مقاله پژوهشی

اثر ایمونومدولاتوری فراکشن R10 سیر روی فعالیت حیاتی و تولید سایتوکاین TNF-α در سلولهای $CD8^+$ T در شرایط آزمایشگاه

دکتر طوبی غضنفری *، حسین رشیدی **، دکتر شهره جلایی ***، پگاه علیجانی ****

دریافت : ۹۲/۵/۱۲ ، پذیرش : ۹۲/۸/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: سلولهای T خصوصا لنفوسیتهای $CD8^+$ T مهمترین سلولهای سیستم ایمنی در پاسخهای ضد توموری هستند. قبلا فراکشن R10 عصاره آبی سیر بعنوان ایمونومدولاتور تحریک کننده پاسخهای Th1 و ایمنی سلولی گزارش شده است . در این مطالعه اثر ایمونومدولاتوری فراکشن R10 سیر بر فعالیت حیاتی و تولید سایتوکاین TNF-α سلولهای $CD8^+$ T در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی سلولهای $CD8^+$ T با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال متصل به مگنت بید بوسیله ستونهای جداساز به روش مگنت بید از طحال موشهای Balb/C جدا شدند. فراکشن R10 به روش اولترا فیلتراسیون براساس وزن مولکولی تهیه شد. آزمون کالریمتری MTT Test برای ارزیابی فعالیت حیاتی سلولی استفاده شد. میزان سایتوکاین TNF-α در سوپرناتانت کشت سلولهای $CD8^+$ T بوسیله روش ELIZA اندازه‌گیری شد. داده های بدست آمده با استفاده از آزمون Nonparametric Test و آزمونهای Keraskel & Wanny's Test مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند.

نتایج: یافته‌ها نشان می‌دهند که تمام رقتهای فراکشن R10 ، فعالیت حیاتی سلولهای $CD8^+$ T را در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش می دهند و در حضور میتوژن ConA ، رقت ۱:۵۰ فراکشن R10 فعالیت حیاتی سلولهای$CD8^+$T را در مقایسه با میتوژن ConA افزایش می‌دهد. ترشح سایتوکاین TNF-α بطور قابل ملاحظه‌ای بوسیله تمام رقتهای فراکشن R10 افزایش می یابد.

نتیجه نهایی: یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که فراکشن R10 عصاره آبی سیر می‌تواند بعنوان یک داروی ایمونومدولاتور برای القای ایمنی سلولی در تومور تراپی استفاده گردد.

کلید واژه ها: سلولهای $CD8^+$ T / سیتوکاین ها / سیر / فراکشن R10 / فعالیت حیاتی

مقدمه :

استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. سیر از جمله این گیاهان دارویی است که در طی دو دهه گذشته اثرات ایمونومدولاتوری آن بر سلولهای سیستم ایمنی از جمله ماکروفاژها (۱) ، نوتروفیل ها (۲) ، سلولهایNatural NK (Killer Cell) (۳) و پاسخ افزایش حساسیت تاخیری (DTH) (۴) مورد بررسی قرار گرفته است. طی این مطالعات مشخص شده‌است که اثرات ایمونومدولاتوری آن بیشتر مربوط به پروتئینهای حدود ۱۴ کیلو دالتونی موجود در فراکشن R10 که وزن مولکولی ۱۰< و ۳۰> دالتون دارد، است. از طرفی لنفوسیت های T خصوصا لنفوسیتهای $CD8^+$ T نقش کلیدی در ایمنی بر ضدتومور دارند(۵). لنفوسیتهای$CD8^+$ T سلولهای توموری را بوسیله خصوصیت سایتوتوکسیتی خود با یکی از سه مسیر زیر از بین می‌برند: ۱- اتصال لیگاند Fas و گیرنده Fas با راه‌اندازی مسیر کلاسیک آبشار کاسپازی ۲- بواسطه تماس گیرنده TCR و کمپلکس MHC/پپتید و آزادسازی پرفورین و گرانزیمها به داخل فضای بین سلولی ۳- بواسطه سایتوکاین‌هایی مانند IFN-γ و TNF-α (۶)

