ریوی ناشی از التهاب دیده نشده است، در حالی که مطالعات قبلی نشان داده که هر دو جنس در فرآیند ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی تفاوت معنی‌داری دارند (۱۵). ولی در یک جنس، تفاوت معنی‌داری در فرایند التهاب ریه پس از مواجهه با یک عامل آسیب رسان دیده شده است. هرچند هر دو هورمون زنانه و مردانه اثر متضادی در تحریک ترشح نیتریک اکساید دارند (۱۵، ۲۷) ولی TGF-β در حضور این دو هورمون اثر کاهشی خود بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی حفظ نموده است. لذا به نظر می‌رسد که قسمتی از روند التهاب ریوی که وابسته به TGF-β است احتمالا از طریق نیتریک اکساید اعمال شده و هورمونهای جنسی نیز می‌توانند در این حالت دخیل باشند.

References

1 .Brain JD: Mechanisms measurement and significant of lung macrophage function Environment, Health Persp, 1992; 97: 5-10

2. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachilin EM: Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage, effect to molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 157: 87-96

3. Jorens PJ, Matthys KE, Bult H: Modulation of Nitric Oxide synthase activity in macrophages. Med. Inflamm 1995; 4: 75-89

4. Jesch NK, Dorger M, Messmer K, Krombach F: Formation of Nitric Oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an inter strain and inter species comparison. Toxicology Letters, 1988; (96,97), 47-51

۵. احمدی کاظم؛ اثر هورمانهای جنسی بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکرو فاژهای صفاقی موش . مجله پزشکی کوثر ۱۳۷۵؛ شماره (۲)۱، ۱۳۸-۱۲۹

6. Clancy RM, Abramson SB: Nitric Oxide A novel mediator of inflammation. Proc Soc Exp Biol Med. 1995; 210: 93-101

7. Hamid Q, Springall DR, Riverros M, Chanez P: Introduction of nitric Oxide synthase in asthma. Lancet. 1993; 342: 1510-1513

8. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J: Nitric Oxide synthase in human and rat lung. immunocytochemical and histochemical localization. Journal of Respiratory Cell. Mol Biol. 1993; 9: 371-377

9. Liew FY, Li Y, Severn A: A possible novel pathway of regulation by murin T helper type-2 (Th2) cells of Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric Oxide synthase on macrophages. Eur J Immunol. 1991; 21: 2489-2494

10. Leal LMCC, Moss DW, Kuhn R, Muller W, Liew FY: Interleukin-4 transgenic mice of resistance background are susceptible to Lieshmania major infection . Eur J of Immunology, 1993; 23: 566-569

11. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY: Interleukin-10 (IL-10) Inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Bioch And Biophy Res Communi. 1992; 182: 1152-1159

12. Dind AH, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S: Macrophage deactivation factor and transforming growth factor – beta 1, beta 2 and beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gmma. J Immunology. 1992; 145: 940-944

13. Cunha FQ, Weiser WY, David JR, Moss DW, moncada S, Liew FY: Recombinant migration inhibitory factor induce nitric Oxide synthase in murine macrophages. J immunology. 1993; 150: 1908-1912

14. Wu J, Cunha FQ, Liew FY, Weishui YW: IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor- mediated macrophage activation. J Immunology, 1993; 151(8): 4325-4332

15. Ahmadi–Renani K, McCruden AB: Sex differences in macrophage nitic oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences. 1997; 23(1&2): 42-46

16. Di-Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Bioche. & Biophy. Rese. Commu. 1990; 172 (3): 1246-1252

17. Chao TC, Van Alten PJ, Walter RJ: Steroid sex hormones and macrophage function : Modulation of reactive oxygen intermediates and nitric oxide release . American Journal of Reproductive Immunology 1994; 32: 43-52

18. Savita RU: Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: Receptor Mediated Modulation. Comparative Biochemistry and physiology part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology. 1998; 119(2): 199-204

19. Friedl R, Brunner M, Moeslinger T, Spieckermann PG: Testosterone inhibits expression of inducible Nitric Oxide synthase in murine macrophages. Life Sciences. 2000; 68 (4): 417-429

20. Ahmadi-Renani K, McCruden AB: Effect of five alpha dihydrotestosterone (5α- DHT) on cytokine production by Peritoneal Macrophages of NZB/BALBc mice.

