مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره یازدهم، مهر و آبان ۱۳۹۱، ۳۲۲-۳۱۳

اثر عصاره سیر بر بیان ژن‌های iNOS و IFNγ در رده سلولی J774 آلوده به لیشمانیا ماژور

محمدجواد غروی[۱]، ملیحه نوبخت[۲]، شهرام خادم‌وطن[۳]، اسحاق بندانی[۴]، مونا روزبهانی[۵]، معصومه بخشایش[۶]، علی صمدی کوچکسرایی[۷]

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۹/۱۲/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۰/۶/۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: انگل‌های لیشمانیا، در صورت فعال شدن ماکروفاژها قابل فاگوسیت شدن می‌باشند، این سازوکار با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و نیتریک‌اکساید قابل انجام است، که از طریق ایمونومدولاتورها صورت می‌گیرد. دراین مطالعه، تأثیر عصاره آبی سیر بر سلول‌های J774 آلوده به انگل لیشمانیا ماژور و بیان ژن‌های iNOS و IFNγ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های J774 با پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) مجاور شدند. پس از ۷۲ ساعت، به سلول‌های آلوده شده، عصاره سیر در ۵ غلظت، ۹/۲۵، ۱۸/۵، ۳۷، ۷۴ و ۱۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد، سپس پرولیفراسیون سلولی با آزمون MTT بررسی شد. پس از ۷۲ ساعت از مجاورت سلول‌های J774 آلوده به انگل با IC_{50} سیر، سوپ سلولی جمع‌آوری شد. RNA توتال این سلول‌ها استخراج و توسط آزمایش Reverse transcription polymerase chain reaction بیان ژن‌های IFNγ و iNOS بررسی گردید. از نمونه تیمار نشده با عصاره سیر به عنوان کنترل استفاده شد. تمامی نتایج طی ۳ مرحله با آزمون آماری t-student تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: غلظت IC50 عصاره سیر ۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بیان ژن‌های IFNγ و iNOS با روش RT-PCR نشان داد عصاره سیر با IC50 موجب افزایش بیان ژن‌های iNOS و IFNγ در سلول‌های J774 آلوده به لیشمانیا ماژور می‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت سایتوکاین‌های ایمنی سلولی در توسعه و ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و با توجه به یافته‌های فوق، این فرضیه که احتمالاً اثر سیر بر ایمنی سلولی ناشی از افزایش سیتوکاین INFγ و فعال شدن ژن iNOS است، تأیید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی سیر، ژن‌های iNOS و IFNγ، لیشمانیا ماژور، رده سلولی J774

1- (نویسنده مسئول) استاد گروه آموزشی انگل‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۶۷۰۴۶۱۳-۰۲۱، دورنگار: ۸۸۶۲۲۵۹۹-۰۲۱، پست الکترونیکی: gharavimj@yahoo.com
2- استاد گروه آموزشی بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
3- استادیار گروه آموزشی انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز
4- کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
5- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه آموزشی انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
6- کارشناس ارشد گروه آموزشی انگل‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
7- دانشیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

مقدمه

تک یاخته‌های جنس لیشمانیا انگل‌های اجباری درون سلولی هستند که بسته به محل ایجاد ضایعه در بدن بیماری‌های لیشمانیوز پوستی، جلدی- مخاطی و احشایی را ایجاد می‌کنند [۱].

بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، ۱۲ میلیون نفر از ساکنین کره زمین درگیر بیماری هستند و سالیانه ۲ میلیون نفر نیز به انواع مختلف این بیماری مبتلا می‌شوند. تخمین زده می‌شود که ۳۵۰ میلیون نفر نیز در معرض ابتلاء به این بیماری باشند [۱].