* استاد ایمونولوژی مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی دانشگاه شاهد تهران
** کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشگاه شاهد تهران (hosein_rashidi79@yahoo.com)
*** استادیار گروه آمار حیاتی دانشکده توانبخشی دانشگاه تهران
**** کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان

بنابراین سلولهای $CD8^+$ T ابزار مناسبی را برای ایمونوتراپی سرطان فراهم می کنند و با توجه به اینکه در مطالعات قبلی اثر سیر و فراکشنهای آن بر سلولهای $CD8^+$ T مورد بررسی قرار نگرفته بود، در مطالعه حاضر اثرات این فراکشن ایمونومدولاتور بر این سلولها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار:

تهیه عصاره سیر : عصاره آبی سیر با استفاده از حبه‌های سیر تازه منطقه همدان و به روش استفاده شده توسط غضنفری و همکاران (۱) تهیه شد، به این صورت که ابتدا حبه‌های سیر خشک را پوست کنده و بعد از یک شب نگهداری در فریزر، بوسیله دستگاه مخلوط کن، مخلوطی یکنواخت از آن داخل آب مقطر استریل تهیه گردید. به منظور مشخص بودن دوز عصاره ، هنگام مخلوط کردن از نسبت یک به یک سیر و آب مقطر استفاده شد، به نحوی که عصاره نهایی حاوی یک گرم عصاره سیر در یک میلی لیتر آب مقطر (غلظت ۱ گرم در میلی لیتر) بود. مخلوط حاصله چند بار از میان پارچه استریل و یک بار از فیلتر واتمن عبور داده شده و صاف شد و با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس بوسیله فیلتر میلی پور ۰/۰۲ µm استریل شد و داخل یخچال نگهداری گردید.

تهیه فراکشن R10 از عصاره سیر : برای فراکشن‌گیری از عصاره سیر از روش استفاده شده توسط غضنفری و همکاران (۴،۷) یعنی سیستم اولترافیلتراسیون آمیکون (میلی پور، ایرلند) استفاده شد. بدین صورت که عصاره آبی سیر از چندین فیلتر با اندازه های ۱۰۰، ۵۰، ۳۰ و ۱۰ کیلودالتونی عبور داده شد. مولکولهای با وزن بالاتر در بالای فیلتر باقی مانده و از فیلتر رد نشدند که آنها را باقیمانده (R) و مایع عبور کرده از فیلتر، فیلتره (F) نامیده شدند و به ترتیب فراکشن های R100، R50، R30، R10 ، F10 به دست می آیند. فراکشن R10 که وزن مولکولی ۱۰< و ۳۰> دالتون دارد در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

پروتوکل جداسازی سلولهای $CD8^+$ T بوسیله کیت مگنت بید (آلمان ،Miltenyi Biotec) : ابتدا ۴ سر موش Balb/C ماده با سن ۸-۶ هفته خریداری شده از انستیو پاستور ایران با اتر (Lab scan- Ireland) بی‌هوش شدند. طحالهای آنها خارج و سلولهای طحالی با تزریق محیط RPMI 1640 (GIBCO) و خرد کردن بافت طحالی جدا شدند. پس از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع روی، گلبول های قرمز با افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول لایزینگ بافر (محلول کلرید آمونیوم ۰/۸۳٪ و محلول تریس ۰/۲۰۶٪ به ترتیب با نسبت ۹ به ۱) حذف شدند. بعد از ۲ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از FBS (Fetal bovine serum) (شرکت زیگما) اضافه و بلافاصله بمدت ۱۰ دقیقه مانند قبل سانتریفیوژ شدند. سپس به آنها ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 داری ۱۰٪ FBS اضافه شد . سپس سلولها با لام نئوبار شمارش شدند .بعد از شمارش دوباره سوسپانسیون سلولی در ۳۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع روی دور ریخته شد. به ازای هر ۱۰ میلیون (10^7) سلول ۹۰ میکرولیتر بافر (محلول phosphate-buffered saline (PBS) با PH=7.2 محتوی ۵٪ bovine serum albumin (BSA) و EDTA 2mM) و به ازای هر ۱۰ میلیون سلول $CD8^+$ T در حجم کل سلولی حدود ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی متصل به مگنت بید اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۸°-۴ C انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون سلولی داخل ستون جداساز (MS column) منتقل شد. ستون سه بار با بافر شستشو شد و سلولهای $CD8^+$ T مانده در ستون با اضافه کردن یک میلی لیتر بافر بوسیله پیستون مخصوص از ستون خارج و جمع آوری شدند. سلولهای جمع آوری شده با دور ۳۰۰ g سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و به آنها ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI1640 دارای ۱۰٪ FBS اضافه شد. تعداد و میزان زنده بودن سلولهای $CD8^+$ T با رنگ تریپان بلو و به کمک لام نئوبار تعیین شد که حدود ۹۸٪ سلولها زنده بودند(۸).

