نقش ۶–آمینونیکوتین آمید در مقاومت ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c آلوده به انگل لیشمانیا ماژور

شهرزاد زمانی تقی زاده رابع[۱]
احمد زواران حسینی[۱] *
سید علیرضا مصباح نمین[۲]

۱. گروه ایمنی شناسی
۲. گروه بیوشیمی
دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

زمینه و هدف: ارتباط مهار آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده ۶-آمینونیکوتین آمید با میزان تولید نیتریک اکساید و نیز مقاومت ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بررسی شد.

روش بررسی: ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c و با غلظت های ۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی مولار از مهار کننده ۶ -آمینونیکوتین آمید تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها با استفاده از تستMTT بررسی و میزان کاهش فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز(G6PD) تعیین شد. ماکروفاژها را با انگل لیشمانیا ماژور آلوده نمودیم و تولید نیتریک اکساید (NO) بعد از ۱۸ ساعت با استفاده از روش رنگ سنجی گریس (Gries) سنجیده و از غلظت پنج میلی مولار برای بررسی تاثیر بر میزان تکثیر انگل در ماکروفاژها از روز یک تا روز هفت استفاده شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت ۶-آمینونیکوتین آمید درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها افزایش و فعالیت آنزیم G6PD کاهش یافت. میزان تولید NO توسط ماکروفاژها با افزایش غلظت ۶-آمینونیکوتین آمید نسبت معکوس داشت. بررسی انگل در ماکروفاژها نشان داد که میزان تکثیر انگل از روز یک تا روز هفت بررسی نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری دارد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: فعالیت آنزیم G6PD با استفاده از مهار کننده ۶-آمینونیکوتین آمید کاهش می یابد. فعالیت آنزیم G6PD با کاهش تولید NO و افزایش درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها همراه است. از آنجایی که NO نقش اصلی را در فعالیت لیشمانیا کشی ماکروفاژها به عهده دارد با مهار آنزیم G6PD فعالیت لیشمانیا کشی ماکروفاژها کاهش می‌یابد.

*نشانی: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی
تلفن تماس: ۸۸۰۱۱۰۰۱
پست الکترونیک: zavarana@modares.ac.ir

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز، نیتریک اکساید، تست MTT، ۶-آمینونیکوتین آمید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

مقدمه

ماکروفاژها سلول‌های ایمنی هستند که در دفاع علیه عوامل عفونی نقش مهمی ایفا می‌کنند. مکانیسم‌های میکروب‌کشی ماکروفاژها عمدتا" 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 مهار آن منجر به کاهش شدید میزان NADPH داخل سلولی می‌شود.[۳-۵] ۶-آمینونیکوتین آمید مهارکننده رقابتی آنزیم G6PD است و بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های مختلف توسط این ماده منجر به کاهش چشمگیر میزان NADPH داخل سلولی می‌شود.[۶-۸] همچنین مشخص شده 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.[۹-۱۱] در این مطالعه اثر مهار 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 ریشه‌کن کردن آن همچنان ادامه دارد.[۸و۹] همچنین ماکروفاژها مهمترین سلول‌هایی هستند که توسط این انگل‌ها آلوده می‌شوند یعنی در واقع مخزن لیشمانیا هستند و مهمترین مکانیسم لیشمانیاکشی آنها تولید نیتریک‌اکساید (NO) می‌باشد و همانطور که ذکرشد تولید NO به در دسترس بودن کوآنزیم NADPH به مقدار کافی در سلول‌ها بستگی دارد.[۲و۱۲-۱۷]

