

بررسی تاثیر آلپسین سیر بر میزان تولید نیتریک اکساید ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلیکس

مریم سلطانی^۱، محدثه لاری پور^{۱*}، عباس اخوان سپهی^۲، مرتضی پیرعلی همدانی^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، گروه قارچ شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران دارویی، تلفن و نمابر: ۶۶۰۳۵۰۳۱ (۰۲۱)

پست الکترونیک: mlarypoor@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۰

چکیده

مقدمه: سیر، گیاهی علفی با ترکیبات متنوعی است که یکی از مهم ترین آنها آلپسین با خواص آنتی بیوتیکی می باشد. قارچ کاندیدا آلیکس، مخمری فرصت طلب است که در صورت نقص سیستم ایمنی، عامل بیماری زایی محسوب می شود. مکانیسم های ایمنی در برابر این قارچ، ماکروفاژها هستند که با مکانیسم کشندگی وابسته و غیروابسته به اکسیژن عمل می کنند به طوری که مکانیسم وابسته به اکسیژن، شامل تولید واسطه های فعال اکسیژنی و نیتروژنی است که توسط ماکروفاژهای تولید می شوند و از این طریق میکروارگانیسم ها را از بین می برند.

هدف: با توجه به خواص سیر و اثرات مفید احتمالی آلپسین سیر بر روی فعالیت ضدقارچی ماکروفاژها تاثیر آلپسین سیر بر میزان تولید نیتریک اکساید ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلیکس بررسی شد تا سیر در درمان بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مبتلا به کاندیدایازیس مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی: در این تحقیق اثر آلپسین سیر بر فعالیت ماکروفاژها در میزان آزادسازی نیتریک اکساید در برابر کاندیدا آلیکس بررسی می شود بدین منظور آلپسین سیر به روش عصاره کلروفرمی به دست آمد و بر روی ماکروفاژهای موش Balb/c از جنس نر با سن ۸ - ۶ هفته در شرایط آزمایشگاهی اثر داه شد و کاندیدا آلیکس را در دو گروه آلپسین دار و بدون آلپسین با ماکروفاژها همراه کرده و نهایتاً پس از مقایسه با نمونه های کنترل مثبت و منفی، میزان فعالیت ماکروفاژها از طریق تولید نیتریک اکساید بررسی شد.

نتایج: پس از بررسی میزان نیتریک اکساید تولیدی توسط ماکروفاژها، نتایج نشان داد که آلپسین به عنوان یک ماده طبیعی باعث تحریک سیستم ایمنی در برابر این قارچ می شود به طوری که ماکروفاژهای همراه شده با آلپسین، میزان نیتریک اکساید تولیدی بیشتری در مقایسه با گروه بدون آلپسین داشتند و این با مقایسه نتایج به دست آمده از این دو گروه و گروه های کنترل، به دست آمد. نتیجه گیری: با توجه به اهمیت اثر عامل کاندیدا آلیکس در ایجاد کاندید یازیس و احتمال استفاده این قارچ از مواد مهارتی خود جهت جلوگیری از فعالیت ماکروفاژها و تولید نیتریک اکساید، همچنین با مقایسه مقالات و نتایج دیگران، به این نتیجه رسیدیم که آلپسین به دست آمده از سیر، می تواند تاثیرات بالایی بر روی فعالیت ماکروفاژها در تولید NO در برابر عوامل کاندیدایازیس داشته باشد.

کل واژگان: کاندیدا آلیکس، آلپسین، نیتریک اکساید، ماکروفاژ



مقدمه

سیر^۱، از خانواده زنبق است که واجد خواص آنتی‌بیوتیکی بی‌شماری از جمله اثرات ضدویروسی، باکتری، انگلی و قارچی می‌باشد [۲،۱].