بررسی فعالیت حیاتی سلولهای $CD8^+$ T به روش MTT: در این مطالعه جهت بررسی فعالیت حیاتی بر روی سلولهای $CD8^+$ T از MTT [۳- (۴ و ۵ دی متیل ۱ -۲ تیازولیل) ۲ و ۵ دی فنیل ۲- تترازولیوم بروميد] (شرکت سیگما) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مقدار ۲۰ میکرولیتر پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت استفاده شد (۹) که در آن تحت تاثیر دهیدروژناز میتوکندریها این ماده که زرد رنگ و محلول می‌باشد به کریستالهای فورومازان که ترکیبی آبی رنگ و نامحلول است تبدیل می شود، با حل کردن این کریستالها در ایزوپروپانول اسید، مقدار جذب نوری این ماده در دستگاه الیزا ارزیابی می‌شود.

ترکیب آبی رنگ نامحلول به صورت کریستالهای بنفش رنگ به کف ظرف چسبیده و می‌توان از طریق بررسی میزان این کریستالها مقدار سلول زنده در هر خانه و میزان فعالیت حیاتی دارو را درمقایسه با گروه کنترل

بدست آورد زیرا تنها سلولهای زنـده قـادر بـه انجـام ایـن تبدیل می‌باشند و بنابراین از ایـن روش مـی تـوان جهـت بررسی قابلیت زنده ماندن سلولها استفاده کرد.

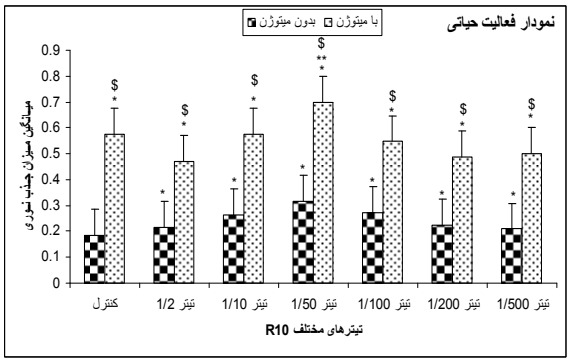
MTT مـورد نیـاز بـا غلظـت مناسـب (۵mgr/ml) در آزمایشگاه تهیـه و در فریـزر منهـای ۷۰ درجـه سـانتیگراد نگهداری شد. سلولهای $CD8^+$ T به تعداد ۲۰۰،۰۰۰ سلول در خانه‌های کنترل و تستها در پلیتهای ۹۶ خانه‌ای کشت شـــدند. ســـپس رقتهـــای مختلـــف فراکـــشن R10 (۱/۲، ۱/۱۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰) تهیـه و بـه خانه‌های مورد نظر دارای سلول اضافه شـدند. بعـد از ایـن مرحلـه میتـوژن ConA (Concanavalin A) بـه میـزان ۲۵µl/ml به خانه‌های مورد نظر اضافه شـد و پلیـت بـرای ۴۸ ساعت در دمای C ° ۳۷ و ۹۰٪ رطوبت انکوبه شد. بعد از این مرحله، محلول MTT را که مدت ۲۰-۱۵ دقیقـه در محیط آزمایشگاه از قبل قرار داده شده بـود بـه مقـدار ۲۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه شد. سپس پلیت در انکوبـاتور قرار داده شد و پس از گذشت ۴ ساعت پلیت خارج شـد و با سمپلر ۲۰۰ اقدام به تخلیه محیط کشت خانه‌های پلیـت گردید، پس از تخلیه تمام خانـه‌هـا، ایزوپروپـانول اسـیدی (0.04 N HCl) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه شد. این ترکیب باعث حل شدن کریستالهای بنفش رنـگ کف خانه‌ها می‌شود. سپس مـاده حـل شـده از خانـه‌هـای پلیت۹۶ خانه به داخل خانه‌های پلیت مخصوص الایزا انتقال داده شد. پلیت مخصوص الایزا در دسـتگاه خواننـده الایـزا که مقدار جذب نوری آن روی لنز ۵۴۰ نانومتر تنظیم شده بود، قرار داده شد و پاسخ حاصله نشان دهنده مقدار جذب نوری هر خانه می‌باشد که نمادی از تعداد سـلولهای زنـده در هر خانه بوده و مقایسه مقدار آن در گروه هدف با کنترل نشان دهنده مقدار فعالیت حیاتی در آن خانه می‌باشد.

