

خالص‌سازی ترکیبات فراکشن ایمونومدولاتور سیر با استفاده از HPLC

طوبی غضنفری^{۱*}، رویا یارایی^۲، احمد آسوده^۳، طبیه رجبیان^۴، مژگان کاردار^۵، زهیر محمد حسن^۶، حسین نادری‌منش^۷، سفیه صوفیان^۸، داود جمالی^۹

- ۱- دانشیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۲- دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۳- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مشهد
- ۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
- ۵- پژوهشگر، گروه تحقیقاتی ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- ۶- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۷- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
- ۸- دانشجوی دکترای، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
- ۹- کارشناس، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
- *آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۶۴۷۹۲، نمبر: ۰۲۱-۸۸۹۶۶۳۱۰
پست الکترونیک: tghazanfari@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۱۴/۶/۸۷

تاریخ دریافت: ۷/۷/۸۶

چکیده

مقدمه: خواص دارویی گوناگونی برای سیر و ترکیبات جداده از آن گزارش شده است. مطالعات ما و سایرین نشان‌دهنده تاثیر سیر بر پاسخ‌های سیستم ایمنی است. در مطالعات قبلی نشان داده شد که خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به ماده موثرهای است که در فراکشن R₁₀ جدا شده است.

هدف: در این تحقیق به هدف خالص‌سازی ترکیبات فراکشن ایمونومدولاتور مورد نظر از تخلیص به روش HPLC استفاده شده است.

روش بررسی: عصاره خام آبی سیر همدان تهیه شد. به منظور جداسازی پروتئین‌های بین ۱۰ الی ۵۰ کیلو دالتون از اولترافیلترسیون استفاده شد. اجزای فراکشن R₁₀ جمع‌آوری شده به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سمی-پرپاراتیو (۱۰ × ۲۵ cm) Vydac ۲۰۸ TPV که یک ستون فاز معکوس C₈ است، از یکدیگر جداسازی شدند. برای تخمین اندازه پروتئین‌های جدا شده با SDS-PAGE از روش تریسین RP-HPLC استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی از محلول کوماسی بلو R₂₅₀ و برای نمونه‌های کم که با رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو مشخص نمی‌شوند، از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج: با استفاده از ستون HPLC فاز معکوس C₈ در شب ۰/۲۵ درصد (دقیقه / حلال B) و سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه در مدت ۶۰ دقیقه، تعداد ۶ فراکشن عمده با نام‌های ۱- الی ۶ جمع‌آوری شدند. از این میان فراکشن‌های ۰ و ۱ و ۳ باندهایی را در محدوده ۱۲ کیلو دالتون نشان دادند و برای بررسی‌های بعدی نگهداری شدند.

نتیجه‌گیری: با کمک سیستم اولترافیلترسیون می‌توان به سرعت به ترکیبات پروتئینی با وزن بین ۱۰ الی ۱۵ کیلو دالتون دست یافت. با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس C₈ اجزای این فراکشن به راحتی از هم جدا می‌شوند. سه فراکشن در محدوده وزن مولکولی ۱۲ KD به دست می‌آیند. بررسی‌های بیشتر جهت ارزیابی خواص ایمونومدولاتوری ترکیبات جداده با استفاده از آزمون‌های بیولوژیک ضروری است.

گل واژگان: سیر، فراکشن ایمونومدولاتور، تخلیص، HPLC



مقدمه

برای درک بهتر خواص سیر باید اجزاء و ترکیبات آن را بررسی کرد. دسته‌ای از مهم‌ترین ترکیبات سیر ترکیبات ارگانوسولفور آن است. در اغلب موارد اثرات درمانی سیر را به مواد ارگانوسولفوره سیر مانند آلیسین نسبت می‌دهند و بررسی‌های زیادی جهت شناسایی، جداسازی و حتی تهیه پروب *DNA* مواد سولفوره سیر صورت گرفته است [۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵].