Medical J. of the Islamic Republic of Iran. 1997; 11(3): 223-228

21. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology ,pathophysiology and pharmacology. Pharmaco Rev. 1991; 43(2): 109-141

22. Farrel AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. Annas of the rheumatic disease. 1992; 51: 1219-1222

23. Green LC, Wagner DA, Glowgowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, Tannenbaum SS: Analysis of Nitrate , nitrite and {^{15}N}Nitrate in Biological Fluids. Analytical Biochemistry, 1982; 126: 131-138

24. Woodfork KA, Schuller KC, Huffman LJ: Cytokine and nitric oxide release by J774A.1 macrophages is no regulated by estradiol. Life Sci 2001; 69(19): 2287-2294

25. Enomoto N, Takei Y, Kitamura T, Hirose M, Ikejima K, Sato N; Estradiol enhances lipopolysaccharide-induced increase in nitric Oxide production by Kupffer cells Via mechanisms dependent on endotoxin. Alcohol Clin Exp Res. 2002; 26(8 suppl): 66-69

26. You HJ, Kim JY, Jeong HG: 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 303(4): 1129-1134

27. Ahmadi-Renani K, McCruden AB: Five Alpha Dihydrotestosterone (5α-DHT) may modulate Nitric Oxide release Via endogenous cytokines by peritoneal macrophages of NZB/BALBc Mice. Medical J. of the Islamic Republic of Iran. 1999; 13(3): 207-211

28. Grasemann H, Ioannidis IM, omkie Wicz RP, De Groot H, Rubin BK, and Ratjen F: Nitric Oxide metabolites in cystic Fibrosis lung disease. Archives of Disease in childhood (NLM-medline), 1988; 78: 49-53

29. Dean Sheppard .(2001). integrin mediated activation of transforming growth factor-â1 in pulmonary fibrosis Chest: 2001; 120: 49-53

اثر ضد میکروبی عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) بر بروسلا ملی تنسیس (Rev ۱) و بروسلا آبورتوس (S ۱۹) درون ماکروفاژی

رضا شاپوری M.Sc. ☆♦، مرتضی ستاری Ph.D.☆، زهیر محمدحسن Ph.D. ✯

☆دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتریولوژی

✯ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

♦آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

پست الکترونیک: Email: rezashapoury@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۰

* **هدف:** بررسی عصاره کلروفرمی سیر بر روی بروسلا در داخل ماکروفاژ

* **مواد و روشها:** در این بررسی عصاره کلروفرمی سیر استخراج و مقدار آلیسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تعیین شد. سپس اثر آن بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا ملی تنسیس Rev۱ و بروسلا آبورتوس S۱۹ در کشت سلولی تهیه شده از ماکروفاژهای صفاقی موش مطالعه شد.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که عصاره در رقتهای ۱:۴۰برابر با غلظت ۴۳۹ میکرو گرم بر میلی‌لیتر آلیسین، ۱:۸۰برابر با ۲۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین و ۱:۱۶۰برابر با ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین، باعث حذف بروسلاهای داخل ماکروفاژی پس از ۲۴ ساعت می شود.

* **نتیجه گیری:** با توجه به اثرات ضد میکروبی سیر بر روی بروسلای درون ماکروفاژی لزوم استفاده از سیر و ترکیبات آن در درمان بروسلوز حداقل در کنار شیمی درمانی نمایان می‌شود.

گل واژگان: بروسلا، ماکروفاژ، آلیسین، مواد ضد میکروبی، سیر

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۹۰-۸۵

مقدمه

بروسلا کوکوباسیلهای گرم منفی و عامل بروسلوز در حیوانات و انسان است. تا به حال توکسین یا آنزیمهای سیتولیتیک در بروسلا شناسایی نشده است. بنابراین اکثر فاکتورهای ویرولانس این باکتری مربوط به قدرت بقای داخل سلولی آن است (۱). بروسلا ترجیحا توسط ماکروفاژها فاگوسیتوز می‌شود و در داخل آنها تکثیر پیدا می‌کند. به علت همین توانایی بقای درون فاگوسیتی باکتری ، بسیاری از داروهای ضدمیکروبی موثر در شرایط آزمایشگاهی در شرایط بدن نمی توانند بروسلوز را ریشه کن کنند. رژیم درمانی موجود برای بروسلوز نیز گاهی موارد همراه با اثرات جانبی ، عودهای مجدد و مصرف طولانی مدت (حداقل ۸-۶ هفته) باشد (۱، ۲، ۳).

سیر از جمله گیاهان دارویی است که از خاصیت ضدمیکروبی وسیعی برخوردار است و از طرفی دارای اثرات مفید دیگر از جمله تقویت سیستم ایمنی بدن است. از ایام قدیم از سیر برای درمان بسیاری از امراض از جمله تیفوس، وبا، حصبه ، بیماریهای انگلی، روماتسیم و غیره استفاده می‌شد. آلیسین مهمترین ترکیب آلی گوگرددار سیر است که بیشتر خواص ضد میکروبی و درمانی سیر را باعث می‌شود. آلیسین و عصاره سیر باعث افزایش تولید سایتوکاینها، فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیتها و سایر سلولهای سیستم ایمنی می شود (۴) هدف از این تحقیق یافتن مواد ضدمیکروبی موثر بر روی بروسلا در داخل ماکروفاژ است تا بتوان باکتری را در بدن میزبان ریشه‌کن کرد.

مواد و روشها

تهیه عصاره کلروفرمی و تعیین مقدار آلیسین آن

تهیه عصاره شامل جداسازی و خرد کردن قطعات سیر و تهیه عصاره آبی سیر سپس افزودن کلروفرم به آن در دکانتور و جداسازی فاز کلروفرمی، تقطیر در خلا (در دمای ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد) برای حذف کلروفرم و خالص سازی عصاره بود (۵، ۶).