سلول‌های ماکروفاژ میزبان اختصاصی انگل می‌باشند و نقش اصلی و کلیدی در ایجاد عفونت به لیشمانیا دارند از طرفی، ماکروفاژها در صورت فعال شدن، نقش اصلی در از بین بردن انگل ایفا می‌کنند. فعال شدن ماکروفاژها و تبدیل آنها به سلول‌های افکتور (مؤثر) توسط سیتوکاین IFNγ صورت می‌گیرد و ساز و کار اصلی ریشه‌کن شدن انگل در سلول‌های افکتور با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و تولید نیتریک اکسید می‌باشد [۳-۲].

نیتریک‌اکسید (Nitric oxide) یک مولکول با عمر بسیار کوتاه در حد چند ثانیه است که توسط آنزیم معروفی به نام نیتریک اکسید سنتاز (Nitric Oxide Synthase=NOS) تولید می‌شود. این آنزیم‌ها آرژنین را به سیترولین تبدیل می‌کنند که در این فرآیند NO هم تولید می‌شود.

اکسیژن و NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) به عنوان کوفاکتور لازم هستند. سه ایزوفرم NOS وجود دارد که بر اساس فعالیت آنها یا نوع بافتی که اولین بار در آن کشف شده‌اند نام‌گذاری می‌شوند و عبارتند از NOSهای عصبی (Neron Nitric Oxide Synthase = nNOS)، NOSهای اندوتلیالی (endothelial Nitric Oxide Synthase =eNOS) و NOSهای القایی (inducible Nitric Oxide Synthase =iNOS) [۴] دو آنزیم nNOS و eNOS اساساً در سلول‌های پستانداران بیان می‌شوند و NO را در واکنش به افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی سنتز می‌کنند اما در بعضی شرایط در واکنش به تحریک، مثل تنش پاره‌کننده(shear stress) این آنزیم‌ها می‌توانند بدون وابستگی به سطوح کلسیم، تولید NO را افزایش دهند [۵-۴]. تولید NO توسط iNOS نسبت به دیگر ایزوفرم‌ها زمان بیشتری می‌برد و غلظت‌های بالاتری از NOدر سلول تولید می‌کند [۶]. تولید NO توسط iNOS می‌تواند در نسخه‌برداری کنترل شود. در اکثر سلول‌ها سطوح پروتئینی iNOS بسیار پایین و ناشناخته است اما تحریک این سلول‌ها با سایتوکاین‌ها یا فاکتورهای رشد منجر به افزایش نسخه‌برداری ژن‌های iNOS و متعاقباً تولید غلظت بالایی از No می‌شود [۶]. در بیش از ۵۰ سال گذشته، داروهای شیمیایی آنتیموان ۵ ظرفیتی در درمان انواع مختلف لیشمانیوز به کار رفته‌اند که وجود اثرات جانبی فراوان و همچنین مقاوت دارویی، گاهی تا ۸۰٪، موجب شده تا محققین در پی استفاده از داروهای جایگزین نظیر آمفوتریسینB، پارامومایسین و میلتوفوسین باشند [۸-۷]. از خاصیت ایمونومدولاتوری عصاره گیاهان دارویی و ترکیبات پلی فنلیک نظیر تانن [۱۱-۹] و اسیدگالیک [۱۲] در مطالعات درمانی لیشمانیوز استفاده شده است. سیر از گیاهان خانواده آلیاسه (Alliaceae) می‌باشد و نام علمی آن Allium sativum است. در پزشکی سنتی سیر در درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر

Archive of SID
www.SID.ir

عفونت‌های انگلی، باکتریایی، قارچی [۱۳] و درمان و پیشگیری بیماری‌های قلبی- عروقی، کولیت و سنگ‌های کلیوی استفاده شده است [۱۴]. در مطالعات اخیر نیز از عصاره سیر در درمان بیماری‌های بدخیم استفاده شده که اساس این بررسی‌ها استفاده از خاصیت ایمونومدولاتوری ترکیبات سیر می‌باشد [۱۵]. هدف این مطالعه بررسی ساز و کار ملکولی اثر عصاره سیر بر سلول‌های J774 آلوده به انگل لیشمانیا ماژور و بیان ژن‌های iNOS و IFNγ بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه کارآزمایی تجربی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۹ انجام شد.