روش بررسی

موش‌های BALB/c ماده (۹-۸ هفته‌ای) برای جداسازی ماکروفاژها 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 ده دقیقه، مایع رویی را دور ریخته و توده سلولی ته لوله در یک میلی‌لیتر RPMI حاوی FCS ۱۰٪ به حالت سوسپانسیون درآورده شد سپس ماکروفاژها را شمارش کرده و به تعداد 10^6 رسانده و درصد زنده بودن آنها تعیین شد. از موش‌های BALB/c آلوده به انگل لیشمانیا ماژور به عنوان مخزن استفاده شد. ابتدا موش را کشته و طحال آن را در شرایط استریل جدا کرده و در داخل محیط کشت NNN قرار دادیم. محیط مذکور را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از ۷۲-۴۸ ساعت رشد انگل بررسی کردیم. برای رشد بیشتر، ابتدا انگل را به محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم جنین گاو (FCS) بعد از رشد اولیه انگل، آن را به محیط کشت حاوی RPMI 1640 ۲۰-۱۰٪ سرم جنین گاو غیر فعال شده انتقال دادیم.[۱۸] در اوایل دهه ۱۹۸۰ موسمان به توضیح این روش پرداخت.[۱۹] در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از صفاق موش اضافه کرده و سلول‌ها در گروه‌های مجزا با غلظت‌های مختلف از مهارکننده ۶-آمینونیکوتین آمید (۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌مولار) تیمار شدند. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵٪ قرار گرفت. بعد از این مدت درصد سایتوتوکسیسیتی سلول‌ها توسط تست {Methyl-2,5diphenil Tetrazolium bromide3-،MTT (4,5-Tetrazolium)} تعیین شد. محلول حاوی MTT با غلظت پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. بعد از چهار ساعت انکوباسیون

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

در ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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. برای سنجش غلظت نیتریک اکساید (NO) از دو گروه ماکروفاژ، یکی ماکروفاژ تیمار شده با مهارکننده و یکی ماکروفاژهای آلوده شده با انگل لیشمانیا که با مهار کننده تیمار شده بودند استفاده شد. از ماکروفاژهای تیمار شده با SNAP که تقویت‌کننده مسیر تولید نیتریک اکساید است همراه با انگل لیشمانیا ماژور، SNAP + IFN-γ و LPS + IFN-γ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد زیرا نشان داده شده است که این مواد تولید NO توسط ماکروفاژها را تحریک می‌کنند. از 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 ماکروفاژ های کشت داده شده با ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی نفتیل اتیلن آمید دی هیدروکلراید (۰/۱ mg/ml)، سولفانیل آمید (۱ mg/ml)، ۵٪ اسید فسفوریک و آب مقطر به مدت ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد سپس جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم G6PD (فعالیت ویژه بر حسب u/mg) 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 مهارکننده و ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا همراه با مهارکننده ماکروفاژهای صفاقی جدا شده سانتریفوژ شده (۲۰۰g به مدت ده دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد) سپس در PBS به حالت سوسپانسیون (5×10^5Cells/ml) درآورده و برای لیز 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 چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و قبل از سنجش روی یخ نگهداری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره سلولی با ۰/۷۵ میلی‌لیتر از بافرتریس-اسیدکلریدریک پنج‌مولار حاوی سه میلی‌مولار $MgCl_2$ (pH 7.8)، ۲۵ میکرولیتر از گلوکز-۶-فسفات ۴/۷ مولار و NADPH ۷/۸ مولار مخلوط شده و افزایش جذب NADPH بعد از پنج دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه در طول موج ۳۳۹ نانومتر قرائت شد. ماکروفاژهای صفافی موش BALB/c همراه با محیط کشت RPMI 1640 حاوی FBS ۱۰٪ غیر فعال شده با حرارت به داخل پلیت های ۱۶ خانه‌ای ریخته شدند. بعد از ۲۴ ساعت آماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به نسبت ۱:۲۰ (آماستیگوت به ماکروفاژ) اضافه شدند. چهار ساعت بعد به محیط رویی محیط حاوی آماستیگوت های آزاد اضافه شد. روز بعد، محیط کشت رویی با محیط کشت تازه حاوی غلظت‌های مختلف مهارکننده تعویض شد. میکروپلیت در۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور CO_2 ۵٪ انکوبه شد. از روز یک تا روز هفت ماکروفاژهای هر چاهک از ته پلیت جدا شده، روی اسلاید قرار داده و بعد از فیکس کردن با متانول با استفاده از رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد و تعداد ماکروفاژهای آلوده به غیر آلوده و نیز تعداد آماستیگوت های موجود در هر ماکروفاژ به صورت درصد با استفاده از بررسی در زیر میکروسکوپ تعیین شد. نتایج حاصل از تست‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و روش‌های آنالیز آماری غیر پارامتریک Mann-Witney و ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