برای تعیین مقدار آلیسین موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد (۷). به طور خلاصه شامل خرد و انکوبه کردن ۱۲ ساعته سیر در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، آسیاب و حل کردن پودر به دست آمده در آب مقطرکه ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول را با ۲۵ میلی‌لیتر از اسیدفرمیک و متانول مخلوط و از مایع رویی برای HPLC استفاده شد. استاندارد داخلی ۲۰ میلی‌گرم بوتیل پاراهیدروکسی بنزوات (BPB) در یک لیتر از حجم مساوی آب و متانول بود. با استفاده از فرمول زیر مقدار آلیسین محاسبه می‌شود.

$$\text{آلیسین٪} = \frac{S_1 m_2 \times 22/75}{S_2 m_1}$$

S_2: سطح زیر منحنی BPB

S_1: سطح زیر منحنی آلیسین

m_2: مقدار BPB بر حسب گرم

m_1: مقدار ماده مورد آزمایش بر حسب گرم

بررسی اثر عصاره بر روی ماکروفاژها

پس از تهیه ما ۰۰۰۰۰ کروفاژهای صفاقی از موشهای BALB/c ماده بالغ ۸-۶ هفته ای در محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵ واحد هپارین به ازای هر میلی لیتر محیط پس از شستشو و سانتریفوژ، درصد سلولهای زنده با رنگ تریپان بلو شمارش و تعداد سلولهای زنده (بی رنگ) و مرده (آبی رنگ) در زیر میکروسکوپ نوری و فرمول مربوطه محاسبه شد (۸) سپس تعداد ماکروفاژها مورد شمارش قرار گرفت (۹) و ماکروفاژهای جمع آوری شده به میکروپلیتهای کشت سلولی وارد ($۰/۲۷\times۱۰^{۴}$ ماکروفاژ در هر چاهک) و به همراه RPMI ۱۶۴۰ با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد Co_2 گرماگذاری شد تا ماکروفاژها به جدار پلیت بچسبند سپس رقتهایی از عصاره(۱:۲۰ ، ۱:۴۰ ، ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰) به پلیتها وارد و در همان شرایط ذکر شده گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت درصد ماکروفاژهای زنده مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. برای هر رقت عصاره ماکروفاژهای صفاقی از گروههای ۸ تایی موشی استفاده شد (۸، ۱۰).

بررسی اثر عصاره بر بقای درون ماکروفاژی بروسلا

پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش به پلیتهای کشت سلولی وارد($۰/۲۷\times۱۰^{۴}$ ماکروفاژ در هر چاهک) و ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد Co_2 گرماگذاری شد (۸، ۱۰). سپس بروسلا ملی تنسیس(Rev1) و بروسلا آبورتوس (S ۱۹) (تهیه شده از انستیتو رازی) جداگانه به پلیتها اضافه شد تا مقدار باکتریها برابر با (۵×۱۰^{۵} CFU/ml)شود. بعد از ۲ ساعت گرماگذاری در شرایط ذکر شده، بلع باکتریها توسط ماکروفاژها با تهیه گسترش از چاهکهای پلیت بر روی لام و رنگ آمیزی گیمسا بررسی و تایید شد (۱۰). سپس جنتامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به چاهکها اضافه و یک ساعت در شرایط ذکر شده گرماگذاری شد (۱۰، ۱۱، ۱۲).تا باکتریهای خارج سلولی حذف شوند (موثر بودن غلظت و مدتزمان ذکر شده برای جنتامایسین بر روی بروسلا قبلاً موردبررسی و تایید قرار داده بودیم) بعد از این مدت زمان برای اطمینان از حذف باکتریهای خارج سلولی از محیط کشت سلولی بر روی آگارکشت دادیم، سپس محیط کشت سلولی به آرامی تعویض شد و به همراه رقتهای عصاره (۱:۴۰، ۱:۸۰، ۱:۱۶۰، ۱:۳۲۰، ۱:۶۴۰) با کنترل مثبت (چاهک فاقد عصاره که به جای عصاره به آن نرمال سالین اضافه شده بود) گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ روی پلیت از گرماگذاری ۵ روزه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۰درصد Co_2 مورد شمارش و محاسبه قرار گرفت (۱۲، ۱۳).

آنالیز آماری

درصد ماکروفاژهای زنده در ۲۴ ساعت بعد از مواجه با رقتهای مختلف عصاره و تعداد کلونیهای رشد کرده باکتریها بعد از لیز ماکروفاژها برای هر چاهک جداگانه محاسبه شد و میانگین آن برای هر گروه در جداول مربوطه آورده شد. اختلاف معنی دار بین گروهها به وسیله آنالیز واریانس one- way ANOVA و P<0.01 محاسبه شد.

