اثر عصاره سیر بر یان زن‌های iNOS و IFN-γ در رده سلولی J774 آلودگی به لیشمانیا مازور

محمودجواد غریبی، ملیحه نوبخت، شهرام خامدی‌نژاد، اجالن بدنی، منا روزبیانی، معصومه بخشایش

چکیده
زمنه و هدف: اگر یان لیشمانیا دارد، عصاره سیر به ماتریکس‌ها قابل فاکتوسیون شدن می‌باشد. این سازوکار با تولید یون بی‌خونی و اکسیژن در کلیه مقدار موارد احتمالی‌تر است. در این مطالعه تأثیر عصاره سیر بر سلول‌های J774 آلوده به یان لیشمانیا مازور و یان زن‌های IFN-γ و iNOS مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های J774 با پروتئین‌گوتی‌های اگل لیشمانیا مازور (بیماری شمیراناتان) ساخته شد. پس از 23 ساعت، سلول‌های آلوژه به عصاره سیر در 5 گلیفت، pH 7/4، 18/5 درجه سانتی‌گراد و 148 و 74 میلی‌گرم با میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پربازی‌سازی سلولی با افزودن MTT رابطه بین تولید این سلول‌های استخراج و RNA سری های J774 آلوده به یان لیشمانیا مازور و یان زن‌های IFN-γ و iNOS بررسی گردید. از نمونه Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) فعالیت آنزیم iNOS و IFN-γ در سلول‌های J774 آالوده به یان لیشمانیا مازور و یان زن‌های IFN-γ و iNOS بررسی گردید. از نمونه Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) فعالیت آنزیم iNOS و IFN-γ در سلول‌های J774 آالوده به یان لیشمانیا مازور و یان زن‌های IFN-γ و iNOS بررسی گردید. از نمونه Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) فعالیت آنزیم iNOS و IFN-γ در سلول‌های J774 آالوده به یان لیشمانیا مازور و یان زن‌های IFN-γ و iNOS بررسی گردید.
نام گذاری می‌شوند و عبارتند از

های صمیمیهای

Neron Nitric Oxide Synthase = nNOS

(endothelial Nitric Oxide Synthase\\

(inducible Nitric Oxide Synthase\\

=eNOS \\

[3.4] دو آنزیم Synthase =iNOS)

در سلول‌های پستانداران بیان می‌شوند و NO را در واکنش به افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی سنتر می‌کند اما در بعضی شرایط در واکنش به تحریک، مثل این آنزیمها می‌توانند بدون واسطه‌گی سطوح کلسیم، تولید NO را افزایش دهند [3-5]. تولید NO غلظت بالایی از iNOS در سلول تولید می‌کند [3.4]. تولید NO سطح برونتینی iNOS سبب پایین و ناشناخته‌اش است اما تحریک این سلول‌ها با سایتوکین‌ها با فاکتورهای رشد منجر به افزایش نسخه‌های زن‌ها iNOS و متعاقباً نتلی فیله‌ای بالایی از NO تولید غلظت بالایی از می‌شود [6]. در بیش از 50 سال گذشته، داروی گیاهی انتخاب‌های 5 طرفی در درمان اتو‌های عصبی‌وارا سبب شدهکه رفت‌بین آن به وجود آنها جایگزین نظر اکسسورسین B و پاپا و میتوفوزین باشند [8-10]. از خاصیت ایمونوپاتولوژی عصاره گیاهان دارویی و ترکیبات پلی‌فیلک نظر نیاز نیست [11-11] و اسیدگالیک (12) در مطالعات دیگری لیشمنیوز استفاده شده است. سبب از گیاهان خانواده آلیسی (Alliaceae) است. در Allium sativum می‌باشد و نام علمی آن از پژوهشی ستی‌سپر در درمان بیماری‌های نظیر...
دادة شدن و تا زمان رشد کامل در دمای ۳۷ درجه و فشار CO2/۵% اکتیونور در مدت ۳-۴ روز در شرایط استریل تک‌هاری شدن [۱۱].

۳- آلوه، کرون سلول‌های J774. با پروماسیکت‌های لیشمیا مازور به‌ارای هر سلول J774، ۵ سلول پروماسیکت به چاه‌ها اضافه شد. پلی‌ها در دمای ۳۷ درجه و فشار CO2/۵% اکتیونور در مدت ۲۲ ساعت تک‌هاری شدند. برای اطمینان از آلوه شدن سلول‌ها با ایگل، از سلول‌ها اسپر تهیه شد و سپس نانو آمیزی (گیپسا) شده با میکرو‌کوب نوری بررسی گردیدند [۱۱].