یکی دیگر از ترکیبات مهم موجود در سیر پروتئین‌های آن است. از جمله این پروتئین‌ها لكتین‌ها هستند. بیشتر این لكتین‌ها ویژگی بالایی برای قند مانوز دارند. مطالعه‌ای که توسط ون^۱ در سال ۱۹۹۵ انجام شد نشان داده است که ۹۶ درصد از پروتئین‌های سیر را دو پروتئین عمده در وزن‌های ۴۵ و ۱۴ KD شامل الیناز و لكتین‌های سیر تشکیل می‌دهند [۲۴]. در مطالعه دیگری وزن مولکولی لكتین سیر به صورت مونومر ۱۱ KD به دست آمده است [۲۵].

مطالعات قبلی ما نشان داد که خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به ماده موثرهای است که در فرآکشن R₁₀ جدا شده است با استفاده از روش‌های بیوشیمیابی شامل اولترافیلتراسیون و SDS-page طی مراحل مختلف اقدام به جداسازی ماده ایمونومدولاتور سیر نمودیم. در طی مراحل جداسازی فعالیت ایمونومدولاتوری ماده موردنظر از طریق بررسی اثر آن بر تکثیر لنفوسيت‌های طحال موش balb/c در *in vitro* با استفاده از تست LTT ارزیابی شد. الکتروفورز نشان داد که عصاره سیر دارای تعداد زیادی باند پروتئینی است که عمده‌ترین پروتئین‌های آن در دو باند در ناحیه ۵۰-۵۲KD و ۱۱-۱۴ KD جدا شده‌اند. خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۴ KD می‌باشد که در فرآکشن R₁₀ حاصل از اولترافیلتراسیون عصاره سیر موجود است [۱۶].

در این تحقیق از تخلیص به روش HPLC به هدف خالص‌سازی ترکیبات موجود در فرآکشن ایمونومدولاتور سیر و ایجاد سیستم مناسب جهت تولید بیشتر ماده ایمونومدولاتور

سیر^۱ متعلق به خانواده Liliaceae است. خواص دارویی سیر از قدیم‌الایام مورد توجه بوده و استفاده از سیر به عنوان یک گیاه دارویی در بیماری‌های مختلف رایج بوده است. در فرهنگ‌های مختلف خواص گوناگونی به آن نسبت داده شده است. در طب سنتی ایران اثرات متنوعی برای سیر ذکر شده است از جمله این اثرات می‌توان به اثر ضدغفونی، اشتتها آور، هضم‌کننده غذا، صفاربر، خلط‌آور، نیرودهنده، کاهش‌دهنده فشارخون و ضدسرطان و موثر در درمان بیماری قند اشاره کرد [۱،۲]. همچنین در طب سنتی ایران آمده است که سیر در استعمال خارجی، اثر از بین برنده التهاب و التیام دهنده زخم و جراحت دارد. برای درمان اسهال‌های ساده، دیسانتری ورم رووده با منشاء عصبی، سوء هاضمه، اتساع معده اثر سودمندی دارد. از طرفی با اتساع شرائین و مویرگ‌ها و اثری که بر روی انقباضات قلب دارد باعث کاهش فشار خون می‌شود [۱،۲].

در سال‌های اخیر توجه زیادی به جنبه‌های مختلف اثرات دارویی عصاره سیر و جداسازی ترکیبات مختلف آن معطوف شده و گزارش‌های فراوانی در این خصوص وجود دارد. خواص دارویی گوناگونی برای سیر و ترکیبات جدا اشده از آن گزارش شده است. از این میان می‌توان به خواص آنتی‌بووتیکی شامل اثرات ضدباکتریایی، ضدبیروسی، ضدانگلکی و ضدقارچی، تاثیر بر نارسایی‌های گردش خون و سیستم قلبی-عروقی، اثرات ضدسرطانی اشاره نمود [۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵]. همچنین مطالعات ما و سایرین نشان‌دهنده تاثیر سیر بر پاسخ‌های سیستم ایمنی است. اثرات ایمونومدولاتوری سیر شامل تقویت پاسخ‌های سلولی و افزایش ازدیاد حساسیت تاخیری، شیفت پاسخ‌های سایتوکاینی به سمت Th1 در مدل لیشمایوز، افزایش ماکروفائز و تقویت بلع و هضم انگل لیشماینا مازور است [۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳].