از ترکیبات سیر، ارگانسولفور (آلئین، آلیسین)، اسیدهای آلی، کربوهیدرات و ویتامین‌ها را می‌توان نام برد که مهم‌ترین خواص سیر مربوط به آلیسین یا روغن سیر^۲ با وزن مولکولی ۱۶۲/۳ می‌باشد و خواص ضد میکروارگانیسمی را به آن نسبت می‌دهند [۳]. این ترکیب بخش عمده‌ای از خواص آنتی‌بیوتیکی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کولین A سنتتاز ایفا می‌کند به طوری که با مهار این آنزیم، موجب مهار بیوسنتز لیپید و اسیدهای چرب شده و در نهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی سلول می‌شود [۳].

یکی از خصوصیات مهم آلیسین، قابلیت نفوذپذیری و عبور از طریق فسفولیپیدهای غشاء است که آزادانه از غشاء عبور کرده و باعث اثر خود می‌شود [۴].

آلیسین به عنوان یک جزء اصلی از مسیر، نقش مهمی در مهار مرگ سلولی ماکروفاژها در موارد سوء تغذیه، ایفا می‌کند به طوری که این ترکیب باعث تحریک و فعال‌سازی ماکروفاژها در این شرایط می‌شود [۵]. هم‌چنین اثرات ایمنومد و لاتوری و تنظیمی آلیسین روی ماکروفاژهای پری‌توئن موش، نشان از افزایش فعالیت ماکروفاژها می‌باشد [۶] آلیسین با اثر تحریکی روی ماکروفاژها، باعث افزایش سنتز نیتریک اکساید ایجاد می‌شود [۷].

همان‌طور که مطرح شد، یکی از خواص مهم این ماده روغنی زردرنگ، مربوط به اثرات ضد میکروبی و قارچی می‌باشد و باعث مهار رشد قارچ‌ها به خصوص کاندیدا آلبیکنس می‌شود [۱،۲] کاندیدا آلبیکنس، قارچ فرصت‌طلبی است که به طور طبیعی در سطح مخاطی افراد سالم وجود دارد و در شرایط مستعد (تضعیف سیستم ایمنی، دیابت ملیتوس، سوء تغذیه، تروما، سرطان خون، استفاده آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف، نقش کلیوی) به فرم پاتوژن تبدیل شده و باعث

^۱ *Allium sativum* L. ^۲ Diallyl thiosulfinate

بیماری‌های مختلف می‌شود [۹] ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلبیکنس نقش اصلی را بر عهده دارند و از طریق تولید نیتریک اکساید در دفاع شرکت می‌کنند [۱۰] می‌توان ماکروفاژها را که نقش مهمی در جلوگیری از ایجاد کاندیدا یازیس دارند، فعال نمود و در اثر فعال شدن ماکروفاژها، اثر بیگانه‌خواری و مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن را افزایش داد و به این ترتیب قدرت انهدام کاندیدا آلبیکنس را در آنها بالا برد بنابراین با توجه به اهمیت نقش سیر و ترکیبات آن و اثربخشی بر روی عوامل میکروارگانیسمی مختلف، بررسی و تحقیق در زمینه اثر آلیسین بر روی فعالیت ماکروفاژها و افزایش فعالیت آنها از طریق تولید نیتریک اکساید در نابودی آلبیکنس بسیار حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

عصاره آبی سیر، از قراردادن نیم کیلو سیر [۹] در مخلوط‌کن همراه با آب مقطر و رد کردن از صافی، به دست آمد و پس از همراه کردن کلروفرم و قراردادن در قیف دکانتور، عصاره کلروفرمی جدا شد که با اتصال به دستگاه تقطیر در خلاء، عصاره غلیظ روغنی زرد تا سبز (آلیسین) حاصل شد [۸].

مقدار کمی آلیسین به روش کروماتوگرافی با کارایی بالا HPLC توسط شرکت داروسازی کوثر محاسبه شد و 0.05 ± 1.70 میلی‌گرم در هر گرم سیر به دست آمد. سپس با تزریق ۱۰ میکرولیتر، RPMI-1640 به صفاق موش‌های آزمایشگاهی Balb/c تزریق شد و پس از خارج‌سازی ماکروفاژها از صفاق، در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر، کشت داده شد و در انکوباتور CO₂ دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ - ۲ ساعت نگهداری شد [۹].

