

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

مریم سلطانی<sup>۱</sup>، محدثه لاری پور<sup>۱\*</sup>، عباس اخوان سپهی<sup>۲</sup>، مرتضی پیرعلی همدانی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی 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 قارچ‌شناسی 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 مهم‌ترین آنها آلپسین با خواص آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. قارچ کاندیدا آلبیکنس، مخمری فرصت‌طلب است که در صورت نقص سیستم ایمنی، عامل بیماری‌زایی محسوب می‌شود. مکانیسم‌های ایمنی در برابر این قارچ، ماکروفاژها هستند که با مکانیسم کشندگی وابسته و غیروابسته به اکسیژن عمل می‌کنند به طوری که مکانیسم وابسته به اکسیژن، شامل تولید واسطه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی است که توسط ماکروفاژهای تولید می‌شوند و از این طریق میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برند.

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 آلبیکنس بررسی شد تا سیر در درمان بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مبتلا به کاندیدیازیس مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی: در این تحقیق اثر آلپسین سیر بر فعالیت ماکروفاژها در میزان آزادسازی نیتریک اکساید در برابر کاندیدا آلبیکنس بررسی می‌شود 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 آلبیکنس را در دو گروه آلپسین‌دار و بدون آلپسین با ماکروفاژها همراه کرده و نهایتاً پس از مقایسه با نمونه‌های 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 می‌شود 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 گروه‌های کنترل، به دست آمد. نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت اثر عامل کاندیدا آلبیکنس 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، می‌تواند تاثیرات بالایی بر روی فعالیت ماکروفاژها در تولید NO در برابر عوامل کاندیدیازیس داشته باشد.

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



## مقدمه

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

از ترکیبات سیر، ارگانوسولفور (آلین، آلپسین)، اسیدهای آلی، کربوهیدرات و ویتامین‌ها را می‌توان نام برد که مهم‌ترین خواص سیر مربوط به آلپسین یا روغن سیر<sup>۲</sup> 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 آلپسین، قابلیت نفوذپذیری و عبور از طریق فسفولیپیدهای غشاء است که آزادانه از غشاء عبور کرده و باعث اثر خود می‌شود [۴].

آلپسین 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 آلپسین روی ماکروفاژهای پری‌توئن موش، نشان از افزایش فعالیت ماکروفاژها می‌باشد [۶] آلپسین 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 کلیدی) به فرم پاتوژن تبدیل شده و باعث

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 آلپسین 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 کلروفورم و قراردادن در قیف دکانتور، عصاره کلروفومی جدا شد که با اتصال به دستگاه تقطیر در خلاء، عصاره غلیظ روغنی زرد تا سبز (آلپسین) حاصل شد [۸].

مقدار کمی آلپسین به روش کروماتوگرافی با کارایی بالا HPLC توسط شرکت داروسازی کوثر محاسبه شد و  $0.05 \pm 0.17$  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 CO<sub>2</sub> دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ - ۲ ساعت نگهداری شد [۹].

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

<sup>1</sup> *Allium sativum* L.    <sup>2</sup> Diallyl thiosulfinate



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  $10^7 \times 1/4$  در یک سی سی RMI تهیه شد و سپس به چاهک‌های کنترل مثبت و منفی به ترتیب INF- $\gamma$  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 میکرو مولار 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 آلیسین دار 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 | ۰/۳۳۱ | ۰/۲۳۵ |
|  |     | ۰/۲۳۰ | ۰/۳۲۷ | ۰/۱۹۵ |
|  |     | ۰/۱۹۱ | ۰/۳۳۵ | ۰/۲۴۰ |
| میزان جذب نیتريت اکساید در نمونه بدون آلیسین (ماکروفاژ+ کاندیدا آلبیکنس)     |     | ۰/۰۸۳ | ۰/۱۵۲ | ۰/۰۹۲ |
|  |     | ۰/۰۹۵ | ۰/۱۴۶ | ۰/۰۹۷ |
|  |     | ۰/۰۸۸ | ۰/۱۴۹ | ۰/۰۹۳ |
| میزان جذب نیتريت اکساید در کنترل مثبت (ماکروفاژ + LPS + - $\gamma$ rINF)     |     | ۰/۲۲۰ | ۰/۳۰۵ | ۰/۲۴۰ |
|  |     | ۰/۱۵۰ | ۰/۳۰۱ | ۰/۲۱۰ |
|  |     | ۰/۱۸۰ | ۰/۳۰۳ | ۰/۲۶۰ |
| میزان جذب نیتريت اکساید در کنترل منفی (ماکروفاژ)                             |     | ۰/۰۹۲ | ۰/۱۱۴ | ۰/۱۱۴ |
|  |     | ۰/۰۹۱ | ۰/۱۱۱ | ۰/۱۰۸ |
|  |     | ۰/۰۹۳ | ۰/۱۱۲ | ۰/۱۱۰ |



برای مقایسه میزان گروه‌ها به صورت تک تک از روش 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  $0/05$  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 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)

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

جدول شماره ۳ - آزمون ANOVA

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



جدول شماره ۴ - روش bonferroni (مقایسه چندگانه)

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

## بحث

این دیدگاه اثر تقویتی سیر و آلیسین بیشتر نمایان می‌شود زیرا باعث تقویت فعالیت‌های فاگوسیتوری ماکروفاژها و ترشح فاکتورهای موثر آنها می‌شود. بررسی‌ها نشان داده شده که می‌توان مواد طبیعی همچون آلیسین را جهت فعال‌سازی ماکروفاژها جایگزین عوامل مختلفی همانند  $\gamma$ -INF (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 آلیسین سیر قویا، فعالیت ضدکاندیدیایی ماکروفاژ را افزایش می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که این آزمایش به صورت *in vivo* نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

هدف اصلی این مطالعه، بررسی تاثیر آلیسین سیر بر روی فعالیت‌ها کروفاژها 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 آلیسین باعث افزایش قدرت انفجار اکسیداتیوی و پاسخ‌های ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلبیکنس می‌شود و تولید فاکتورها و سیتولین‌های ماکروفاژی مثل  $H_2O_2$  و  $IL_1$  را افزایش می‌دهد [۱۷،۱۸]. ترکیبات سیر باعث افزایش قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های ایمنی می‌شود [۱۹]. با



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 E<sub>2</sub> 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.