^۱ Wen

^۱ *Allium sativum* L.



نامهای ۵ R100, R30, R10, Residue (R)۵ و در آخر یک فیلتره به نام F5 به دست آمد. تمامی مواد به دست آمده تا زمان استفاده بعدی در یخچال نگهداری شدند.

حالص‌سازی فراکشن ایمونومدولاتور با استفاده از کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس (RP-HPLC)

فراکشن جمع‌آوری شده از فیلتراسیون به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سمی-پرپاراتیو (۲۵ × ۱ cm) TPV10 ۲۰۸ (Vydac) است، از Kenover (آلمان) که یک ستون فاز معکوس C₈ است، از یکدیگر جدا شدند. حالص‌سازی با کمک محلول A (۰/۱ درصد TFA در آب) و محلول B (۰/۰۹ درصد TFA در استونیتریل) و با سرعت جريان ۱ ml/min از ۰ درصد محلول B تا ۱۵ درصد به مدت min ۶۰ انجام شد. شدت جذب در طول موج‌های ۲۰۴، ۲۵۴ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. هر یک از فراکشن‌ها با شماره‌هایی مشخص شده‌اند.

الکتروفورز Tricine- SDS-PAGE

برای تخمین اندازه پروتئین‌های جدا شده با RP-HPLC از روش تریسین SDS-PAGE به روش Schagger و ون-ژاگو انجام استفاده شد [۲۴]. ژل الکتروفورز در ۳ مختلف ۷ درصد، ۱۰، درصد و ۱۵ درصد استفاده شد.

ثبت و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو

مراحل ثبت با کمک محلول کوماسی بلو R₂₅₀ انجام شد (در این محلول ۲۵۰ میلی‌گرم کوماسی بلو R₂₅₀ و ۱۲۰ میلی‌لیتر متانول، ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک وجود دارد که با آب به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده است). برای رنگ بری از محلول ۴۰ درصد اتانول، ۱۰ درصد اسید استیک استفاده شد.

روش سریع رنگ‌آمیزی نیترات نقره

این روش برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های کم که با رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو مشخص نمی‌شوند، مناسب است. محلول‌های استوک ۵۰ درصد استن، ۵۰ درصد تری‌کلرواستیک

در زمان کوتاه‌تر جهت کار آزمایی‌های بالینی و بررسی‌های فارماکولوژیکی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره سیر

از سیر همدان بدین‌منظور استفاده شد. به طور خلاصه سیر همدان را پس از جدا کردن پوست به مدت یک شب در فریزر نگه داشته شد و سپس با ایجاد یک شکاف در حبه‌های سیر با مخلوط کن به نسبت ۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. مخلوط حاصله با کاغذ واتمن شماره یک صاف و سپس با دور ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا شده و به عنوان عصاره خام آبی سیر^۱ در یخچال نگه‌داری شد [۱].

روش اولترافیلترسیون

از اولترافیلترسیون با فیلترهای مختلف سیستم آمیکون استفاده شد. این فیلترها غیریونی بوده و نسبت به شوینده‌ها و بسیاری از مواد شیمیابی مقاوم هستند و قدرت جذبی بسیار پایینی دارند. ابتدا فیلترهای موردنظر به مدت چند ثانیه در محلول ۱/۰ نرمال سودکرارداده شدند تا از تداخل مقادیر ناچیز گلیسیرین و تری‌اتیلن گلیکول موجود در ساختار فیلترها با مواد مورد آزمایش جلوگیری شود، سپس آن‌ها را با آب مقطر دیونیزه شسته و در آب فوق قرار داده شدند و بدین‌ترتیب فیلترها کاملاً با آب شستشو داده شدند.