روش اندازه گیری سایتوکاین TNF : برای اندازه‌گیری TNF با روش الیزا از کیت اینویتروژن (Invitrogen, USA) استفاده شد (۹). پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف به صـورت over night در ۴°C با آنتی‌بادیهـای موشـی ضـد TNF-α کـوت شـد. سپس پلیت شستشو و با بـافر assay (Invitrogen, USA) به مدت یک ساعت خانه‌ها بلوک شـدند. سـه بـار بـا بـافر (0.05% Tween 20 in PBS) شستشو شدند. نمونـه‌هـای سوپرناتانت و رقتهای مختلف استاندار به خانه ها اضافه و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. ۵ بار شستشو و آنتی بادی ثانویه اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد بعـد از شستـشو، سوبـسترا تتـرا متیـل بنزیـدین tetra methyl benzidine (TMB) (Invitrogen, USA) اضـافه گردیـد و ۳۰ دقیقه در جای تاریک در دمای اتاق انکوبه شد. بـا محلـول متوقـف کننـده(1.8N H2SO4) واکـنش متوقـف و غلظـت سایتوکاینها در خانه ها با الیزا ریدر در ۴۵۰ نانومتر تعیین شد.

آنالیز آماری : داده‌های حاصله با نرم افزار Spss نسخه ۱۹ با اسـتفاده از آزمـون Nonparametric Test و آزمونهـای Keraskel & Wanny's Test بررسی شدند.

نتایج:

نتیجه فعالیـت حیـاتی سـلولهای $CD8^+$ T تیمـار شـده بـا رقـت هـای مختلـف فراکـشن R10 در مـدت ۴۸ سـاعت (آزمون MTT): همانگونه که نتایج (شکل ۱) نشان می‌دهند میـانگین جـذب نـوری حاصـل از احیـاء MTT توسـط سلولهای $CD8^+$ T مجاورت داده شده در تمام رقتهـای بـا یا بدون میتـوژن از فراکـشن R10 بـه طـور معنـاداری در مقایسه با کنترل منفی افزایش داشته‌انـد. رقـت ۵۰ :۱ در حضور میتوژن حتی نسبت به میتوژن افزایش معناداری در فعالیت حیاتی سلولها را باعث شده است . بقیـه رقتهـا در حضور میتوژن یا تفـاوت معنـاداری ندارنـد و یـا تحریکـی کمتر از میتوژن بجا گذاشته‌اند. مقایسه هرگروه (تیترهـای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوژن نشان می‌دهد کـه در تمام دوزهـای بکـار رفتـه در حـضور میتـوژن فعالیـت حیاتی بیشتر بوده است.



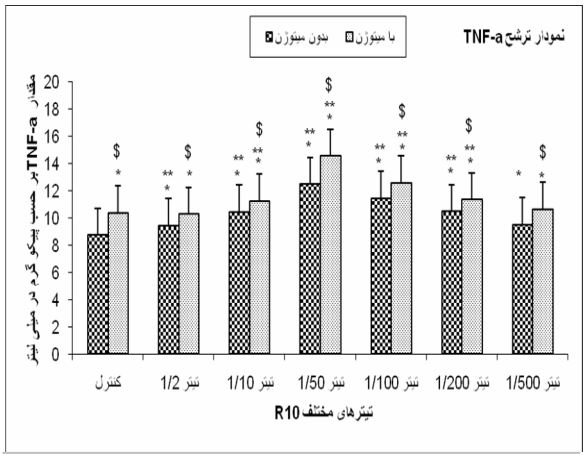
شکل ۱: میانگین جذب نوری ناشی از احیاء محلول MTT متعاقب اثر رقتهای مختلف فراکشن R10 عصاره آبی سیر بر سلولهای $CD8^+$ T بعد از ۴۸ ساعت در حضور و عدم حضور میتوژن