۱- تهیه عصاره آبی سیر: مقدار ۲۰۰ گرم سیر به قطعات ریز و کوچک خرد گردید و پس از شستشو، با آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع رویی برداشت شده، در درون لیوفلیزاتور نگهداری گردید [۱۶].

۲- کشت سلول‌های پروماستیگوت و رده سلولی J774: انگل لیشمانیا ماژور از آزمایشگاه تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه گردید و تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در محیط‌های NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) و Roswell Park RPMI1640(Memorial Institute medium تا رسیدن به فاز لگاریتمی پاساژ داده شد. سلول‌های شبه ماکروفاژ رده سلولی J774 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640(SIGMA) بهمراه ۱۰٪ FCS (Fetal Calf Serum) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین- استرپتومایسین (کارخانه SROCH) کشت داده شدند و تا زمان رشد کامل در دمای ۳۷ درجه و فشار ۵٪ CO2 انکوباتور در مدت ۴-۳ روز در شرایط استریل نگهداری شدند [۱۷].

۳- آلوده کردن سلول‌های J774 با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور: به ازای هر سلول J774، ۵ سلول پروماستیگوت به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه و فشار ۵٪ CO2 انکوباتور در مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. برای اطمینان از آلوده شدن سلول‌ها به انگل، از سلول‌ها اسمیر تهیه شد و سپس رنگ‌آمیزی (گیمسا) شده با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند [۱۷].

۴- آزمون پرولیفراسیون سلولی توسط تست رنگ سنجی MTT: MTT یک آزمون رنگ‌سنجی است که در آن رنگ تترازولیوم زرد توسط آنزیم‌های میتوکندریایی به رنگ ارغوانی فورمازان تغییر می‌یابد و تعداد نسبی سلول‌های زنده ارتباط مستقیم با میزان جذب نوری دارد. به طور خلاصه، تعداد ۵۰۰۰ سلول J744 در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا ریخته شد و پس از ۲ ساعت انگل‌های لیشمانیا ماژور در فاز لگاریتمی به نسبت ۵ به ۱ به هر خانه افزوده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه و فشار ۵٪ CO2، عصاره سیر در ۵ غلظت متفاوت، ۹/۲۵، ۱۸/۵، ۳۷، ۷۴ و ۱۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد. پس از ساعت‌های ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲، ۰/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT (SIGMA) به سلول‌ها اضافه گردید، پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به چاهک‌ها افزوده و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. جذب نوری پلیت‌ها توسط الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

و در نهایت نتایج به صورت IC_{50} بیان شد (جدول ۱) [۱۸].

۵- استخراج RNA از سلول‌های J774 الوده به لیشمانیا ماژور و ساخت cDNA: تعداد $۱۰^۶$ سلول J774 آلوده به لیشمانیا ماژور تیمار شده با مقدار IC50 عصاره سیر جمع‌آوری گردید، از کیت RNAfast (ژن فراوان) ۱ میلی‌لیتر محلول استخراج RNA به آن افزوده شد و به مدت ۱ دقیقه به شدت ورتکس گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه شد. به محلول رویی ایزوپروپانل افزوده و مخلوط شد. ویال‌ها با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردیدند و به رسوب RNA، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حاوی DEPC (Diethylpyrocarbonate) اضافه شد و ویال‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ساخت cDNA از کیت (Accupower ŔT.premix) شرکت تکاپو زیست استفاده شد. به طور خلاصه، ۱ میکروگرم از RNA با ۳۰pmol پرایمر Revers مخلوط شد. مخلوط حاصل ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به سرعت به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. این مخلوط در ویال‌های لیوفلیزه کیت ریخته شد و با DEPC به حجم۲۰ میکرولیتر رسید.

