Kim J, Sohn DH. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from ganoderma lucidum, glycyrrhizin, and pentoxifylline rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 417-20.
9. Berger A, Rein D, Kratky E, Monnard I, Hajjaj H, Meirim I, et al. Cholesterol-lowering properties of ganoderma lucidum in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs. *Lipids in Health and Disease* 2004; 3: 1-12.
10. Hui-na Z, Zhi-bin L. Hypoglycemic effect of ganoderma lucidum polysaccharides. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 191-195.
11. Yuan Yuan W, Kay Hooi K, Shui Tein Ch, Chun-Cheng L, Chi-Huey W, Chun-Hung L. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Medi Chem* 2002; 10: 1057-1062.
12. Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharide isolated from ganoderma lucidum. *J Ethnopharmacol* 1999; 68:175-181.
13. Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from ganoderma lucidum. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 129-136.
14. Nathan CF, Gabay J. Antimicrobial mechanisms of macrophages. *Mononuclear Phagocytes* 1992; 12: 256-267.
15. 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.
۱۶. کاکس م و نلسون د. اصول بیوشیمی لنینجر. دکتر رضا محمدی، جلد دوم، انتشارات آبیژ، ۱۳۸۲، صفحات: ۶۶۹-۶۷۲.
17. Cheng M, Ho H (2000). Cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) status modulates the effect of nitric oxide (NO) on human macrophages. *FEBS Letter* 2000; 475: 257-262.
18. Padgett DA, Loria RM. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androsterone, and androstenetriol. *Journal of neuroimmunology* 1998; 84(1): 61-68.
19. Walker DL, Reid JM, Svingen PA, Rios R, Covey JM, Alley MC. Murine pharmacokinetics of 6-aminonicotinamide a novel biochemical modulating agent. *Biochemical and Pharmacological Journal* 1999; 58: 1057-1066.
20. Tabbara KF, Sharara NA, Al-Momen AK (2001). Toxoplasmosis in a group of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients. *Saudi Med J* 2001; 22: 330-332.
21. 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.
22. Keenam JI, Peterson RA, Hampton MB. NADPH oxidase involvement in the pathology of helicobacter pylori infection. *J Free Rad Bio Med* 2004; 25: 5-9.

23. Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
24. Titez M. Textbook of clinical biochemistry. 3rd ed. Philadelphia press. Saunders W.B. Comp. 1999. p. 93-99.
25. Yang FC, Ke YF, Kuo SS. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by ganoderma lucidum in shake flask cultures. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27: 295-301.
26. Su CY, Shiao MS, Wang CT. Potentiation of ganodermic acid S on prostaglandin E1-induced cyclic AMP elevation in human platelets. *Thromb Res* 2000; 99: 135-145.
27. Miyazaki T, Nishijima M (1981). Structural examination of a water soluble, anti-tumor polysaccharide ganoderma lucidum. *Chem and Pharm Bul* 1981; 29: 3611-3616.
28. Wang SY, Hsu M L, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, and et al (1997). The anti-tumor effect of ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J of Cancer* 1997; 70: 699-705.
29. 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.
30. Yang CH, Chen KJ, Wang CK. Community-acquired acinetobacter pneumonia: A case report. *J Infect* 1997; 35: 316-318.
31. 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.
32. Keenam JI, Peterson RA, Hampton MB. NADPH oxidase involvement in the pathology of helicobacter pylori infection. *J Free Rad Bio Med* 2004; 25: 5-9.
33. 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.
34. 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.
35. Clark M, Root RK. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and infection: a study of hospitalized patients in Iran. *Yale J Biol Med* 1979; 52: 169-179.
36. Vives Corrons 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.