همان‌طور که در جدول شماره۱ مشخص شده است، نتایج حاصل از انجام تست MTT بر روی ماکروفاژهایی که با غلظت‌های مختلف مهارکننده ۶-آمینونیکوتین آمید (۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌مولار) به مدت ۱۸ ساعت تیمار شده بودند،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

نشان‌داد که‌با افزایش غلظت مهارکننده درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها کاهش معنی‌داری می‌یابد(p<۰/۰۰۱) همچنین آزمون آماری ANOVA نشان داد که بین میزان سایتوتوکسیسیتی ایجاد شده توسط غلظت های مختلف از مهار کننده با هم نیز تفاوت قابل توجهی (p<۰/۰۰۱) وجود داشت. نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده بعد از ۱۸ ساعت توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهار کننده ۶-آمینونیکوتین آمید (۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی مولار) که در جدول شماره۲ آمده، نشان داد که تیمار ماکروفاژها با این مهارکننده میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها را کاهش قابل توجهی می دهد و این کاهش با افزایش غلظت مهار کننده رابطه مستقیم دارد. میزان NO تولید شده توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلـظت های مختلف از مهارکننده کاهش قابل‌توجهی نسبت‌به ماکروفاژهای گروه کنترل (p<۰/۰۰۱) داشت. همچنین بین میزان NO تولید شده توسط گروه‌های مختلف با یکدیگر نیز تفاوت قابل معنی داری وجود داشت (p<۰/۰۰۱). آزمون آماری Mann-Witney نشان داد که در گروه ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا که با غلظت‌های مخـتلف از مهـارکننده تیـمار شـده بودند میـزان تولید NO نسبت به گروه فاقد انگل لیشمانیا و نیز نسبت به سایر غلظت‌های همان گروه کاهش معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۰۱). با سنجش فعالیت آنزیم G6PD در عصاره حاصل از لیز ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف مهارکننده ۶-آمینونیکوتین آمید(۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌مولار) مشخص شد که استفاده از این مهارکننده منجر به کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژها می‌شود و هر چه غلظت مهار کننده بیشتر باشد درصد مهار آنزیم نیز افزایش می‌یابد. همانطور که در نمودار شماره۱ مشخص شده‌است غلظت‌های مختلف مهارکننده از نظر میزان مهار آنزیم G6PD با گروه کنترل و نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) داشتند. همچنین تجزیه و تحلیل با آزمون آماری ANOVA نشان داد که انگل لیشمانیا نمی‌تواند منجر به افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژهای آلوده شود (p >۰/۰۵)

بعد از بررسی ماکروفاژهای رنگ آمیزی شده توسط گیمسا نسبت ماکروفاژهای آلوده به غیرآلوده و نیز میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده بعد از بررسی توسط میکروسکوپ تعیین شد و همانطور که در جدول شماره۳ مشخص شده است، میانگین تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده که با غلظت پنج میلی مولار از مهار کننده ۶-آمینونیکوتین آمید تیمار شده بودند با افزایش زمان از روز یک تا روز هفت نسبت به گروه کنترل در تجزیه و تحلیل با آزمون آماری ANOVA، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد اکثر ماکروفاژهای آلوده توسط انگل لیشمانیا تخریب شده بودند.