برای جداسازی مواد از عصاره به ترتیب از فیلترهای آمیکون با قدرت عبور مولکول‌هایی با وزن مولکولی ۱۰۰، ۵۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ کیلو دالتون استفاده شد. در هر مرحله، محلول رویی فیلتر^۲ که حاوی مولکول‌هایی با وزن مولکولی بیشتر از آستانه عبور فیلتر موردنظر است جدا شده و در یخچال نگهداری شد و محلول زیر آن (Filtrate) بر روی فیلتر آمیکون بعدی ریخته و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بدین‌ترتیب ۴ فراکشن باقی‌مانده روی فیلتر به

^۱ Crude extract

^۲ Residue



سمی C_8 کروماتوگرافی شدند. برای تایید خلوص آن‌ها نیز از ستون آنالیتیکال C_8 استفاده شد (شکل شماره ۴).

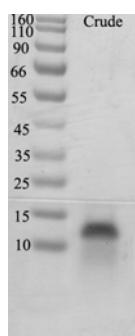
همان‌گونه که در شکل شماره ۵ دیده می‌شود فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ۶۶ کیلو Dalton است. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی‌شود. فراکشن‌های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو Dalton هستند. فراکشن ۴ به صورت اسمیر خود را نشان می‌دهد. فراکشن‌های ۵ و ۶ جزو پروتئینی قابل تشخیصی ندارند. الکتروفورز فراکشن‌های ۰، ۱ و ۳ به همراه نمونه اولیه در ژل تریسین **SDS-PAGE** که به نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است نیز نشان می‌دهد که در فراکشن ۱، نمونه پروتئینی بالاتر از ۱۵ کیلو Dalton نیز دیده می‌شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو Dalton و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلو Dalton از خود نشان می‌دهد.

اسید (TCA) و ۲۰ درصد نیترات نقره، ۱۰ درصد تیوسولفات سدیم تهیه شد. سپس طبق جدول پروتوكل مربوطه مراحل رنگ‌آمیزی انجام شد [۲۵].

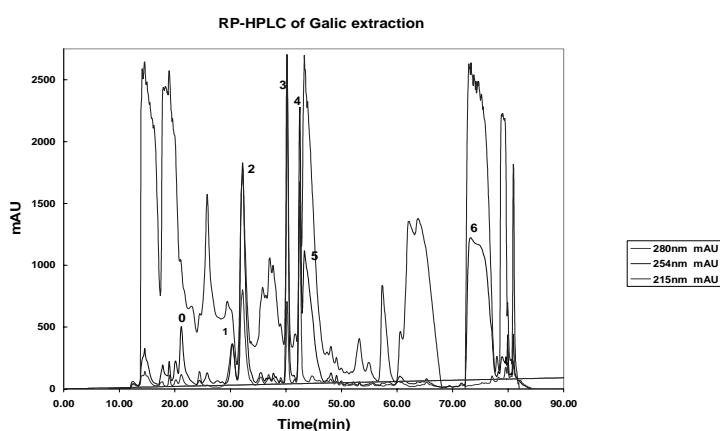
نتایج

با استفاده از روش اولترافیلتراسیون در سیستم آمیکون، فراکشن R_{10} به مقدار موردنیاز تهیه و به صورت لیوفلیزه در یخچال نگهداری شد.

الکتروفورز **SDS-PAGE** وجود یک باند پهن در ناحیه ۱۰ الی ۱۵ کیلو Dalton را نشان می‌دهد (شکل شماره ۱). در شب ۰/۲۵ درصد (دقیقه / حلال B) و سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه در مدت ۶۰ دقیقه، تعداد ۶ فراکشن عمدۀ با نام‌های ۱-۱ الی ۶ جمع‌آوری شدند (شکل‌های شماره ۲ و ۳). فراکشن‌های به دست آمده از کروماتوگرافی فاز معکوس C_8 مجدداً برای خلوص بستر با شرایط فوق با کمک ستون