۶- آزمایش RT-PCR بیان ژن‌های IFNγ و iNOS: پرایمرهای ژن‌های IFNγ و iNOs با استفاده از نرم‌افزار Gen runner طراحی و ساخته شدند:

iNOS (798 bp):
sense 5'-CAT GGC TTG CCCCTG GAA GTT TCT CTT CAA AG-3';
antisense 5'-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG CCA TCG-3'
IFNγ (405 bp)
sense 50-TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA- 3'
antisense 5'-GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTTCCT-3'

برای انجام آزمون RT-PCR از آنزیم Tag polymeras سیناژن ۲/۵ میکرولیتر، cDNA ۵ میکرولیتر و پرایمرهای پیشرو و پسرو هرکدام ۳۰pmol، مخلوط dNTP ۲۰۰ میکرومول، منیزیم‌کلراید ۲ میلی‌مول، بافر آنزیم Tag ۲/۵ میکرولیتر استفاده شد. مواد یاد شده در ویال ۰/۲ میلی‌لیتر مخصوص PCR ریخته شدند. حجم کل با افزودن آب به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و در دستگاه PCR در دماهای مختلف قرار گرفت. به منظور اطمینان از انجام آزمون از ژن‌های کنترل house keeping استفاده شد. این ژن‌ها به طور همیشگی در سلول بیان می‌شوند. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵٪ به مدت ۲ ساعت قرار داده شد، سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. از باندهای به دست آمده توسط دستگاه ترانس لومیناتور عکس‌برداری شد.

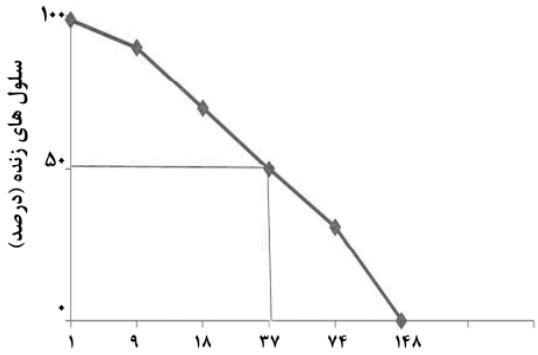
۷- برای نرمال کردن بیان ژن هریک از ژن‌های IFNγ و iNOS از ژن βactin استفاده شد.

به منظور کنترل کار از نمونه تیمار نشده با عصاره سیر به عنوان کنترل استفاده شد. در ضمن تمامی نتایج حاصله طی ۳ مرحله با آزمون آماری t-student و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

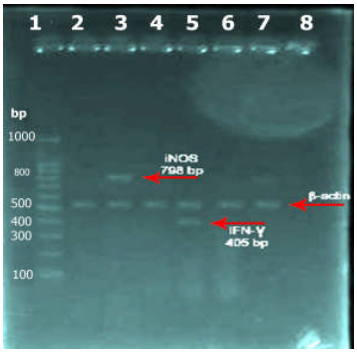
نتایج نشان داد غلظت IC_{50} عصاره سیر ۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه تست MTT در زیر مشاهده می‌شود (نمودار۱).

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱- غلظت عصاره سیر در آزمون رنگ سنجی MTT

نتایج به دست آمده با روش RT-PCR نشان داد عصاره سیر با مقدار IC_{50} موجب افزایش بیان ژن iNOS و IFNγ در سلول‌های J774 آلوده به لیشمانیا ماژور می‌شود. در مقابل، در سلول‌های J774 غیرآلوده به انگل که با مقدار IC_{50} سیر تیمار شدند، افزایش سطح mRNA مشاهده نشد. بیان ژن IFNγ و iNOs در سلول‌های گروه آزمون و کنترل در ساعات مختلف نشان داد که بهترین نتیجه در ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با عصاره سیر به دست می‌آید (نمودار ۱).