جدول۱- نتایج حاصل از انجام تستMTT بعد از ۱۸ ساعت توسط مهارکننده آنزیم G6PD (۶-آمینونیکوتین آمید) بر ماکروفاژها

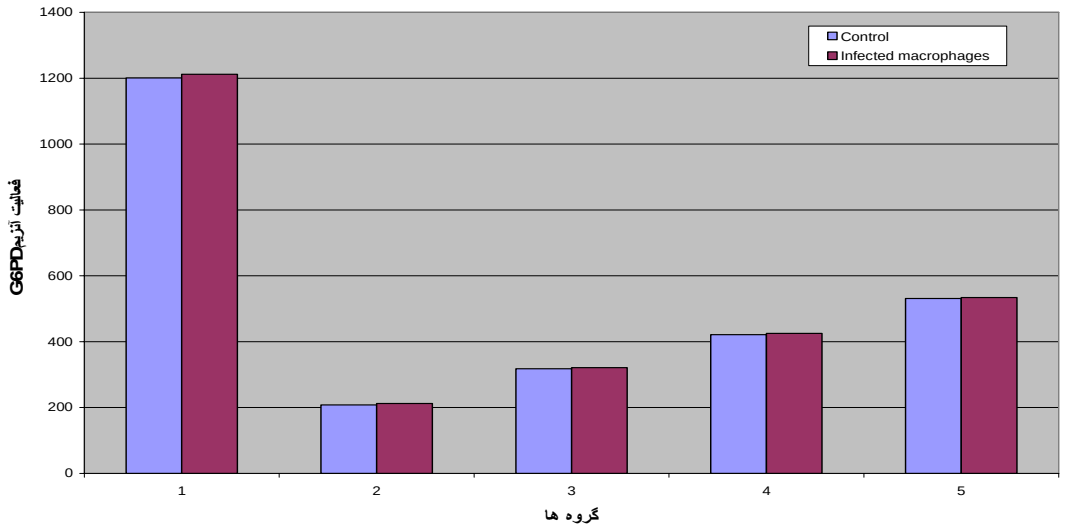
	مواد و سلول اضافه شده گروه ها	درصد سایتوتوکسیسیتی در ماکروفاژهای صفاقی موش (mean ± S.D)
۱	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۱۰ میلی مولار	۲/۱۲ ± ۰/۰۶
۲	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵ میلی مولار	۱/۹۹ ± ۰/۱
۲	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵/۲میلی مولار	۱/۸۶ ± ۰/۰۷
۴	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۱/۲۵میلی مولار	۱/۷۳ ± ۰/۰۹

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

جدول۲- غلظت نیتریت تولید شده (بر حسب میکرومولار) توسط ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف مهارکننده آنزیم G6PD (۶-آمینونیکوتین آمید).

	مواد و سلول اضافه شده گروه ها	غلظت نیتریت (میکرومولار)
۱	ماکروفاژ	۳۳ / ۳۴ ± ۰ / ۸۹
۲	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا ماژور	۳۳ / ۹۶ ± ۰ / ۹۰
۳	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا ماژور+ SNAP	۲۶۲ / ۵۵ ± ۳ / ۶۲
۴	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا ماژور+ NMMA	۲۷ / ۳۰ ± ۰ / ۳۷
۵	ماکروفاژ +SNAP + IFN-γ	۲۶۹ / ۸۷ ± ۱ / ۴۳
۶	ماکروفاژ + IFN-γ + LPS	۴۰ / ۳۴ ± ۰ / ۸۷
۷	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۱۰ میلی مولار	۱۴ / ۱۴ ±۰ / ۳۳
۸	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵ میلی مولار	۱۵ / ۰۹ ±۰ / ۲۹
۹	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵/ ۲میلی مولار	۱۵ / ۵۷ ±۰ / ۲۳
۱۰	ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۲۵/ ۱میلی مولار	۱۶ / ۶۶ ±۰ / ۱۳
۱۱	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + 6-AN با غلظت ۱۰ میلی مولار	۱۴ / ۱۶ ±۰ / ۲۲
۱۲	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + 6-AN با غلظت ۵ میلی مولار	۱۵ / ۱۰ ±۰ / ۲۹
۱۳	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + 6-AN با غلظت ۵/ ۲میلی مولار	۱۵ / ۵۸ ±۰ / ۲۲
۱۴	ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + 6-AN با غلظت ۲۵/ ۱میلی مولار	۱۶ / ۶۸ ±۰ / ۱۳

SNAP: S-Nitroso-Acethyl-Penicillamide NMMA: N-Methyl-L-Arginine 6-AN: 6-Aminonicotinamide