به منظور بررسی اثر آلیسین روی ماکروفاژها، آزمایش به صورت Triplicate انجام شد. در تمامی چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه حاوی 2×10^5 ، ماکروفاژ، ریخته و پس از قرار دادن در انکوباتور به مدت ۲ ساعت مایع رویی به منظور جدا کردن سلول‌های ماکروفاژ غیرچسبنده



برای اندازه‌گیری نیتریک اکساید تمام میکروتیوپ‌های حاوی محیط رویی کشت سلولی یک دقیقه در دور ۷۰۰ - ۶۰۰ سانتریفوژ شد. سپس از غلظت‌های و مایع رویی کشت سلولی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام در چاهک‌ها ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس اضافه کرده و پس از ده دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، طیفی از رنگ‌های ارغوانی بر اساس میزان نیتريت ایجاد شد که با طول موج ۵۴۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر میزان جذب (OD) توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های نیتريت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد OD در معادله خطی رگرسیون محاسبه و به صورت میکرومولار بیان شد [۱۱].

نتایج

با قرار دادن OD (جذب) هر یک از نمونه‌های آزمایش در معادله خط رگرسیون غلظت نیتريت نمونه‌ها محاسبه شد که به عنوان شاخصی از نیتريت اکساید هر نمونه بود. نتایج در جدول شماره ۱ آمده است.

معادله خطی رگرسیون در سنجش غلظت نیتريت اکساید ماکروفاژ به قرار زیر است:

$$C = 98/131 X - 0/1338 \times OD$$

خارج شد. به ۳ چاهک اول (تست) ۱۰ میکرولیتر و پس از ۲۴ ساعت قرار دادن در انکوباتور، کاندیدا آلبیکنس در چاهک‌های اول و چهارم اضافه شد.

جهت تهیه سوسپانسیون قارچ، تعداد قارچ به میزان 1×10^7 در یک سی سی RMI تهیه شد و سپس به چاهک‌های کنترل مثبت و منفی به ترتیب INF- γ و LPS به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت در انکوباتور، مایع رویی چاهک‌ها جمع‌آوری و در فریزر جهت آزمایش نیتريت اکساید نگهداری شد. که غلظت نیتريت آن، به عنوان شاخص تولید نیتريت اکساید می‌باشد و میزان آن توسط رنگ سنجی گریس تعیین می‌شود. جهت تهیه این معرف ۰/۱ گرم از نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده و یک گرم سولفانیل آمید در ۱۰۰ سی سی اسید فسفریک ۵ درصد حل شد. از نیتريت سدیم با وزن مولکولی ۶۹ به منظور تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. بنابراین غلظت‌های ۱۰۰۰۰ میکرومولار تهیه و از این غلظت ۱ سی سی برداشته غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه و سپس ۱/۲ رقیق کرده و غلظت ۵۰ میکرومولار تهیه شد.

سپس منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم ترسیم شد که برای رسم آن خط رگرسیون و معادله خط از نرم‌افزار Excel استفاده شد. معادله خطی رگرسیون در سنجش غلظت نیتريت اکساید ماکروفاژ به قرار زیر است:

$$C=98/131 X-0/1338 \times OD$$

جدول شماره ۱- مقایسه بین دو گروه آلیسین‌دار و بدون آلیسین در کشت ماکروفاژ و سنجش میزان جذب نیتريت اکساید