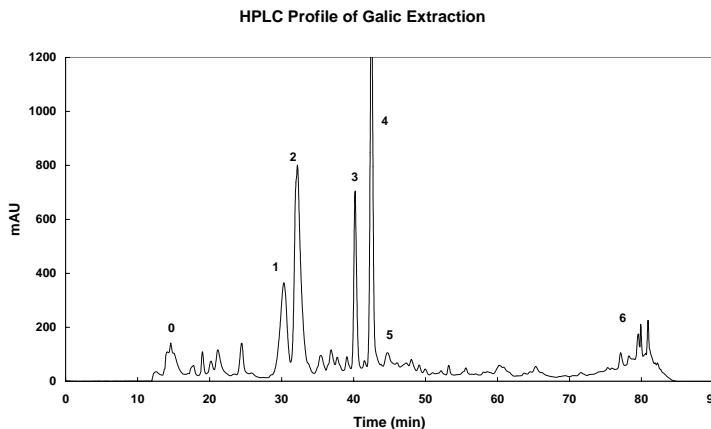


شکل شماره ۱- تصویر ژل تریسین **SDS-PAGE** از فراکشن R_{10} سیر (crude) در مقایسه با مارکر وزن مولکولی، نمونه R_{10} (دارای وزن مولکولی پایین (حدود ۱۲ کیلو Dalton) است

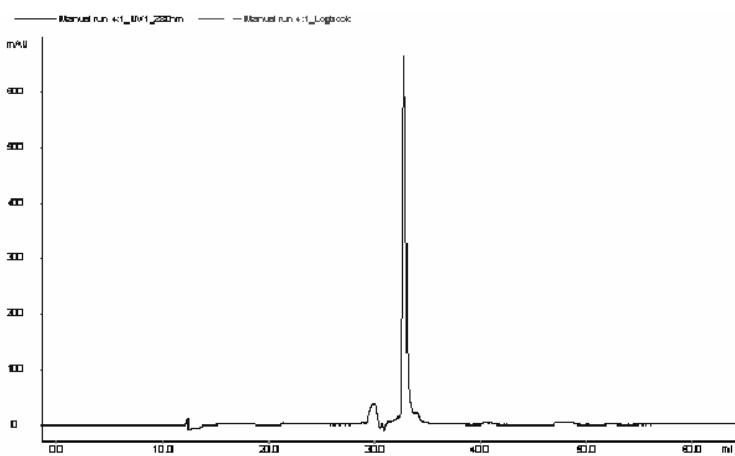


شکل شماره ۲- نمودار RP-HPLC C_8 . فراکشن R_{10} سیر بر روی ستون سمی C_8 در طول موج‌های ۲۸۰، ۲۵۴ و ۲۱۵ نانومتر

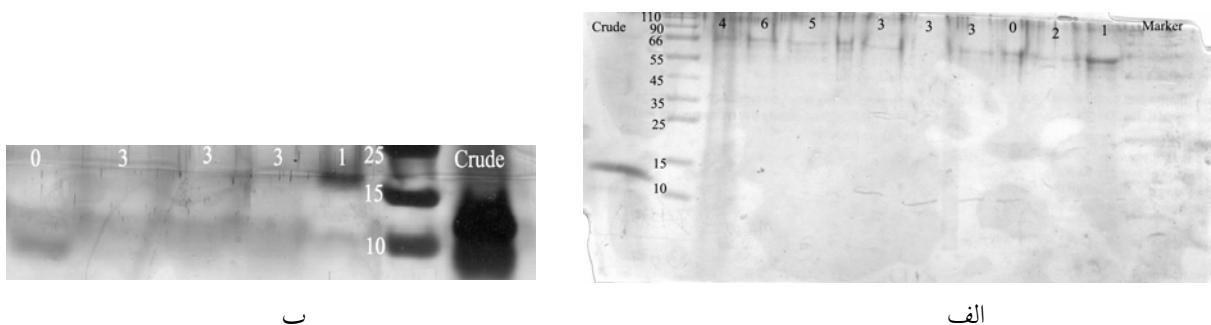




شکل شماره ۳- نمودار RP-HPLC از R10 سیر روی ستون C₈ سمی پرپاراتیو در طول موج ۲۸۰ nm



شکل شماره ۴- نمودار RP-HPLC از فراکشن ۳ روی ستون C₈ آنالیتیکال Aquapore RP300 در طول موج ۲۸۰ nm