نمودار۱. میزان فعالیت آنزیم G6PD در ماکروفاژهای دو گروه بعد از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف مهارکننده آنزیم G6PD (۶-آمینونیکوتین آمید). گروه ۱، ماکروفاژ؛ گروه ۲، ماکروفاژ+ 6-AN با غلظت ۱۰ میلی مولار؛ گروه ۳، ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵ میلی مولار؛ گروه ۴، ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۵/۲ میلی مولار؛ گروه ۵، ماکروفاژ + 6-AN با غلظت ۱/۲۵میلی مولار.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

جدول۳- اثر مهار آنزیم G6PD (توسط ۶-آمینونیکوتین آمید) بر تکثیر داخل سلولی لیشمانیا ماژور ماکروفاژهای صفاقی آلوده به‌آن

نوع ماده اضافه شده	خطای معیار ± میانگین تعداد انگل در ۲۰۰ ماکروفاژ از روز صفر تا روز شش						
	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶
ماکروفاژ + انگل لیشمانیا	۵/ ۱۱ ±۰/ ۱	۶/ ۴۱ ±۵/۰	۷/ ۹۲ ±۰/۳	۹/۶۳ ±۴/۰	۱۱ /۵۹ ±۰/ ۱	۱۴ /۰۹ ±۴/۰	a
ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + 6-AN با غلظت ۵ mM	۵/ ۲۹ ±۰/۳	۷/ ۱۹ ±۴/۰	۹/ ۵۹ ±۵/۰	۱۲ /۶۵ ±۰/ ۱	a	–	–

a. بیش از ۵۰ ٪ از ماکروفاژها لیز شده اند

6-AN: 6-Aminonicotinamide

بحث

امروزه بیماری لیشمانیوز در کشور ما به عنوان یک پدیده مهم مورد توجه مراکز بهداشتی و درمانی کشور است. از آنجایی‌که ماکروفاژها سلول‌های اصلی مخزن انگل لیشمانیا می‌باشند.[۱۸-۲۰] 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 گلوکز۶- فسفات دهیدروژناز را که آنزیم کنترل کننده این مسیر متابولیکی می‌باشد، در ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بررسی نماید. با توجه به شیوع لیشمانیوز و اهمیت تشخیص و درمان مناسب آن در مناطق آلوده، ما از انگل لیشمانیا ماژور به عنوان یک مدل برای بررسی اثرات مهار شدن آنزیم گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز در فعالیت میکروب‌کشی 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 می شود گلوکز۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) می باشد بنابراین مهار G6PD منجر به کاهش شدید تولید NADPH در سلول ها می شود.[۲۱] در بررسی‌های قبلی، تاثیر نقص G6PD در افزایش استعداد ابتلا و نیز افزایش شدت بیماری‌های عفونی مختلف ازجمله ریکتزیاها،[۱۰] پنومونی ناشی از آسینتوباکتر،[۲۲] عفونت توکسوپلاسما [۹] و عفونت هلیکوباکتر پیلوری [۱۱] در بیماران به اثبات رسیده است. همچنین ثابت شده است که لکوسیت های این افراد دارای اختلال در فرایند کشتن عوامل عفونی بوده و میزان تولید رادیکال های فعال اکسیژن و نیتروژن در آنها کمتر از سطح طبیعی می‌باشد.[۲۳-۲۸] مطالعات مختلفی درباره مکانیسم‌های کشتن انگل لیشمانیا توسط ماکروفاژها صورت گرفته است، اسروی و همکاران [۲۹] در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که کشتن انگل لیشمانیا ماژور توسط ماکروفاژهای فعال شده عمدتا" به تولید NO و تا حد کمتری به تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن از جمله سوپراکسید وابسته است.