یافته‌ها

تعیین مقدار کمی آلیسین به روش HPLC

$$\%\text{آلیسین} = \frac{S_1 m_2 \times ۲۲/۷۵}{S_2 m_1}$$

$$\text{mg/سیرg آلیسین } ۱/۷۶=۰/۱۷ = \frac{۷۷۰۰۲۰۰ \times ۰/۰۲۰ \times ۲۲/۷۵}{۲۸۴۶۵۵۳۰\times۰/۷۰}$$

جدول ۱: میانگین درصد ماکروفاژهای زنده در زمان صفر و ۲۴ ساعت بعد از تماس با عصاره

درصد ماکروفاژهای زنده	رقت عصاره
۸۳±۷	بدون عصاره در زمان صفر
۷۸/۶±۶	کنترل (بدون عصاره) ۲۴ ساعت بعد
۲۶/۴±۴*	۱:۲۰ عصاره ۲۴ ساعت بعد
۶۹±۶	۱:۴۰ عصاره ۲۴ ساعت بعد
۷۸/۲±۸	۱:۸۰ عصاره ۲۴ ساعت بعد
۸۵/۵±۳	۱:۱۶۰ عصاره ۲۴ ساعت بعد

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (p<0.01)**

با توجه به مقدار کمی آلیسین در فرمول فوق غلظت آلیسین در رقت ۱:۲۰ عصاره برابر با ۱۰۷۱ میکروگرم بر میلی لیتر، در رقت ۱:۴۰ عصاره ۴۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر ، در رقت ۱:۸۰ برابر با ۲۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر، در رقت ۱:۱۶۰ برابر با ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، در رقت ۱:۳۲۰ عصاره ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در رقت ۱:۶۴۰ برابر با ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

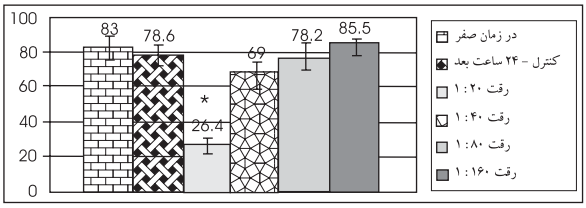
جدول ۲: میانگین تعداد باکتریهای درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی محیط آگاردار بعد از لیز ماکروفاژها بر حسب CFU/ml (مقدار تلقیح اولیه ۵×۱۰^{۵} CFU/ml است)

رقت / سویه	کنترل	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰
S ۱۹	*$(۱۰۶\pm۵)\times۱۰^{۳}$	* عدم رشد	* عدم رشد	*۱/۲±۱	*۱۷۶±۱۰۰	*$(۶۴\pm۷)\times۱۰^{۲}$
Rev ۱	*$(۲۲۷\pm۳)\times۱۰^{۳}$	* عدم رشد	* عدم رشد	*۱/۸±۱	*۱۸۷±۱۰۰	*$(۹۵\pm۲)\times۱۰^{۲}$

روی بروسلا آگار کشت شد. تعداد کلونیهای تشکیل شده بر

بررسی اثر عصاره بر روی ماکروفاژها

نتایج شمارش درصد سلولهای زنده نشان داد که رقت ۱:۲۰ اختلاف معنی داری با بقیه گروهها دارد و در حقیقت به جز رقت ۱:۲۰ عصاره رقتهای بعدی اثر مهاری بر روی ماکروفاژهای صفاقی را ندارند و می‌توان از این رقتها برای بررسی اثر عصاره بر روی بروسلای درون ماکروفاژی استفاده کرد.



شکل ۱: نمودار میانگین درصد ماکروفاژهای زنده در زمان صفر و ۲۴ ساعت بعد از تماس با عصاره (ستاره نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p<0.01$ است)

بررسی اثر عصاره بر بقای ماکروفاژهای بروسلا

نتایج شمارش باکتریهای رشد کرده بر روی پلیت بعد از لیز ماکروفاژها نشان داد که عصاره در رقتهای ۱:۴۰ ، ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰ باعث نابودی بروسلاهای درون ماکروفاژی در ۲۴ ساعت می‌شود. در بررسی یافته های آماری نیز اختلاف معنی‌داری بین تعداد باکتریهای درون ماکروفاژی رشد کرده بر روی آگار در ۲۴ ساعت بعد از تماس با رقتهای عصاره با گروه کنترل بود و همه رقتهای استفاده شده اختلاف معنی‌داری را ($P<0.01$) با گروه کنترل نشان دادند.