نمودار ۲- نتایج RT-PCR در بیان ژن‌های IFNγ و iNOS
ستون اول: مارکر نشان‌دهنده وزن مولکولی از ۱۰۰ bp تا ۱۰۰۰ bp
ستون دوم: عدم بیان iNOS در سلول‌های آلوده شده با لیشمانیا بدون اثر عصاره سیر
ستون سوم: عدم بیان iNOS در سلول‌های غیر آلوده به لیشمانیا بدون اثر عصاره سیر
ستون چهارم: عدم بیان IFNγ در سلول‌های آلوده شده با لیشمانیا بدون اثر عصاره سیر
ستون پنجم: بیان iNOS در سلول‌های آلوده شده با لیشمانیا تحت اثر عصاره سیر (۷۹۸ bp) .
ستون ششم: بیان IFNγ در سلول‌های آلوده شده با لیشمانیا تحت اثر عصاره سیر (۴۰۵ bp).
ستون هفتم: عدم بیان IFNγ در سلول‌های غیرآلوده به لیشمانیا بدون اثر عصاره سیر
ستون هشتم: باند ۵۳۸ bp به عنوان کنترل استفاده شد.

جدول ۱-ارزیابی MTT در غلظت های مختلف عصاره آبی سیر در ماکروفاژها

غلظت عصاره سیر میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۹/۲۵	۱۸/۵	۲۷	۷۴	۱۴۸
میانگین ODλ	۲/۰۶۵	۱/۹۹۵	۱/۱۱۸	۰/۷۲۳	۰/۱۵۰

بحث

وجود مواد ایمونومدالاتور در سیر، توسط محققین متعددی گزارش شده است. یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره سیر قادر است پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک نموده و باعث فعال شدن ماکروفاژها و سلول‌های NK (Natural killer) شود [۱۹-۱۷].

با توجه به اهمیت سایتوکاین‌های ایمنی سلولی در توسعه و ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و با توجه به یافته‌های فوق، این فرضیه که احتمالاً اثر سیر بر ایمنی سلولی ناشی از افزایش سیتوکاین IFNγ و فعال شدن ژن iNOS است، تأیید می‌شود.

از آن‌جا که آزمون‌های عملکردی نظیر اندازه‌گیری No قادر به مشخص ساختن سازوکار ملکولی تنظیم پاسخ ایمنی توسط عصاره سیر نبودند، در مطالعه حاضر بررسی بیان ژن‌های iNOS و IFNγ مد نظر قرار داده شد. بررسی بیان ژن IFNγ با تکنیک RT-PCR، نشان داد که ۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

ساعت پس از تیمار سلول‌های J774 با عصاره سیر روند افزایش بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد در صورتی که در سلول‌های شاهد هیچ باندی مشاهده نشد [۱۲].

فعال شدن ماکروفاژها و تقویت آن در اثر بیان و افزایش IFNγ می‌تواند دلیل احتمالی اثر عصاره سیر در درمان عفونت لیشمانیوز باشد. فعال شدن ماکروفاژها توسط IFNγ چه به صورت اتوکرین توسط ماکروفاژ و چه به صورت پاراکرین توسط سلول‌های T، برای کنترل عفونت داخل سلولی و پیشرفت بیماری ضروری است [۲]. مطالعات متعدد *invitro* و *invivo* نشان می‌دهند که IFNγ نقش بسیار اساسی در فعال سازی ماکروفاژها به عهده دارد. اگر ژن‌های INFγ و گیرنده آن در موش‌های مقاوم به لیشمانیا ماژور تخلیه و مهار شوند در این موش‌ها عفونت به صورت کشنده در می‌آید [۲۰]. مطالعات *invitro* نشان داده است که اضافه شدن IFNγ به ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور که از موش‌های مقاوم یا حساس جدا شده‌اند باعث فعال‌سازی این سلول‌ها در کشتن و حذف انگل می‌شود [۲۱].