در این تحقیق از مهار کننده ۶-آمینو نیکوتین آمید(6-AN) استفاده کردیم که از جمله موثرترین مهارکننده مسیر پنتوز فسفات می‌باشد و آنزیم G6PD را مهار می‌کند. بعد از تیمار سلول ها 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 انگل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

لیشمانیا استفاده کردیم. با استفاده از این مهار کننده مشاهده شد که میزان NADPH تولید شده، فعالیت آنزیم G6PD، میزان نیتریک اکساید تولید شده در ماکروفاژها کاهش می‌یابد. بنابراین آزمایشات ما با تحقیقاتی که توسط محققین مختلف انجام داده‌اند تطبیق می‌کند.[۹-۱۱] NADPH تولید شده، کوآنزیم مهم آنزیم‌های تولید کننده رادیکال های 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. بنابراین 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 6-AN بر روی ماکروفاژهای صفاقی موش BALB/c نشان دادند که با افزایش غلظت مهارکننده درصد سایتوتوکسیسیتی ماکروفاژها افزایش می‌یابد. مشاهده شد که غلظت ۱۰ mM تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و نیز غلظت های ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی مولار دارد (P≤۰/۰۵) و این غلظت بیشترین میزان مهارکنندگی را داراست (P≤۰/۰۵) به‌طور کلی غلظت‌های ۱۰ mM و۵ ،۲/۵ ،۱/۲۵ نسبت به گروه کنترل و نیز با یکدیگر تفاوت معنی داری از نظر میزان مهارکنندگی دارند (P≤۰/۰۵) و این میزان با افزایش غلظت از ۱/۲۵ mM تا ۱۰ mM افزایش می‌یابد. ما برای بررسی غلظت نیتریت تولید شده در مایع رویی کشت ماکروفاژها از روش رنگ سنجی گریس استفاده کردیم. نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید نشان دادند که بالاترین مقدار نیتریت تولیدی که شاخص تولید NO است در مجاورت SNAP در گروه‌های سوم (ماکروفاژ + انگل لیشمانیا + SNAP) و پنجم (ماکروفاژ + SNAP + IFN-γ) در مقایسه با گروه کنترل (P≤۰/۰۵) و نیز سایر گروه‌ها تولید شد. علت آن می‌تواند موثر بودن دهنده NO در تولید آن در مقایسه با سایر عوامل محرک سلول باشد. نتایج حاصل از تیمار ماکروفاژها با مهارکننده 6-AN، نشان دادند که استفاده از این مهارکننده تا حد معنی‌داری غلظت NADPH تولید شده و فعالیت آنزیم G6PD را کاهش می‌دهد و میزان مهار با افزایش غلظت مهارکننده‌ها بیشتر می‌شود (P≤۰/۰۵). نتایج حاصل از بررسی تعداد ماکروفاژهای آلوده با انگل لیشمانیا در طی هفت روز نشان دادند که با افزایش غلظت مهارکننده تعداد ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا و تعداد انگل‌های موجود در هر ماکروفاژ افزایش می‌یابد (P≤۰/۰۵) و این افزایش با افزایش غلظت مهارکننده نسبت مستقیم دارد (P≤۰/۰۵).

در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم که استفاده از مهارکننده های به‌کار رفته برای مهار فعالیت آنزیم G6PD سبب می‌شود که میزان تولید NADPH، غلظت نیتریک اکساید تولید شده، میزان زنده بودن ماکروفاژها و مقاومت ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا کاهش معنی‌داری می‌یابد. بنابراین، کاهش فعالیت G6PD و غلظت NADPH در نتیجه نقص ژنتیکی یا بیماری و یا از طریق استفاده از مهارکننده منجر به کاهش تولید نیتریک اکساید و میزان زنده بودن ماکروفاژها می‌شود که از عوامل موثر در کشتن انگل در ماکروفاژهای آلوده می‌باشند، پس سبب افزایش رشد انگل می‌شوند. بنابراین توانایی میکروب‌کشی ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا که با مهار کننده تیمار شده‌اند، کاهش می‌یابد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

References

1. Nathan CF, Gabay J. Antimicrobicidal mechanisms of macrophages. *Mononuclear Phagocytes* 1992; 12: 256-67.
2. Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepi-androsterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase and longevity. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 171-87.