۴- آزمون برولیفراسیون سلولی توسط تست رنگ

سنجی مایل مایلی مایلی است که در آن رنگ ترنازولوی زرد توسط آنزیم‌های میتوکندریایی به رنگ ارغوانی فورمالدانه تغییر می‌یابد و تعداد نسبی سلول‌های زنده ارتباط مستقیم بین جذب نوری دارد. به طور خلاصه، تعداد ۵۰۰۰ سلول J744 در چاه‌های پلیت ۹۶ خانهای ایرانی ریخته شد و پس از ۲ ساعت انگل‌های لیشمیا مازور در فاز لگدریمی به نسبت ۵ به هر خانه ازوده شد. پس از ۲۲ ساعت اکتیوناسیون پلی‌ها در دمای ۳۷ درجه و فشار CO2/۵% عصاره سیر در ۵ گلفت متفاوت، ۹/۳۵، ۱/۸۵، ۱۸/۵ و ۱۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد. پس از ساعت‌های ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۷۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه گردید. پس از (SIGMA) MTT محلول ۴ ساعت اکتیوناسیون در دمای ۳۷ درجه محلول به چاه‌ها افزوده و پلیت به (Dimethyl sulfoxide) MTT محلول ۱۵ دقیقه در اتاق تارک‌انکوپه شد. جذب نوری پلی‌ها توسط الکترون در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی گردید.

عفونت‌های اندلی، باکتریایی، فارسی [۱۳] و درمان و پیشگیری بیماری‌های قلبی-عروقی، کولیت و سکته‌های مچی استفاده شده است [۱۴]. در مطالعات اخیر نیز از عصاره سیر در دارمی بیماری‌های بدخم استفاده شده که اساس این بررسی‌ها استفاده از خاصیت ایمونومودولانزی ترکیبات سیر می‌باشد [۱۵]. هدف این مطالعه بررسی ساز و کار ملکولی اثر عصاره سیر بر سلول‌های J774 آلوه به انگل لیشمیا مازور و بیان زن‌های IFN ۲-۴ iNOS و مواد و روش‌ها

این مطالعه کارآزمایی تجزیه و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۹-۱۳۸۹ انجام شد.

۱- تهیه عصاره آی آپر مقدار ۲۰۰ گرم سیر به قطره‌های بزرگی کوچک خرد گردید و پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت در روی شیک و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع راپی برداشت شده، در رون لیفلیراتور تک‌هاری گردید [۱۶].

۲- کشت سلول‌های پروماسیکت‌های و رده سلولی J774 انگل لیشمیا مازور از آزمایشگاه تک‌اختصاصی دانشگاه بهداشت دانشگاه تهران تهیه گردید و تعداد ۵×۱۰۵ سلول پروماسیکت‌لیشمیا مازور در میکثیات - Roswell Park و NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) تا رسانیده به RPMI1640(Memorial Institute medium) فاز اکتیوناسیون پاس داده شد. سلول‌های تیب، ماکروفاز (ده سلول J774 از بانک سلولی استیتیو پاستور تهران تهیه شدند. سلول‌های در محیط کشت SROCH به‌همراه ۱۰٪ FCS و آنتی‌بیوتیک‌های پن سیلین- استری‌پاماسین (کارخانه SROCH) کشت داده شد. سلول‌های در محیط کشت SROCH به‌همراه ۱۰٪ FCS و آنتی‌بیوتیک‌های پن سیلین- استری‌پاماسین (کارخانه SROCH) کشت داده شد.
5- استخراج DNA از سلولهای J774 از RNA

این مطالعه نشان داد که در سلولهای اسکیت آتکین INOS با آنزیم RT-PCR می‌توان استخراج DNA را انجام داد.

6- آزمایش نشان داد فلزات عصاره سیر ۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه نشان می‌دهد که در زیر مشاهده

نتایج

نتایج نشان داد فلزات عصاره سیر ۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه نشان می‌دهد که در زیر مشاهده

می‌شود (نمودار ۱).

RC50 بینان شد (جدول ۱).

[۱۸]

در نهایت نتایج به صورت IC50

و در نهایت نتایج به صورت IC50

بینان شد (جدول ۱).

[۱۸]

5- استخراج RNA از سلولهای J774 از RNA

این مطالعه نشان داد که در سلولهای اسکیت آتکین INOS با آنزیم RT-PCR می‌توان استخراج DNA را انجام داد.

6- آزمایش نشان داد فلزات عصاره سیر ۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه نشان می‌دهد که در زیر مشاهده

نتایج

نتایج نشان داد فلزات عصاره سیر ۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتیجه نشان می‌دهد که در زیر مشاهده

می‌شود (نمودار ۱).

RC50 بینان شد (جدول ۱).
نمودار 2- نتایج RT-PCR در بین ان‌های ۷۹۸ و ۴۰۵ bp

بعضی از موارد بالا، از این نظر مستلزم است که تعدادی از این اعمال برای ارزیابی عصاره سیر در آزمون رنگ سنجی MTT استفاده شود.