علامت *: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل منفی (بدون میتوژن) می‌باشد ($P\leq0.05$)

علامت **: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل مثبت (با میتوژن) می‌باشد ($P\leq0.05$)

علامت $: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها بین گروه‌ها (تیترهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوژن ($P\leq0.05$)

نتایج میزان سایتوکاین TNF-α به دست آمده از سلولهای $CD8^+$ T تیمار شده با رقتها مختلف فراکشن R10 در مدت ۴۸ ساعت (آزمون اندازه گیری سایتوکاین با روش الیزا):
همانگونه که شکل۲ نشان می‌دهد مقدارسایتوکاین TNF-α تولید شده توسط سلولهای $CD8^+$ T تیمار شده با رقتهای مختلف فراکشن R10 در تمام رقتهای بدون میتوژن بطور معناداری در مقایسه با کنترل منفی افزایش نشان می‌دهند و در مقایسه با کنترل مثبت(میتوژن) بجزء رقتهای ۱/۲ و ۱/۵۰۰ همراه با میتوزن و رقت ۱/۵۰۰ بدون میتوژن بقیه رقتها چه با میتوژن و چه بدون میتوژن تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند. مقایسه میزان ترشح سایتوکاین TNF-α هر گروه (تیترهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوژن نشان می‌دهد که در تمام دوزهای بکار رفته در حضور میتوژن TNF-α بیشتر بوده است.



شکل ۲: مقدار سایتوکاین TNF-α تولید شده توسط سلولهای $CD8^+$ T بر حسب واحد Pgr/ml متعاقب اثر رقتهای مختلف فراکشن R10 عصاره آبی سیر بعد از ۴۸ ساعت در حضور و عدم حضور میتوژن

علامت *: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل منفی (بدون میتوژن) می‌باشد ($P\leq0.05$)

علامت **: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل مثبت (با میتوژن) می باشد ($P\leq0.05$)

علامت $: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها بین گروهها (تیترهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوژن ($P\leq0.05$)

بحث:

سلولهای T نقش مهمی در مراقبت و رد تومور ایفاء می‌کنند. ازمیان سلولهای T، سلولهای $CD8^+$ T نقش حیاتی در دفاع میزبان علیه بدخیمی‌ها هم در مطالعات انسانی و هم در مطالعات حیوانی دارند(۱۰) و در واقع قسمت عمده تلاشهایی که جهت ایمونوتراپی انجام می‌گیرد، برای افزایش توانایی و کارایی این سلولها برای مقابله با سلولهای توموری می‌باشد. بنابراین، از آنجایی که پاسخ ایمنی اختصاصی غالب در برابر تومورها و سرطانها با واسطه لنفوسیتهای T صورت می پذیرد(۱۱) ، سلولهای T سایتوتوکسیک تخلیص و مورد استفاده قرار گرفتند.

سیر از محصولات طبیعی موثر است و گزارش شده که اثرات ضدتوموری مستقیم و تقویت‌کننده سیستم ایمنی دارد که آن را به ابزار مفیدی برای ایمونوتراپی تبدیل کرده‌است. دستکاری کنترل شده پاسخهای ایمنی بوسیله ابزارهای دارو شناختی هدف اصلی متخصصان بالینی برای درمان بیماران سرطانی و بیماران با نقایص ایمنی و بیماریهای عفونی است و در این مورد تنظیم پاسخهای ایمنی می‌تواند با ارزش باشد و سیر می‌تواند از این نظر مفید واقع گردد(۴). بنابراین در این مطالعه، فعالیت سلولهای$CD8^+$ T تحت تاثیر فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تمام تیترهای فراکشن R10 فعالیت حیاتی سلولهای $CD8^+$ T را در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش می‌دهد، اثر اپتیمم فراکشن R10 بر روی فعالیت حیاتی سلولهای $CD8^+$ T در تیتر ۱/۵۰ این فراکشن در حضور و در غایب میتوژن ConA بدست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که اثرات تحریکی R10 بصورت وابسته به دوز است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تولید سایتوکاین TNF-α بوسیله سلولهای $CD8^+$ T متعاقب مواجهه با تیترهای مختلف فراکشن R10 خصوصا تیتر ۱/۵۰ در حضور و غایب میتوژن افزایش می‌یابد.