شکل شماره ۵- ژل SDS-PAGE از فراکشن‌های مختلف جدا شده از ستون C₈. اعداد بالای چاہک‌ها، نشاندهنده شماره فراکشن هستند. شکل شماره (الف) سمت چپ، موید عصاره فیلتر شده اولیه (R₁₀) قبل از تزریق است که عمدتاً وزن مولکولی آن بین ۱۵ - ۶۰ کیلو Dalton است. فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ۶۶ کیلو Dalton دیده می‌شود. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی‌شود. فراکشن‌های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو Dalton هستند. فراکشن ۴ به صورت اسپر خود را نشان می‌دهد. فراکشن‌های ۵ و ۶ جزء پروتئینی قابل تشخیص ندارند. شکل شماره (ب) الکتروفورز فراکشن‌های ۰، ۱ و ۳ به همراه نمونه اولیه در ژل تریسین SDS-PAGE که به نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است. در فراکشن ۱، نمونه پروتئینی بالاتر از ۱۵ کیلو Dalton نیز دیده می‌شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو Dalton و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلو Dalton از خود نشان می‌دهد.

ظاهراً با تکنیک SDS-PAGE خالص به نظر می‌رسد، خود از چندین ترکیب که ممکن است ایزوتیپ‌های یک مولکول باشند تشکیل شده است. بر اساس کروماتوگرام HPLC، می‌توان گفت که حداقل ۴ ایزوتیپ با وزن تقریبی ۱۲ کیلو Dalton در فراکشن اولیه وجود دارد. نتایج فوق نشان می‌دهد که روش استفاده شده برای جداسازی و تخلیص ترکیبات و اجزاء فراکشن R_{10} روش مناسبی است ولی جهت اظهارنظر درخصوص میزان انثرات ایمونومدولاتوری انجام آزمایش‌های ایمونولوژیک ضروری می‌باشد. بررسی‌های بعدی جهت انجام آزمایش‌های ایمونولوژیک بر روی مواد تخلیص شده ادامه داشته و نتایج مربوطه در گزارش‌های بعدی ارایه خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با تصویب و حمایت مالی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد انجام شده است و توسط آن مرکز حمایت مالی شده است. بدین‌وسیله از مسؤولین محترم آن مرکز تشکر و قدردانی می‌نمایید.

با توجه به نتایج فوق R_{10} حاوی ۴ جزء جداگانه است که در فراکشن‌های ۰، ۱، ۳ و ۴ جهت بررسی‌های بعدی و مطالعات ایمونولوژی جمع‌آوری شد.

نتیجه‌گیری و بحث

با کمک سیستم اولترافیلتراسیون می‌توان به سرعت به ترکیبات پروتئینی با وزن بین ۱۰ الی ۱۵ کیلو Dalton دست یافت. این موضوع به روشنی در شکل شماره ۱ مشخص شده است. با توجه به پهن بودن قطر باند به دست آمده از این فراکشن در SDS-PAGE و با توجه به اطلاعات موجود در مورد ترکیبات پروتئینی سیر به نظر می‌رسد این فراکشن حاوی لکتین متصل شونده به مانوز می‌باشد. طبق اطلاعات موجود این لکتین به صورت ۳-۲ ایزو لکتین می‌باشد.
[۲۶، ۲۷]

در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک HPLC فاز معکوس به جداسازی اجراء پروتئینی موجود در فراکشن R_{10} حاصل از فیلتراسیون عصاره سیر پرداخته شد. با اعمال شب بسیار ملایم (۰/۲۵ درصد) از استونیتریل اجزاء پروتئینی هم وزن به راحتی از یکدیگر جدا شدند. براساس بررسی‌های انجام شده به نظر می‌رسد که فراکشن حاصل از فیلتراسیون که