گروه	موش	۱	۲	۳
میزان جذب نیتريت اکساید در نمونه آزمایش (ماکروفاژ + آلیسین + کاندیدا آلبیکنس)		۰/۱۹۳ ۰/۲۳۰ ۰/۱۹۱	۰/۳۳۱ ۰/۳۲۷ ۰/۳۳۵	۰/۲۳۵ ۰/۱۹۵ ۰/۲۴۰
میزان جذب نیتريت اکساید در نمونه بدون آلیسین (ماکروفاژ + کاندیدا آلبیکنس)		۰/۰۸۳ ۰/۰۹۵ ۰/۰۸۸	۰/۱۵۲ ۰/۱۴۶ ۰/۱۴۹	۰/۰۹۲ ۰/۰۹۷ ۰/۰۹۳۰
میزان جذب نیتريت اکساید در کنترل مثبت (ماکروفاژ + LPS + γ -rINF)		۰/۲۲۰ ۰/۱۵۰ ۰/۱۸۰	۰/۳۰۵ ۰/۳۰۱ ۰/۳۰۳	۰/۲۴۰ ۰/۲۱۰ ۰/۲۶۰
میزان جذب نیتريت اکساید در کنترل منفی (ماکروفاژ)		۰/۰۹۲ ۰/۰۹۱ ۰/۰۹۳	۰/۱۱۴ ۰/۱۱۱ ۰/۱۱۲	۰/۱۱۴ ۰/۱۰۸ ۰/۱۱۰

برای مقایسه بین گروه‌ها به صورت تک تک از روش **bonferroni** استفاده شد (جدول شماره ۴). به عنوان مثال گروه ۱ با گروه ۲ اختلاف ۱۳/۸۶ به دست آمد و چون این اختلاف مثبت است یعنی میانگین گروه ۱ از ۲، ۱۳/۸۶ واحد بیشتر است پس نتیجه می‌گیریم که آلیسین دارای اثر تحریکی بیشتر در مقایسه با گروه بدون آلیسین بر روی ماکروفاژها داشته است و $Pvalue=0$ ، مصداق این گفتار است. در مقایسه گروه ۱ با ۳، اختلاف میانگین ۱/۱۷ مشاهده شد ولی با توجه به این که $Pvalue=1$ است، قویاً میانگین دو گروه با هم برابر است و این دلیلی بر اثر اینترفرون گاما و لپوپلی ساکارید باکتری گرم منفی در گروه کنترل مثبت می‌باشد. در حالت کلی گروه ۱ با ۳ و گروه ۲ با ۴ از نظر میانگین، با هم اختلافی ندارند.

برای مقایسه میزان گروه آلیسین‌دار نسبت به گروه بدون آلیسین ابتدا از آزمون ناپارامتری **Kruskal – Wallis** استفاده می‌کنیم. با توجه به جدول شماره ۲ و با استفاده از $Pvalue=0$ و با توجه به اینکه این مقدار کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد پس فرض H_0 رد می‌شود.

که فرض‌های آن در ذیل آمده است:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \quad i, j = 1, 2, 3, 4$$

$$i \neq j$$

برای اثبات درستی آزمون بالا آزمون **ANOVA** نیز انجام شد که با استفاده از $Pvalue=0$ آن، مجدداً فرض H_0 رد می‌شود (جدول شماره ۲ و ۳).

جدول شماره ۲ - آزمون ناپارامتری (رتبه‌بندی‌ها)

گروه مشاهده شده	تعداد	Mean rank (میانگین)
۱	۹	۲۸/۰۶
۲	۹	۹/۲۸
۳	۹	۳۶/۸۳
۴	۹	۹/۸۳
کل	۳۶	

جدول شماره ۳ - آزمون ANOVA

مشاهدات یک طرفه	مجموع میانگین‌ها	Df (درجه آزادی)	میانگین‌ها	F (آزمون فیشر)	Sig (Pvalue)
بین گروه‌ها	۱۶۷۲/۱۹۷	۳	۵۵۷/۳۹۸	۲۹/۵۱۰	۰/۰۰۰
درون گروه‌ها	۶۰۴/۴۲۲	۳۲	۱۸/۸۸۸		
کل	۲۲۷۶/۶۱۶	۳۵			