بحث

برای بررسی اثر عصاره سیر حاوی آلیسین بر روی بروسلای داخل ماکروفاژی ابتدا باید از عدم مهارکنندگی عصاره بر روی ماکروفاژها اطمینان حاصل می شد. برای این منظور اقدام به بررسی اثر عصاره بر زنده ماندن ماکروفاژها در ۲۴ ساعت پس از تماس آنها با رقتهای مختلف عصاره کردیم. نتایج نشان داد که رقتهای بعد از ۱:۲۰ اثر مهاری بر روی ماکروفاژها ندارند ولی رقت ۱:۲۰ به علت غلظت بالای عصاره بر روی ماکروفاژها اثر مهاری نشان می دهد. بنابراین در بررسی اثر عصاره بر بروسلاهای درون ماکروفاژی از رقتهای ۱:۴۰ تا ۱:۶۴۰ استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که در رقتهای ۱:۴۰ و ۱:۸۰ هر دو سویه باکتری پس از ۲۴ ساعت نتوانسته اند در داخل ماکروفاژ زنده بمانند. در رقت ۱:۱۶۰ نیز همانند دو رقت قبلی ماکروفاژها توانسته اند تقریباً تمامی باکتریها را نابود کنند. در رقت ۱:۳۲۰ نیز درصد قابل توجهی از بروسلاها در همان ۲۴ ساعت اول نابود می شوند ولی در رقت ۱:۶۴۰ به علت کاهش شدید مقدار عصاره تعداد بیشتری از باکتریها زنده می مانند. همچنین اثر عصاره بر کاهش بقای درون ماکروفاژی بروسلا برای هر دو سویه با اندکی تفاوت یکسان است. آلیسین و عصاره سیر اثرات ضد میکروبی و سیعی دارد که از جمله آنها می‌توان به مهار رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، هلیکوباکتر پیلوری ، استافیلوکوکها ، استرپتوکوکها، بروسلا و سالمونلا اشاره کرد (۱۴، ۱۵).

با توجه به ایمونولوژی بروسلوزا دو طیف از سلولهای سیستم ایمنی نقش خیلی مهمی در ریشه کنی بروسلوز دارند که شامل لنفوسیتهای- تی و ماکروفاژها است. ماکروفاژها با فاگوسیتوز باکتری سعی در از بین بردن بیماری دارند و لنفوسیتهای- تی با ترشح سایتوکاینها باعث فعال‌سازی و افزایش قدرت ماکروفاژها می‌شوند (۲، ۱۳، ۱۶). Lau و همکاران اثر عصاره سیر را بر روی ماکروفاژهای صفاقی موش و لنفوسیتهای طحالی موش مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که عصاره سیر باعث افزایش قدرت انفجاراکسیداتیوی ماکروفاژها و افزایش بلاستوژنز در لنفوسیتهای- تی می‌شود (۱۷). از طرفی یکی از مکانیسمهای مهم بقای درون ماکروفاژی بروسلا غیرفعال کردن انفجار اکسیداتیوی ماکروفاژ است (۳، ۱۱، ۱۶). بنابراین می‌توان گفت که ترکیبات سیر علاوه بر اثر ضد میکروبی بر روی بروسلا در فعال نمودن سلولهای فاگوسیت کننده بروسلا برای از بین بردن باکتری هم نقش دارند Kang و همکاران در یک بررسی مشابه اثر آلیسین بر ماکروفاژهای صفاقی موش نتیجه گرفتند که آلیسین باعث افزایش در تولید اینترلوکین-۱ ، تولید H_2O_2 و فاکتور نکروز دهنده توموری (TNF-α) می‌شود (۱۸). در تحقیق دیگر Salman و همکاران (۱۹). اثر ترکیبات سیر را بر روی پاسخهای ایمنی سلولهای خون محیطی انسان بررسی کرد. ایشان نیز نتیجه گرفتند که سیر باعث افزایش تولید اینترلوکین-۱ ، اینترلوکین-۲ و افزایش قدرت فاگوسیتوزی سلولهای سیستم ایمنی می‌شود.

بررسیهای قبلی اثرات ضد میکروبی سیر بر روی انواع باکتریها در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) بود ولی ما در تحقیق خود تلفیقی از بررسی اثر سیر بر روی بروسلا و ماکروفاژ را انجام دادیم و نشان دادیم که عصاره سیر می‌تواند بر بروسلای درون ماکروفاژی اثر کند و باکتریها را از بین ببرد.

با توجه به اثر سیر در فعال‌سازی و تقویت عملکردهای ماکروفاژها و لنفوسیتهای- تی و نقشی که این دو طیف از سلولهای سیستم ایمنی در ریشه کنی بروسلوز دارند و با توجه به اثر ضد میکروبی سیر بر روی بروسلای درون ماکروفاژی لزوم استفاده از سیر و ترکیبات آن در درمان بروسلوز حداقل در کنار شیمی درمانی نمایان می شود. این مورد خصوصاً در بروسلوز دامی مهمتر می باشد. زیرا بیماری در دام و حیوانات شدیدتر بوده و به درمان آنتی بیوتیکی جواب نمی‌دهد و تنها راه پیشگیری با واکسیناسیون و رعایت اصول بهداشتی است. واکسیناسیون نیز برخی مشکلات خاص خود را دارد و باعث ایمنی صددرصد نمی‌شود (۲۰). بنابراین از مهمترین جاهایی که می‌توان استفاده از سیر و ترکیبات آن را در درمان بروسلوز دامی مطرح کرد.