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

4. Zamora R, Bult H, Herman AG. The role of prostaglandin E_2 and nitric oxide in cell death in J774 murine macrophages. *Euro J Pharmacol* 1998; 349: 307-15.
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: 882-85.
6. Kohler E, Barrach H, Neubert D. Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP. *FEBS Letters* 1970; 6: 225-28.
7. Yang YC, Kim JY, Park IK. Neurotoxin 6-amino nicotinamide affects level of soluble protein and enzyme activities in various tissues of golden hamsters. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 549-56.
8. Gupte SA, Li KX, Sato K, Oka M. Inhibitors of pentose phosphate pathway causes vasodilation: Involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 299-305.
9. Tabbara KF, Sharara NA, Al-Momen AK. Toxoplasmasis in a group of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients. *Saudi Med J* 2001; 22: 330-32.
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: 121-25.
11. Keenan JI, Peterson RA, Hampton MB. NADPH oxidase involvement in the pathology of Helicobacter pylori infection. *J Free Rad Bio Med* 2004; 25: 5-9.
12. Handman E, Bullen DV. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* 2002; 18: 332-34.
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: 627-76.
14. WHO special programme for research & training in tropical diseases. Work plan of the steering committee on vaccines for Leishmaniasis, December 1996.
15. Oliveria SH, Fonseca SG, Romao PR. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of Eosinophils. *Cell Immunol* 1997; 18: 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* 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: 1467-75.
18. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SMH, Sharidi I. Characterization of Leishmania isolated in Iran: 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. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Critic Rev Microbio*l 2002; 28: 187-248.
21. Mac Micking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1993; 15: 323-50.
22. Yang CH, Chen KJ, Wang CK, Wang CK. Community-acquired Acinetobacter pneumonia: a case report. *J Infect* 1997; 353: 316-18.
23. 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: 748-52.
24. Siddiqui T, Khan AH. Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mil Med* 1998; 163: 434-35.
25. Thakur A, Verma IC. Interaction of malarial infection and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trop Geogr Med* 1992; 44: 201-5.
26. 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.
27. Clark M, Root RK. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and indection: a study of hospitalized patients in Iran. *Yale J Biol Med* 1979; 52: 169-79.
28. Vives Corrons JL, Felio E, Pujades MA, Cardellach F, Rozman C, Carreras A, et al. 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: 428-34.
29. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, Odonnell CA, Liew FY, et al. production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. *Eur J Immunol* 1994; 24: 627-76.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

The role of 6-Aminonicotinamide in the resistance of peritoneal macrophages against Leishmania major infection in BALB/c mouse

Sh. Zamani T.R.[1]
A. Zavaran Hosseini[1] *
S.A. Mesbah Namin[2]

1- Department of Immunology.
2- Department of Biochemistry.

Tarbiat Modares University

* Department. of immunology
Tarbiat Modares University
Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88011001
Email: zavarana@modares.ac.ir

Abstract

***Background*:** The objective of this study was to investigate the relationship between glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition in macrophages treated with 6-Aminonicotinamide, the amount of nitric oxide (NO) production and the resistance of infected macrophages against Leishmania major infection.

***Methods*:** Peritoneal macrophages of BALB/c mice were isolated and treated with different concentrations (1.25, 2.5, 5, 10 mM) of 6-aminonicotinamide. After 24 hours, the viability of treated macrophages was measured by MTT assay at 540 nm. G6PD activity was measured in the cell extracts 24 hours later. Macrophages were then infected with leishmanial amastigotes and after 18 hours NO production was determined using Griess-reagent. In order to study the inhibition of macrophage activity, 5 mM concentration of 6-AN was used and number of leishmanial amastigotes was recorded in these cells from day 1 to7.

***Results*:** Different concentrations of 6-AN were shown to cause a significant increase in cell death and decrease in G6PD activity and NO production in macrophages. Also, the number of amastigotes in macrophages was increased significantly ($p < 0.05$).

***Conclusion*:** The concentration of 6-aminonicotinamide and G6PD activity affect the viability of BALB/c mice peritoneal macrophages through production of NO. Inhibition of G6PD activity leads to decreased leishmanicidal activity of mouse peritoneal macrophages.

Keywords: Leishmania major, G6PD, nitric oxide, MTT assay, 6-Aminonicotinamide

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]