در بررسی بیان ژن‌های iNOS در سلول‌های J774 آلوده به لیشمانیا ماژور تیمار شده با عصاره سیر نیز مشخص شد که ۱۸ساعت پس از تیمار سلول‌ها با عصاره سیر روند افزایش بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد در صورتی که در سلول‌های شاهد هیچ باندی مشاهده نشد. فعال شدن ژن iNOS ماکروفاژها در نهایت به تولید NO منتهی می‌شود. NO به عنوان یکی از مهم‌ترین بازوهای عمل‌کننده و یا به عنوان افکتور اصلی در تخریب انگل و حذف آن نقش ایفا می‌کند، مهار تولید NO باعث می‌شود که ماکروفاژها نتوانند از تکثیر انگل جلوگیری کنند. به کار بردن مهارکننده‌های NO در موش‌های مقاوم باعث عدم توانایی آنها در کنترل عفونت لیشمانیا ماژور می‌شود. با توجه به این یافته احتمال می‌رود که افزایش بیان ژن iNOS یکی از مکانیسم‌های اثر عصاره سیر در حذف عفونت لیشمانیا باشد که RT-PCR تحقیق حاضر این نتیجه را در سلول‌های ماکروفاژ آلوده به لیشمانیای ماژور صادق می‌داند. القای آپوپتوزیس در انگل درون سلولی لیشمانیا نیز می‌تواند یکی از اثرات بالقوه این ترکیب گیاهی باشد زیرا مطالعات، القای مرگ برنامه‌ریزی شده توسط داروهایی نظیر میلتوفوسین را در لیشمانیا ثابت کرده‌اند [۲۲].

Ghazanfari و همکاران اثر عصاره سیر بر رشد انگل لیشمانیا و بهبود زخم را مطالعه و گزارش نمودند که مکانیسم آن از طریق افزایش سایتوکاین‌های مترشح توسط سلول‌های Th_1 صورت گرفته است. در این مطالعه اثر عصاره سیر با افزایش IFNγ از Th_1 و سوییچ سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی نشان داده شد [۲۳]. Kolodziej و همکاران با اثر tannins بر سلول‌های آلوده به لیشمانیای ماژور به بررسی ژن سایتوکاین‌های درگیر در سیستم ایمنی پرداختند که نتایج Ghazanfari را تأیید نمودند [۱۰].

سیر دارای فعالیت ضد انگلی قوی است، گزارشاتی تأثیر درمانی عصاره آبی سیر بر هیمنولیپس نانا و ژیاردیا را نشان می‌دهد [۲۴]. از دیگر اثرات عصاره سیر مهار رشد لیشمانیای ماژور است. در بررسی Ghazanfari غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیر در محیط کشت روی لیشمانیای ماژور اثر داده شده که نتایج به دست آمده نشان می‌دهد کمترین غلظت مورد استفاده در این مطالعه توانسته رشد انگل را در محیط مهار نماید و منحنی رشد انگل را به صفر برساند

Archive of SID
www.SID.ir

[۲۳]. Nikoo و همکاران نشان دادند که که فراکشن R_{10} سیر دارای خاصیت ایمنومدولاتوری و یک گلیکوپروتین با وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون است که در درمان زخم‌های ناشی از سالک مؤثر است [۲۵].

نتایج حاصل از تست MTT در مطالعه حاضر نشان داد که پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار شدن سلول‌ها با عصاره سیر، بهترین غلظت از عصاره سیر که نیمی از سلول‌ها در آن غلظت کشته شده بودند، ۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