References

1. Gorvel JP, Edgardo M: Brucella intracellular life: invasion to intracellular replication, Vet. Microbio. 2002; 90: 281-297

2. Ignacio TM, Enrique Gs: Correspondence In vitro activitries of five new antimicrobiol agenst against Brucella melitensis. Antimicro. 1999; 12: 185-186

3. Almiron M, Martinez M: Ferrochelatase Is Present in Brucella abortus and Is Critical for Its Intracellular Survival and Virulence, Infec Immun. 2001; 69(10): 6225-6230

4. Agarwal KC: Therapeutic actions of garlic constituents. Med Res Rev, 1996; 16: 111-124

۵. حسامی، شهره. بررسی تغییرات مورفولوژی و بیوشیمیایی سودوموناس آئروژینوزا در مجاورت عصاره کلروفرمی سیر حاوی آلیسین. پایان نامه کارشناسی ارشد باکتری شناسی. دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۸

۶. صمصام شریعت، سید هادی، عصارهگیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روشهای ارزیابی آنها. انتشارات مانی ۱۳۷۱

7. Block E, Naganthan S: Allium Chemistry HPLC Analysis of Thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic, leek, elephant garlic and chive. J Agric Food Chem, 1992; 40: 2418-2430

8. Naroeni A, Francois P: Role of Cholesterol and the Ganglioside GM_1 in Entry and Short – Term Survival of Brucella suis in Murine Macrophages. Infec Immun. 2002; 70(3): 1640-1644

9. Leslie H, Hay FC: Practical Immunology. Black well Scientific pud. Third ed 1997

10. Lin J, Ficht TA: Protein Synthesis in Brucella abortus Induced during Macrophage Infection, Infec. Immun. 1995; 63(4): 1409-1414

11. Kohler So: Induction of dnak through Its Native Heat Shock Promoter Is Necessary for Intramacrophagic Replication of Brucella suis, Infec. Immun. 2002; 70(3): 1631-1634

12. Sun YH, Hartigh AB: virB-Mediated Survival of Brucella abortus in Mice and Macrophages is Independent of a Functional Inducible Nitric Oxid Synthase or NADPH Oxidase in Macrophages , Infec. Immun . 2002; 70(9): 4826-4832

13. Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F: Screening of some Indian medical plants for their antimicrobial properties, J ethnopharma. 1998; 62: 183-193

14. Sharma VD: Antimicrobial property of Allium Sativum in vivo & in vitro studies, Ind. J Exp Biol. 1997; 15: 466-468

15. Adetumbi MA, Lau BH: Allium sativum (garlic) - A natural antibiotic, Med. Hypothesis 1983; 12: 227-237

16. Jinkyung K, Splitter GA: Molecular Host – Pathogen Interaction in Brucellosis: Current understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans, Cli Mic Rev. 2003; 16(1): 65-78

17. Lau BH, Yamasaki T, Gridley DS: Garlic compounds modulate macrophage and T-Lymphocytes functions. Mol. Biother 1991; 3(2): 103-107

18. Kang NS, Moon EY, Cho CG: Immunomodulating effect of garlic component , allicin , on murine peritoneal macrophages. Nat Res 2001; 21: 617-626

19. Salman H, Michael B, Hanna B, Igor P: Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. Inten J Immunopharma. 1999; 21: 589-597

20. The Development of New/Improved Brucellosis vaccines: Report of WHO Meeting, WHO / EMC/ZDI/ 98. 14, Geneva, Switzerland, 1997; 11-12

بیان متمایز دو واریانت مختلف Survivin در طی تکوین مغز موش

مجتبی عمادی بایگی M.Sc.[☆]، سید جواد مولی Ph.D.[☆♦]، پروانه نیک پور M.Sc[☆]، تقی طریحی Ph.D.[★]

☆دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی:۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

پست الکترونیک: Email: sjmowla@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۱

* **هدف:** بررسی بیان متمایز واریانتهای مختلف ژن survivin در طی تکوین جنینی و پس از تولد در مغز موش

* **مواد و روشها:** از ۲۷ سر موش نژاد NMRI در ۹ گروه سنی مختلف (تعداد ۳ سر در هر گروه) شامل: جنینهای ۱۱ و۱۷ روزه و موش های تازه متولد شده تا یک ماهه، به فاصله هر پنج روز، نمونه گیری به عمل آمد. RNAی کل از هر مغز استخراج شد و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمر الیگو dT و آنزیم M-MLV انجام شد. cDNAی حاصل با پرایمرهای اختصاصی برای survivin و بتا ۲- میکروگلوبولین (به عنوان کنترل داخلی)، طی واکنش زنجیره ای پلیمراز تزاید یافت.

* **یافته ها:** نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که survivin در طی تکوین جنینی و پس از تولد در مغز موش بیان می‌شود. واکنش RT-PCR در مورد survivin، دو محصول تزاید یافته را با شدت های مختلف نشان داد. میزان بیان واریانت بزرگتر (survivin۱۴۰) در قبل و هنگام تولد به طور معنی داری بیشتر از بیان آن در طی تکوین پس از تولد است.