منابع

1. Avicenna AA, Al-Qanun Fil-Teb. 1991, pp: 221 - 30, 286 – 8.
2. Razi Z, Alhavi. Alhavi. 1976, pp: 386 – 408.
3. Chowdhury AK, Ahsan M, Islam SN, Ahmed ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic & allicin in experimental shigellosis in rabbits. *Ind. J. Med. Res.* 1991; 93: 33 - 6.
4. Focke M, Feld A, Lichtenthaler K. Allicin a naturally occurring antibiotic from garlic specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* 1990; 261: 106 - 8.
5. Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63: 591 – 4.
6. Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63: 588 – 90.
7. Deshpande RG, Khan MB, Bhat DA, Navalker RG. Inhibition of *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients by garlic (*Allium sativum*). *J. Antimicrob. Chemother.* 1993; 32: 623 - 6.
8. Perez HA, de la Rosa M, Aptiz R. In vivo activity of ajoene against rodent malaria. *Antimicrob Agents.*



- Chemother.* 1994; 38: 337 - 9.
9. Sata N, Matsunaga S, Fusetani N, Nishikawa H, Takamura S, Saito T. New antifungal and cytotoxic steroid saponins from the bulbs of an elephant garlic mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62: 1904 – 11.
 10. Ghazanfari T, Hassan ZM, Yaraee R. Experimental effect of Garlic Extract and its fractions on *L. major* growth curve. *Kousar. Med. J.* 2000; 5: 117 - 22.
 11. Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG. In vitro virucidal effects of Allium sativum (garlic) extract and compounds. *Planta. Med.* 1992; 58: 417 - 23.
 12. Guo NL. Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus in vitro. *Chin. Med. J. Engl.* 1993; 100: 93 - 6.
 13. Gao CM, Takezaki T, Ding H, Li MS, Tajima K. Protective effect of allium vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu Province, China. *Jpn. J. Cancer. Res.* 1999; 90: 614 - 21.
 14. Sundarm SG, Milner JA. Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *J. Nutr.* 1996; 126: 1355 - 61.
 15. Rahman K. Garlic and aging: new insights into and old remedy. *Ageing. Res. Rev.* 2003; 2: 39 - 56.
 16. Ghazanfari T, Hasan ZM, Ebrahimi M. Immunomodulatory activity of a protein isolated from garlic. *Int. Immunopharmacol.* 2002; 5: 1540 - 9.
 17. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic Induced a shift in cytokine pattern in L.major infected Balb/c mice. *Scand. J. of Immunol.* 2000; 52: 491 - 5.
 18. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G., Regulation of Th1/Th2 cytokine responses by immunomodulator fraction isolated from garlic in *L. major* infected balb/c mice. *Kousar. Med. J.* 2001; 4: 217 - 24.
 19. Ghazanfari T, Hassan ZM. The Effect of immunomodulator fraction isolated from garlic on TH1 and TH2 cytokine pattern in a *L. major* Model., PhD Degree Thesis, Tarbiat Modares University, 2000.
 20. Yaraee R, Hassan ZM. Sarafnejad A. The effect of garlic extract on NK cell activity in animal model. *Daneshvar.* 1997; 3: 33 – 8.
 21. Ghazanfari T, Hassan ZM. The effect of garlic extract on Cell Mediated Immunity: Delayed Type Hypersensitivity. *Daneshvar.* 1996; 2: 83 – 8.
 22. - Ghazanfari T, Hassan ZM. The effect of garlic extract on Cell Mediated Immunity: histological changes in lymphoid organs. *Daneshvar.* 1997; 3: 49 – 61.
 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: 333 - 7.
 24. Schagger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 368 - 79.
 25. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1994; 28: 239 - 42.
 26. van Damme EJ, Smeets K, Torrekens S, van Leuven F, Goldstein IJ, Peumans WJ. The closely related homomeric and heterodimeric mannose-binding lectins from garlic are encoded by one-domain and two-domain lectin genes, respectively. *Eur. J. Biochem.* 1992; 206: 413 - 20.
 27. Wen GY, Mato A, Wisniewski HM, Malik MN, Jenkins EC, Sheikh AM, Kim KS. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of tow major proteins in garlic bulb. *J. Cell Biochem.* 1995; 58: 481 - 9.