این بررسی‌ها نشان داده‌اند اثرات ایمونومدولاتوری سیر شامل تقویت پاسخ‌های سلولی و افزایش ازدیاد حساسیت تأخیری، شیفت پاسخ‌های سایتوکاینی به سمت TH_1، افزایش Spider Solitaire.ink فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی در مقابل تومور، افزایش فعالیت ماکروفاژ و تقویت بلع و هضم انگل لیشمانیا ماژور است [۲۳].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سیر دارای خاصیت ایمونومدولاتوری است که قادر می‌باشد ماکروفاژها را تحریک و فعال نماید و باعث تولید IFNγ گردد و IFNγ نیز سیستم ایمنی را به سمت ایمنی سلولی پیش می‌برد. با این حال مطالعات متعددی وجود مواد آنتی‌بیوتیکی ترکیبات ارگانوسولفوره نظیر Ajoen و Allicin را در سیر نشان داده‌اند که خود می‌تواند دلیل دیگری بر اثربخشی این گیاه طبیعی بر سلول‌های آلوده به لیشمانیا باشد. به طور خلاصه بر اساس نتایج این مطالعه سیر به عنوان یک کاندید مناسب جهت مطالعات بیشتر برای فرموله کردن در یک ترکیب دارویی در درمان مؤثرتر لیشمانیوز پوستی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز مؤسسه مطالعات تاریخ پزشکی، طب اسلامی و مکمل دانشگاه علوم پزشکی تهران (ایران سابق) به اجرا در آمده است. بدین وسیله از همکاری این مؤسسه مراتب قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

Archive of SID

References

[1] Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(2):126-30.

[2] Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol* 2009; 47(6): 412-23.

[3] Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. *Immunol Res* 2008; 41(1): 15-25.

[4] Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11(2): 207-18.

www.SID.ir

[5] Umar S, Van der Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* 2010; 333(1-2): 191-201.

[6] Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4638-42

[7] Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007; 14(10): 1153-69.

[8] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366(9496): 1561-77.

[9] Trun W, Kiderlen AF, Kolodziej H. Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in Leishmania-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of Pelargonium sidoides (Eps 7630). *Phytomedicine* 2006; 13(8): 570-5.

[10] Kolodziej H, Burmeister A, Trun W, Radtke OA, Kiderlen AF, Ito H, et al. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in Leishmania major-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem* 2005; 13(23): 6470-6.

[11] Kolodziej H, Radtke OA, Kiderlen AF. Stimulus (polyphenol, IFN-gamma, LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. *Phytochemistry* 2008; 69(18): 3103-10.

[12] Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H. Gene expression profiles of inducible nitric oxide synthase and cytokines in Leishmania major-infected macrophage-like RAW 264.7 cells treated with gallic acid. *Planta Med* 2004; 70(10): 924-8.

[13] Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (Allium sativum).*Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2010; 5(1): 91-3.

[14] Ried K, Frank OR, Stocks NP, Fakler P, Sullivan T. Effect of garlic on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* 2008; 16; 8: 13.

[15] Busch C, Jacob C, Anwar A, Burkholz T, Aicha Ba L, Cerella C ,et al. Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2010; 36(3): 743-9.

[16] Panosian CB, Sypek JP, Wyler DJ. Cell contact-mediated macrophage activation for antileishmanial defence. I. Lymphocyte effector mechanism that is contact dependent and noncytotoxic. *J Immunol* 1984; 133(6): 3358-65.

[17] Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic induces a shift in cytokine pattern in Leishmania major-infected BALB/c mice. *Scand J Immunol* 2000; 52(5): 491-5.

[18] Ide N,. Lau BH. Garlic Compounds Minimize Intracellular Oxidative Stress and Inhibit Nuclear Factor-kappab activation *Journal of Nutrition.* 2001; 131(35): 1020S-6S

Archive of SID
www.SID.ir

[19] Gamboa-Leon MR, Aranda-Gonzalez I, Mut-Martín M, García-Miss MR, Dumonteil E. In vivo and in vitro control of Leishmania mexicana due to garlic-induced NO production. *Scand J Immunol* 2007; 66(5): 508-14.

[20] Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with Leishmania major. *J Exp Med* 1994; 179(4): 1367-71.

[21] Severn A, Xu D, Doyle J, Leal LM, O'Donnell CA, Brett SJ, et al. Pre-exposure of murine macrophages to lipopolysaccharide inhibits the induction of nitric oxide synthase and reduces leishmanicidal activity. *Eur J Immunol* 1993; 23(7): 1711-4.

[22] Khademvatan S, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Samadikuchaksaraei A, Oormazdi H, Mousavi zadeh K, et al. Induction of apoptosis by miltefosine in Iranian strain of *Leishmania infantum* promastigotes. *Iranian J Parasitol* 2009; 4(2): 23-31.