* **نتیجه گیری:** نتایج بیانگر آن است که بیان survivin ۱۴۰ در طی تکوین مغز تحت کنترل است. این کنترل، احتمالاً در هموستاز بافت مغز و تکوین سیناپس ها نقش دارد.

گل واژگان: آپوپتوز، مغز، تکوین، Survivin، RT-PCR

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۸۴-۸۱

مقدمه

برای حفظ هومئوستاز بافتی می بایستی موازنه‌ای دقیق بین زایش (میتوز) و مرگ (آپوپتوز) سلولها وجود داشته باشد. به هم خوردن این موازنه می‌تواند ناهنجاریهای متعددی مانند تومورزایی (زایش بیش از حد سلولی) و بیماریهای تحلیل رونده عصبی نظیر آلزایمر (مرگ بیش از حد سلولی) را ایجاد کند. جمعیت سلولی در یک بافت نه تنها به وسیله کنترل نرخ تقسیم سلولها بلکه به وسیله کنترل میزان مرگ سلولها تنظیم می شود. چنانچه سلولی مورد نیاز نباشد (بر اثر پیر شدن و یا آسیب غیر قابل تعمیر به DNA ی سلول) آن سلول به وسیله فعال کردن یک برنامه مرگ کنترل شونده داخل سلولی متعهد به خودکشی می شود. این فرایند مرگ برنامه ریزی شده و یا آپوپتوز نامیده می‌شود (۱، ۲).

میزان وقوع آپوپتوز در حین تکوین و نیز در بافتهای بالغ می‌تواند تا حد غیر منتظره ای بالا باشد. در تکوین سیستم عصبی مهره داران به طور طبیعی بیش از نیمی از نورونهای اولیه بلافاصله پس از زایش می‌میرند. این نورونها برای زنده ماندن نیازمند دریافت فاکتورهای رشد از بافت هدف خود می باشند. این فاکتورها به میزان بسیار محدودی تولید می شوند و نورونها برای دریافت این فاکتورها و زنده ماندن با یکدیگر رقابت می کنند. در پایان تنها آن دسته از نورونها زنده می مانند که با بافت هدف خویش ارتباط فیزیکی نزدیکی (تولید سیناپس) ایجاد کرده باشند (۳، ۴).

مسیرهای مولکولی منتهی به آپوپتوز در مسیر تکاملی کاملاً حفظ شده هستند و به وسیله پروتئینهای متعددی کنترل می شوند که یا در پیشبرد فرایند(Pro-Apoptotic) و یا در مهار آن (Anti-Apoptotic) عمل می کنند (۱، ۲). Survivin، مهارکننده آپوپتوزی است که شامل یک دامین تکراری IAP[1] باکولوویروسی بوده (۵) و قادر به تنظیم فرایندهای تکثیر سلولی و مرگ سلولی است. این پروتئین، آپوپتوز را به وسیله مهار مستقیم کاسپاز۳ و ۷ که پروتئازهای اجرایی اصلی در مسیرهای آپوپتوزی هستند، سرکوب می‌کند (۶). این ژن ترجیحاً در بافتهای جنینی و توموری که نرخ تقسیم بالایی دارند، بیان می‌شود و در سلولهای تمایز یافته بیان آن خاموش می‌شود (۵). این ویژگی سبب شده تا survivin به عنوان یک تومور مارکر جهان شمول مورد توجه قرار گیرد.

Survivin موشی دارای ۴ اگزون بوده و بر روی کروموزوم ۱۱E۲ قرار دارد. تاکنون ۳ واریانت مختلف ویرایشی از این ژن در موش گزارش شده است که سه پروتئین با نقشهای فیزیولوژیک

1. Inhibitor of Apoptosis

منحصر به فرد را تولید می‌کند (۷). بزرگترین واریانت (survivin۱۴۰) محتوی هر ۴ اگزون بوده و به یک پروتئین ۱۴۰ اسید آمینه ای ترجمه می‌شود (نمودار ۱). این واریانت حاوی یک تکرار IAPمنفرد بوده که مسئول عملکرد ضد آپوپتوزی آن است و نیز دارای یک دامین coiled-coil بوده که فعالیت زیستی پروتئین را به چرخه سلولی مرتبط می سازد. واریانت دیگر، (survivin۱۲۱)، فاقد اگزون ۴، دامین coiled-coil، بوده و لیکن بخشی از اینترون ۳ را نیز داراست. واریانت سوم (survivin ۴۰) فقط حامل اگزونهای یک و سه است، فاقد هر دو دامین IAP و coiled-coil بوده و احتمالاً فاقد فعالیت ضد آپوپتوزی است (نمودار ۱). بیان هر سه واریانت با نسبتهای متفاوت در حین تکوین (از روز ۷/۵ بعد از تشکیل پلاگ) گزارش شده است (۷).