در تحقیقات قبلی ما نشان داده شده که عصاره سیر و پروتئین ۱۴ کیلودالتونی آن (R10) باعث القای شیفت الگوی سایتوکاین (IFN-γ, IL-2) به سمت سلولهای T کمکی نوع یک در موشهای Balb/C (۷) و تکثیر لنفوسیتهای T (۱۲) و ارتقاء ازدیاد حساسیت نوع تاخیری (۴) و تقویت فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها علیه لیشمانیا ماژور (۱) می‌شود. همچنین بررسی‌های سایر همکاران نشان داده که R10 فعالیت حیاتی و سایتوتوکسیسیته سلولهای NK علیه تومور را افزایش می‌دهد(۳). در راستای یافته‌های قبلی، این مطالعه نیز نشان می‌دهد که فراکشن R10 فعالیت حیاتی و تولید سایتوکاین TNF-α در سلولهای $CD8^+$ T را افزایش می‌دهد. افزایش قابل

توجه سایتوکاین TNF-α در سلولهای تیمار شـده بـا R10 در این مطالعه موافق با مطالعه گو و همکـاران(١٣) اسـت که نشان دادند، قرص سیر بطـور قابـل ملاحظـه‌ای تولیـد سرمی سایتوکاینهای TNF-α و IL-2 را به صورت وابـسته به دوز در موشـهای درمـان شـده بـا قـرص سـیر افـزایش می‌دهد. در مطالعات زیادی اثرات سایر ترکیبات سیر مورد بررسی قرار گرفته است. کیس (١۴) نشان داده اسـت کـه آلیسین اثر مهاری روی تولید سایتوکاینهای TNF-α وIL-2 ندارد. پاتیا(١۵) نشان داده است که تکثیر سلولهای طحالی و سلولهای منونوکلئور خـون انـسانی و سایتوتوکسیـسیته سـلولهای منونوکلئورخـون انـسانی بـا آلیـسین افـزایش می‌یابد. موتو (١۶) گزارش کرده است که اثرات ضدتوموری قابل توجه‌ای در موشهای تلقیح شده با ملانوما B16 بواسطه آلیسین القاء می‌گردد. تاکی یامـا(١٧) نیـز گـزارش کـرده است که آمینواسیدهای حاوی سولفور مشتق از عصاره سیر تکثیر رده سلولی ملانومایی را بصورت وابسته به دوز مهـار می‌کند. با این وجود در این مطالعه چـون بـراسـاس روش جداسازی ، ترکیبات با وزن مولکولی خیلـی پـایین ماننـد آلیسین و ترکیبات سولفوردار از فراکشن R10 جدا شده‌اند به نظرمی رسد که نتایج بدست آمده به آلیسین و ترکیبات ارگانوسولفور مربوط نیست و سایر ترکیبات موجود در سیر (R10) نیز از طریق افزایش فعالیت حیاتی و افزایش تولید سـایتوکاین TNF-α در سـلولهای $CD8^+$ T اثـرات تقویـت کننده بر سیستم ایمنی نـشان مـی‌دهـد. مطالعـه‌ی ون و همکاران در سال ١٩٩۵ نشان داد که ٩۶٪ از پروتئینهـای سیر را دو پروتئین عمده بـا وزنهـای KD ۴۵ و١۴ شـامل آلیناز و لکتینهای سیر تشکیل می‌دهند (١٨) و در مطالعه دیگر وزن مولکولی لکتـین سـیر بـصورت مونـومرKD ١١ محاسبه شد(١٩) مطالعات قبلی ما نیز نـشان داده اسـت که پروتئین ١۴ کیلودالتونی سیر (٧) که در فراکشن R10 موجود است، علت خواص ایمونومدولاتوری آن می باشد(٢٠). با در نظر گرفتن مطالب فوق، احتمـالا فراکـشن R10 نیـز حاوی پروتئینهای لکتـین بـوده و ممکـن اسـت از طریـق تحریک پلی کلونال سلولهای ایمنی آنها را فعـال نمـوده و باعث ایجاد خواص ایمونومدولاتوری گردد.