جدول شماره ۴ - روش bonferroni (مقایسه چندگانه)

(J) گروه (I) گروه	اختلاف میانگین (I-J)	ضریب خطا	Sig (Pvalue)	درصد اطمینان ۹۵ درصد	
				بالتر از حد	پایین تر از حد
۲	۱۳/۸۶۵۵۶	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	۱۹/۶۲۷۳	۸/۱۰۳۸
۳	۱/۱۷۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۱/۰۰۰	۶/۹۳۹۶	-۴/۵۸۴۰
۴	۱۴/۵۰۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	۲۰/۲۶۹۶	۸/۷۴۶۰
۱	-۱۳/۸۶۵۵۶	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	-۸/۱۰۳۸	-۱۹/۶۲۷۳
۳	-۱۲/۶۸۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	-۶/۹۲۶۰	-۱۸/۴۴۹۶
۴	۰/۶۴۲۲۲	۲/۰۴۸۷۵	۱/۰۰۰	۶/۴۰۴۰	-۵/۱۱۹۶
۱	-۱/۱۷۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۱/۰۰۰	۴/۵۸۴۰	-۶/۹۳۹۶
۲	۱۲/۶۸۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	۱۸/۴۴۹۶	۶/۹۲۶۰
۴	۱۳/۳۳۰۰۰	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	۱۹/۰۹۱۸	۷/۵۶۸۲
۱	-۱۴/۵۰۷۷۸	۲/۰۴۸۷۵	۰/۰۰۰	-۸/۷۴۶۰	-۲۰/۲۶۹۶
۲	-۰/۶۴۲۲۲	۲/۰۴۸۷۵	۱/۰۰۰	۵/۱۱۹۶	-۶/۴۰۴۰
۳	-۱۳/۳۳۰۰۰	۲/۰۴۸۷۵	۰	-۷/۵۶۸۲	-۱۹/۰۹۱۸

بحث

هدف اصلی این مطالعه، بررسی تاثیر آلپسین سیر بر روی فعالیت‌ها کروفازها در برابر کاندیدا آلبیکنس است. امروزه با توجه به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به انواع داروهای ضد میکروبی و مشکلاتی که این سویه‌ها در عفونت‌های بیمارستانی و در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌کنند، لزوم توجه بیشتر به داروهای گیاهی جدید بیشتر مطرح می‌شود. نتایج پژوهش‌هایی که در گذشته انجام شده نشان می‌دهد که حداقل تعدادی از عصاره‌های گیاهی اثر ضدقارچی خود را می‌توانند خیلی سریع نشان دهد و این مزیت بسیار مهم در استفاده از آنها برای مقاصد درمانی به شمار می‌آید [۱۱، ۱۴، ۱۵]. همچنین آلپسین باعث افزایش قدرت انفجار اکسیداتیوی و پاسخ‌های ماکروفازها در برابر کاندیدا آلبیکنس می‌شود و تولید فاکتورها و سیتولین‌های ماکروفازی مثل IL_1 و H_2O_2 را افزایش می‌دهد [۱۷، ۱۸]. ترکیبات سیر باعث افزایش قدرت فاکتوسیتوزی سلول‌های ایمنی می‌شود [۱۹]. با

این دیدگاه اثر تقویتی سیر و آلپسین بیشتر نمایان می‌شود زیرا باعث تقویت فعالیت‌های فاکتوسیتوزی ماکروفازها و ترشح فاکتورهای موثر آنها می‌شود. بررسی‌ها نشان داده شده که می‌توان مواد طبیعی همچون آلپسین را جهت فعال‌سازی ماکروفازها جایگزین عوامل مختلفی همانند $INF-\gamma$ (ایترفرون گاما) و BCG [۱۸، ۱۹] نمود، تا در افراد با نقص سیستم ایمنی که احتمال بروز بیماری‌های مختلف و عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله کاندیدا آلبیکنس زیاد می‌باشد، لازم است قبل از برخورد با این عوامل عفونی بدن آنها توسط محرک‌های سیستم ایمنی تقویت شود و باعث کاهش این بیماری‌ها در افراد مستعد شود. همچنین نتایج حاصله از تحقیق حاضر کاملاً مشابه پژوهش‌هایی است که محققین در گذشته انجام داده‌اند و در بالا به برخی از آنها اشاره شد. با استفاده از آزمون‌های آماری اثبات شد که آلپسین سیر قویاً، فعالیت ضدکاندیدیایی ماکروفاز را افزایش می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که این آزمایش به صورت *in vivo* نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.



1. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic: *Microbes Infect.* 1999; 1 (2): 125 - 9.
2. Yoshida H, et al. Anti microbial activity of the thiosulfinates from garlic extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63 (3): 591 - 4.
3. Nikolic V, Stankovic M, et al. *Antifungal activity of Allicin derived from garlic pharm.* 2004; 59 (11): 845 - 8.
4. Lip yong chung. The antioxidant properties of garlic compounds: Alliin, Allicin, Allyl Disulfide and Allyl cystein. *J. of Med. food* 2006; 9 (2): 205 - 13.
5. Focke M, felld A, lichtenthaler k. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, inhibits acetyl- coA synthetase. *FEBS lett.* 1990; 12; 261 (1): 106 - 8.
6. Miron T, Rabinkov A, et al. The mode of action of allicin: its ready: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 15; 1463 (1): 20 - 30.
7. Seong-jun cho, Dong-kwon phee, shukneung pyo. Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. *J. of Nutr.* 2006; 22 (11): 1177 - 84.
8. NS kang, et al. Immunomodulationg effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *J. of Nutr. Res.* 2001; 21 (4): 617 - 26.
9. Verena M, Alexandra K, Hidebert wagner. Effect of allicin and ojoene, two compounds of garlic, *Atherosclerosis* 1998; 139 (2): 333 - 9.
10. Rippon JW. Medical Mycology: the pathogenic fung: and the pathogenic actinomycetes saunders company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. 1998, pp: 532 - 82.
11. Blast E, et al. Differential susceptibility of yeast and hyphal from candida albicans to protective activity of macrophages. *Infect. Immun* 2000; 63 (4): 1253 - 7.
12. Pattna KS, Subramanyam VR, Rath CC. Effect of essential oils on the viability and morphology of *Escherichia coli* (sp-11). *Microbios.* 1995; 84: 195 - 9.
13. Iqboal A, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants multidrug resistant human pathogens. *J. Ethnopharma.* 2001; 74: 113 - 23.
14. Kang NS, Moon EY. Cho CG. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nat. Res.* 2001; 21: 617 - 26.
15. Salman H. Michael B, Hanna B, Igor P. Effect of garlic derivative on peripheral blood cell immune responses. *Inter. J. Immunopharman.* 1999; 21: 589 - 97.
16. Shapoury R, Sattari M, Zahir Hassan. Studies on the Antimicrobial Effect of Allicin on the intra macrophages *Brucella*. *J. of Biol. Sci.* 2006; 9 (10): 1935 - 9.
17. Miriam paty, et al. Allicin stimulates macrophages and elicits an anti tumor effect. *Int. Immunol.* 2004; 16 (2): 275 - 81.
18. Hisao-pei change, yue-Hwla chen. Differential effects of organsulfur compounds from garlic oil on nitric oxide and prostaglandin E₂ in stimulated macrophages. *Int. J. of Apply and Basic Nutr. Sci.* 2005; 21 (4): 530 - 6.
19. Oqita A, Fujita K, Taniquchi M, Tanaka T. Enhanced of the fungicidal activity of



amphotericin B by allicin, an Allyl-sulfur compound from garlic, against the yeast

candida albicans, as a model system. *Planta Med.* 2006; 72 (13): 1247 - 50.