در این تحقیق سعی شده است تا میزان بیان واریانتهای مختلف ژن survivin درمغز موش در طی دوران جنینی و نیز در طی تکوین پس از تولد بررسی و با گزارشات قبلی در مورد دیگر بافتها مقایسه شود. نتایج به دست آمده وجود دو واریانت ویرایشی (Survivin ۱۴۰ و survivin ۴۰) را گزارش می‌کند هر دو واریانت در دوران تکوین قبل و بعد از تولد مغز بیان می شوند. از این میان، بیان واریانت بزرگتر (survivin ۱۴۰) در تکوین قبل از تولد بیش از بیان آن در دوران پس از تولد می‌باشد.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی

موشهای نر نژاد NMRI از انستیتو رازی خریداری و تحت شرایط استاندارد از نظر آب و غذا و دیگر شرایط محیطی نگهداری شدند. گروه های سنی عبارت بودند از: جنینهای ۱۱ روزه و ۱۷ روزه (پس از تشکیل پلاگ) موش ۱ روزه (تازه متولد شده) و نیز موشهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روزه، از هر گروه سنی تعداد سه سر موش بررسی شد.

بیوپسی مغز

موشها را به روش در رفتگی مهره های گردن (Cervical dislocation) و یا به وسیله کلروفرم کشته و بعد از باز کردن جمجمه، مغز را خارج نموده و آن را در میکروتیوپی استریل و RNase-free قرار دادیم. این میکروتیوپ بعد از قرار گرفتن در نیتروژن مایع، تا مرحله استخراج در دمای ۸۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA ی کل (Total RNA) از بافت مغز

RNA ی کل با استفاده از محلول RNX plus (سیناژن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، و نیز گزارش قبلی (۸) استخراج گردید.

بررسی کمی و کیفی RNA ی استخراج شده

غلظت یک در صد از RNA تهیه شد و جذب نوری آن در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد. غلظت RNA بر حسب µg/µl به کمک رابطه زیر محاسبه شد:

RNA]=A]۲۶۰ x dilution x ۴۰/۱۰۰۰

نسبت $A_{۲۸۰}$ / $A_{۲۶۰}$ نیز به منظور تعیین درجه خلوص RNA محاسبه شد.

ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر با بافر TBE تهیه شد و در هر چاهک ۵ میکرو لیتر از نمونه به علاوه ۲ میکرو لیتر بافر Loading (برموفنل بلو ۰/۲۵ درصد، زیلن سیانول ۰/۲۵ درصد و گلیسرول ۳۰ درصد) ریخته شد و به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۶۰–۷۰ ولت الکتروفورز گردید و سپس در زیر نور ماورائ بنفش بررسی و عکس‌برداری شد.

پرایمرها

در این تحقیق، ژن β_2m)-$\beta_2$microglobulin) به عنوان کنترل داخلی انتخاب و از پرایمرهای توصیف شده در منبع (۸) استفاده شد. برای طراحی پرایمر بر روی ژن survivin موش توالی‌های مورد نیاز از طریق سایت اینترنتی NCBI (۹) با شماره دستیابی (Accession Number) AF۱۱۵۵ ۱۷ به دست آمد. پرایمر بالادست و پایین دست ژن Survivin به ترتیب روی اگزون‌های یک (از نوکلئوتید ۵۶ تا ۸۶) و سه (از نوکلئوتید۲۸۱ تا ۳۱۰) به صورت زیر و بر اساس منبع (۷)، سفارش داده شدند. همچنین در تعدادی از واکنشهای PCR از پرایمر پایین دست دومی مستقر بر اینترون ۳ (از نوکلئوتید ۶۴۰۹ تا ۶۴۲۷) استفاده شد:

۵'-TCGCCACCTTCAAGAACTGGCCCTTCCTGGA-۳': پرایمر بالادست

۵'-GTTTCAAGAATTCACTGACGGTTAGTTCTT-۳': پرایمر پایین دست۱

۵'-GGCTTCTGACAATGACAATGCTTG-۳': پرایمر پایین دست۲

پرایمرهای فوق و نیز پرایمر oligo (dT) با طول ۱۸ نوکلئوتید توسط شرکت MWG آلمان و با درجه خلوص HPSF [۱] ساخته شدند. در مورد کلیه پرایمرها، جستجو با استفاده از نرم افزار Blast (۱۰) با ژنوم موش انجام شد تا از یکتابودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم موش نشان داد که کلیه پرایمرها محل باند شدن منحصر به فردی را دارا می‌باشند.

واکنش Reverse Transcription) (RT

۵ میکروگرم از RNAی به دست آمده از بیوپسی مغز با یک میکرولیتر) dNTP ۱۰ (mM [Eurobio] یک میکرولیتر الیگو dT (۰/۵ میکروگرم) و آب به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر [Techne] انکوبه شد و پس از انتقال بر روی یخ، بافر تکثیر ۵X [Invitrogen]: ۴ میکرولیتر، [DDT]Invitrogen(۰/۱ M):۲

1.High Purified Salt Free