با توجه به اثبات اثر R10 روی سـلولهای T کمکـی و سایتوکاین‌هایش (٧) و اثر بر ایمنی ذاتـی (NK Cell) (٣) در مطالعـات قبلـی ، بـه نظـر مـی‌رسـد کـه ایـن اثـر ایمونومدولاتوری R10 بر سلولهای $CD8^+$ T در کنـــــار سلولها و سایتوکاینهای فـوق در In vivo قـویتر و مـوثرتر تحریک و تومور را بطور کارآمدتری ریشه‌کن خواهد کـرد. بنابراینR10 و اجزاء پروتئینی‌اش یک کاندید مناسب برای ایمونوتراپی جهت مطالعات کلینیکی روی بـدخیمی هـای انسانی هستند. در ضمن قـدرت تقویـت کننـده R10 روی سـلولهای CTL مـی‌توانـد ابزارخـوبی جهـت ایمونـوتراپی سلولی در سرطانهای مختلف باشد.

نتیجه نهایی:

در مجموع می توان فراکشن R10 جـدا شـده از سـیر را بـه عنـوان یـک فعـال کننـده بـالقوه سیـستم ایمنـی در ایمونوتراپی تلقی کرد و در این نـوع درمـان‌هـا بـه کـار گرفـت. عوامـل مختلفـی بـرای فعـال کـردن سیـستم ایمنی مورد استفاده قرار می گیرند که انتخاب یک گزینه از بین سایر گزینه‌ها، می توانـد بـر نتیجـه درمـان تاثیرگـذار باشد.

سپاسگزاری:

ایـن مقالـه برگرفتـه از پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد ایمونولوژی در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد مـی باشـد. بـدین وسـیله، از همکـاری جنـاب آقـای داود جمـالی کارشناس گروه ایمونولـوژی دانـشگاه شـاهد کـه مـا را در انجام این مطالعه یاری نمود، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع :

1. Ghazanfari T, Hassan Z, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against Leishmania major by garlic (Allium Sativum) treatment. J Ethnopharmacol 2006;103:333-7.
2. Gao YM, Xie JY, Piao YJ. Ultrastructural observation of intra tumoral neutrophils and macrophages induced by garlic oil. Chung kuo Chung Hisi Chied Ho Tsa Chih 1993;13(9):546-8, 18.
3. Hassan Z, Yaraee R, Zare N, Ghazanfari T, Sarraf nejad A, Nozari B.Immunomodulatory effect of R10 fraction of garlic extract on NK activity. Int Immunopharmacol 2003; 3:1483-9.
4. Ghazanfari T, Hassan Z, Ebrahimi M. Immunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. Int Immunopharmacol 2002; 2: 1541-9.
5. Michalek J, Buchler T, Hajek R. T lymphocyte therapy of cancer. Physiol Res. 2004;53: 463-9.
6. Andersen M, Schrama D, Straten PT, Becker JC. Cytotoxic T Cells. J Invest Dermatol 2006; 32: 41-126.
7. Gazanfari T, Hassan Z, 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;52:491-5.
8. Teresi.S S, Boudard F, Bastide M. Effect of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide on murine CD4 and CD8 T cell proliferation. Immunol Lett 1996;50:105-13.
9. Yaraee R. Te efect of MS14 on innate and cellular immune responses in BALB/c mice Immunopharmacol Immunotoxicol 2011;33 (3): 509-14.
10. Rosenberg.SA. 'Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer'. J Intern Med 2001:250, 462.
11. Rankin E, Yu D, Jiang J, Shen H, Pearce E, Goldschmidt M. An Essential Role of Th1 Responses and Interferon Gamma in Infection-Mediated Suppression of Neoplastic Growth. Cancer Biol Ther 2003;2(6): 687-93.
12. Ghazanfari T, Hassan ZM. A lection with mitogenic activity in garlic. Abstract book of 10th International Congress of Immunology. India, New Delhi: Bruce Robinson, 1998.
13. Gu B, You J, Li Y, Duan C, Fang M. Enteric-coated garlic supplement markedly enhanced normal mice immunocompetence. Eur Food Res Technol 2010;230:627-34.
14. Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, et al. Garlic (Allium sativum L.) modulates cytokine expression in lipopolysa-ccharide-activated human blood thereby inhibit-ing NF-kB activity. J Nutr 2003; 133: 2171-5.
15. Patya M, Zahalka MA, Vanichkin A, Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, et al. Allicin stimulates lymphocytes and elicits an antitumor effect: a possible role of p21ras. Int Immunol 2004;16(2):275-81.
16. Motoo Y, Sawaba N. Antitumor effect of saikosaponins and baicalin on human hepatoma cell line. Cancer Lett 1994;86(1):677-88.
17. Takeyama H, Hoon SD, Saxton RE, Morton D, Irie RF. Growth inhibition and modulation of cell markers of melanoma by S-allyl cysteine. Oncology 1993;50:63-9.
18. Wen GY, Mato A, Wisniewski H, Malic M, Jenkins E, Sheikh A, et al. Light and electron microscopic immunocytochemical localization oftow major proteins in garlic bulb. J Cellular Biochem 1995;58:481-48.
19. Van Damme E, Goldstein IJ, Peumans WJ. A comparative study of mannose- binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae Phytochemistry 1991;30(2):509-14.
20. Ebrahimi M, Hassan Z, Mostafaie A, Zare Mehrjardi N, Ghazanfari T. Purified protein fraction of garlic extract modulates cellular immune response against breast transplanted tumors in BALB/c mice model. Cell J 2013; 15(1):65-75.

Original Article

In Vitro Immunomodulatory Effect of R10 Fraction of Garlic on Viability and Production of TNF-α in $CD8^+$ T Cells

T. Ghazanfari, Ph.D.* ; H. Rashidi, M.Sc.** ; Sh. Jalaei, Ph.D.*** ; P. Alijani, M.Sc.****

Received: 3.8.2013 Accepted: 29.10.2013

Abstract

Introduction & Objective: -cells, especially $CD8^+$T lymphocytes are the most important cells in anti-tumor response. Previously R10 fraction of garlic extract was reported as an immunomodulator which induced an effective cellular immunity and Th1 responses. In this study the in vitro immunomodulatory effect of R10 on $CD8^+$T cells viability and production of TNF-α were evaluated.

Materials & Methods: In this experimental study, using monoclonal antibodies attached to magnetic beads with isolating columns by magnetic bead method, $CD8^+$T cells from spleen cells of Balb/C mice were isolated. R10 fraction based on molecular weight was prepared using Ultra filtration. MTT assay was used to evaluate cell viability. TNF-α level was measured in the supernatant of culture of $CD8^+$T cells by ELISA. Obtained data was compared and analyzed using Nonparametric Test and Keraskel & Wanny's Test tests..

Results: The findings indicate that all dilutions of R10 fraction increased cell viability of $CD8^+$T cells in comparison with the negative control group and in the presence of ConA with dilution of 1:50 of R10 fraction significantly increased cell viability of $CD8^+$T Cells compared to ConA alone. Secretion of TNF-α significantly increased by all dilutions of R10 fraction.

Conclusion: These findings suggest that R10 fraction of garlic can be used as an Immunomodulator drug candidate for induction of cellular Immunity in tumor therapy.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 20 (4):273-279)

Keywords: $CD8^+$T cells / Cytokines / Garlic / R10 Fraction / Viability

---

* Professor of Immunology, Immunoregulation Research Center
Shahed University, Tehran, Iran.
** M.Sc. in Immunology, Shahed University, Tehran, Iran. (hosein_rashidi79@yahoo.com)
*** Assistant Professor, Department of Biostatistics, School of Rehabilitation
Tehran University, Tehran, Iran.
**** M.Sc. in Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.