[23] Ghazanfari T, Hassan ZM, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against Leishmania major by garlic (Allium sativum) treatment. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3): 333-7.

[24] Soffar SA, Mokhtar GM. Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (Allium sativum) extract in hymenolepiasis nana and giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 1991; 21(2): 497-502.

[25] Nikoo S, Bozorgmehr M, Namdar Ahmadabad H, Hassan ZM, Moazzeni SM, Pourpak Z, et al. The 14kDa protein molecule isolated from garlic suppresses indoleamine 2, 3-dioxygenase metabolites in mononuclear cells in vitro. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7(4): 203-8.

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of Garlic Extract on Expression of IFN-γ and iNOS Genes in Macrophages Infected with Leishmania Major

M.J. Gharavi[1], M. Nobakht[2], Sh. Khademvatan[3], E. Bandani[4], M. Roozbehani[5], M. Bakhshayesh[6], A. Samadi Koochaksaraei[7]

Received: 09/02/2011 Sent for Revision: 16/03/2011 Received Revised Manuscript: 30/08/2011 Accepted: 12/09/2011

Background and Objectives: The protozoa of leishmania lead to cutaneus and visceral leishmaniasis. Activation macrophages phagocyte parasites and this mechanism can be done with production of active radicals oxygen and nitric oxide, That is done through immunomodulator, as a basic process for production of the new drug. In this study, the effect of garlic extract as an immunomodulator on J774 cells infected with Leishmania major and iNOS gene expression and IFNγ has been investigated.

Materials and Methods: Leishmania major promastigotes (MRHO/IR/75/ER) were added to the in-vitro cultured macrophages (J774 cells) and these cells were incubated for 72 hours.Various concentrations of garlic extract(9.25-18.5-37-74-148 mg/ml) were added to the infected cells . MTT assay was applied for cellular prolifration. After 72 hours of incubation, supernatants were collected and total RNA was extracted from the infected cells. The expression of IFNγ and INOS genes were studied by RT-PCR method. Untreated sample with garlic was used as control. All the experiments were repeated at least three times, and representative results were analyzed. Statistical significance ($P < 0.05$) was analyzed by Student's *t*-test using SPSS version16.

Results: The result of this study, using MTT method showed that, the IC50 concentration of garlic extract was 37 mg/ml. Also the expression of IFNγ and iNOS genes by RT-PCR indicated that garlic extract lead to rise of expression of these genes in the J774 cells infected with L.major.

Conclusion: Based on the findings and importance of the cellular immunity cytokines in developing and importance of the responses, the hypothesis that the effect of AGE in cellular immunity is due to rising the IFNγ cytokines and expression of iNOS genes is confirmed.

Key words: Aqueous Garlic Extract (AGE), IFNγ and iNOS genes, Leishmania major**,** J774 cell line

Funding: This study was supported by Research Institute for Islamic & Complementry Medicine of Tehran University of Medical Sciences**.**

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Research Institute for Islamic & Complementry Medicine of Tehran University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Gharavi MJ, Nobakht M, Khademvatan Sh, Bandani E, Roozbehani M, Bakhshayesh M, Samadi Koochaksaraei A. he Effect of Garlic Extract on Expression of IFN-γ and iNOS Genes in Macrophages Infected with Leishmania Major. *J Rafsanjan Univ Med scie* 2012; 11(4): 313-22. [Farsi].

1- Prof., Dept. of Medical Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
(Corresponding Author) (021) 86704613, Fax:(021) 88622533, E-mail: gharavi mj@yahoo.com
2- Prof., Dept. of Histology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Prof., Dept. of Parasitology, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- MS Biotechnology, Fculty of Applied Medicine,Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
5- BS Medical Sciences, Faculty Applied Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
6- MS Parasitology, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7- Associate Prof., Dept. of Biotechnology, Fculty of Applied Medicine,Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Archive of SID
www.SID.ir