جدول 1- ارزیابی در غلظت های مختلف عصاره آن سیر در ماکروفازها

| غلظت عصاره سیر میلی گرم بر میلی لیتر | میانگین | SD |
|------------------------------------------|--------|-----|
| ۱۸۸۵                                      | ۱۴۸    | ۲۷  |
| ۱۹۸۵                                      | ۹۲/۵   | ۱۸/۵|
| ۱۸۶۵                                      | ۲/۰۶۵۰ | ۰/۲۲۳|
| ۱/۱۸۶۵                                    | ۱/۹۵۵  | ۹/۴۸۰|
| ۱/۱۸۶۵                                    | ۹/۴۸۰   | ۱۸/۶۳|

بحث

بررسی نتایج کناره‌گیری از آزمایشات شکل‌گیری مصرفی عصاره سیر را با استفاده از RT-PCR و PCR به کمک مورد استفاده می‌شود. در نتیجه، این نتایج به ترتیب داد که...

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

| دوره 11 | شماره ۴ | سال ۱۳۹۱ | ۳۱۷ |
توانایی آنها در گسترش عفونت لیشمنی مازوئ می‌شود. با توجه به این باتری احتمال می‌رود که افرادی با زن iNOS، یکی از مکانس‌های اثر عصاره سیر در حذف تعقیب لیشامیان باشد که تحقیق حاضر این نتیجه را در سولو iMac را روشن کرده است. در این مطالعه عنوان‌های می‌تواند یکی از اثرات بالقوه این ترکیب گیاهی باشد زیرا مطالعات، این مرکر ترکیبی شده توسط دراوره‌های تریمالوفوسین را در لیشمنی ثابت کرده‌اند [۲۲].

همگان اثر عصاره‌سیر بر رشد انجل غازانفر در لیشمانی و بهبود زخم را مطالعه و گزارش نمودند که مکانسی از طریق افزایش سایتوکینین‌های مترشح تعقیب سولو iMac صورت گرفته است. در این مطالعه اثر عصاره سیر با افزایش iNOS ثبتش دو و سوپریسیستم ثبتش به سمت این سولو نشان داده شد [۲۳].

همگان اثر عصاره سیر بر رشد انجل کولدژ و همکاران بر سولو iMac آلفا تنینز و همکاران با اثر iNTK به لیشمانی مازوئ بررسی زن ساپتوبائین‌های در گی، یا را تاپید غازانفر سیستم این پردیکش‌های نتایج به نمودند [۱۰].

سر داری فعالیت ضد انگل‌گرایی است. غازانفر با اثرات لیفومائی اثرهای آبی سیر به هیپنولیپس نانو و زباردیا را نشان دهد [۲۴]. از دیگر اثرات عصاره سیر مهر رشد غلفت‌های لیشمانی مازوئ است. در بررسی غازانفر سیر می‌تواند بر اثرات لیفومائی مکانس‌های مصرف می‌شود [۲۰].

سیر دارای اثرات ناهنجاری در عصاره می‌تواند به عنوان یکی از مهم‌ترین بازوهای عملکردش به یا به عنوان اکتای اصلی در تشخیص انگل و حذف آن نقش ایفا می‌کند. مهر تولید NO باعث به می‌شود که مکانس‌های تولید از تکریک داده‌گری کننده بار بردن مهار کندن‌ها در موش‌ها مقاوم باعث عدم

ساعت پس از تیم اماژه ۱۷۷۴ با عصاره سیر روند افزایش بین‌های iNOS و...
ایمونومدولاتوری است که قادر می‌باشد مکروفاژها را تحریک و فعال نماید و باعث تولید IFNγ و همکاران نشان دادند که فراکشن R10 اپتیت ایمنومدولاتوری به گلیکوپروتئین با ژن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون ابتدا که در درمان زخم‌های ناشی از سالک مؤثر است [۲۵].

نتایج حاصل از تست MT(T) در مطالعه حاضر نشان داد که ۴۸ ساعت از تیمار شدن سلول‌ها با عصاره سیبر به‌ترين غلظت از عصاره سیبر که نیمی از سلول‌ها در آن غلظت کشته شده بودند، ۷۷ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

این بررسی ها نشان داده‌اند اثرات ایمونومدولاتوری سیر شامل تقویت پاسخ های سلولی و افزایش ازدای حساسیت‌های انتهایی، شیفت پاسخ‌های سایتوکینی به سمت افزایش سلول‌های گیاه‌سازی Spider Solitaire.ink افزایش غلظت سلول‌های کشنه‌های طبیعی در مقابل تومور، افزایش فعالیت مکروفاژ و تقویت بلع و هضم انگل لیشمانتیا مازور است [۲۳].

نتایج گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سیر دارای خاصیت

References

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

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

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

[۴] Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer’s disease. J Alzheimers Dis 2007; 11(2): 207-18.
[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 Anti Infect 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.
[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.
The Effect of Garlic Extract on Expression of IFN-γ and iNOS Genes in Macrophages Infected with Leishmania Major

M.J. Gharavi¹, M. Nobakht², Sh. Khademvatan³, E. Bandani⁴, M. Roozbehani⁵, M. Bakhshayesh⁶, A. Samadi Koochaksaraei⁷

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 proliferation. 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 version 16.

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, Faculty of Applied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, 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, Faculty of Applied Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran