خالص‌سازی ترکیبات فراکشن ایمونومدولاتور سیر با استفاده از HPLC

طوبی غضنفری[1]*، رویا یارایی[2]، احمد آسوده[3]، طیبه رجبیان[4]، مژگان کاردر[5]، زهیر محمد حسن[6]، حسین نادری‌منش[7]، سفیه صوفیان[8]، داود جمالی[9]

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
٤- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگده علوم پایه، دانشگاه شاهد
۵- پژوهشگر، گروه تحقیقاتی ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
٦- 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: ۸۸۹٦٤۷۹۲ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹٦٦۳۱۰ (۰۲۱)
پست الکترونیک: tghazanfari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸٦/۷/۷ **تاریخ تصویب:** ۸۷/٦/۱٤

چکیده

مقدمه: خواص دارویی گوناگونی برای سیر و ترکیبات جداشده 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 R_{10} 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 بین۱۰ الی ۵۰ کیلو دالتون از اولترافیلترسیون استفاده شد. اجزای فراکشن R_{10} جمع‌آوری شده به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سمی-پرپاراتیو (۲۵ cm × ۱) ۱۰ Vydac ۲۰۸ TPV که یک ستون فاز معکوس C_8 است، از یکدیگر جداسازی شدند. برای تخمین اندازه پروتئین‌های جدا شده با RP-HPLC از روش تریسین SDS-PAGE استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی از محلول کوماسی بلو R_{250} 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 C_8 در شیب ۰/۲۵ درصد (دقیقه /حلال B) و سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه در مدت ٦۰ دقیقه، تعداد ٦ فراکشن عمده با نام‌های ۱- الی ٦ 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 اولترفیلتراسیون می‌توان به سرعت به ترکیبات پروتئینی با وزن بین ۱۰ الی ۱۵ کیلو دالتون دست یافت. با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس C_8 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 جداشده با استفاده از آزمون‌های بیولوژیک ضروری است.

گل واژگان: سیر، فراکشن ایمونومدولاتور، تخلیص، HPLC

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]

مقدمه

سیر[1] 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 ضدعفونی، اشتهاآور، هضم‌کننده غذا، صفرابر، 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 روده 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 آنتی‌بیوتیکی شامل اثرات ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدانگلی و ضدقارچی، تاثیر بر نارسایی‌های گردش خون و سیستم قلبی – عروقی، اثرات ضدسرطانی اشاره نمود [۳،٤،٥،٦،٧،٨،٩،١٠،١١،١٢،١٣،١٤،١٥]. 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 لیشمانیوز، افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی در مقابل تومور، افزایش ماکروفاژ و تقویت بلع و هضم انگل لیشمانیا ماژور است [۱٦،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳].

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،٤،٥،٦،٧،٨،٩،١٠،١١،١٢،١٣،١٤،١٥].

یکی دیگر از ترکیبات مهم موجود در سیر پروتئین‌های آن است. از جمله این پروتئین‌ها لکتین‌ها هستند. بیشتر این لکتین‌ها ویژگی بالایی برای قند مانوز دارند. مطالعه‌ای که توسط ون[1] در سال ۱۹۹۵ انجام شد نشان داده است که ۹٦ درصد از پروتئین‌های سیر را دو پروتئین عمده در وزن‌های ٤٥ و ١٤ KD شامل الیناز ولکتین‌های سیر تشکیل می‌دهند [٢٤]. در مطالعه دیگری وزن مولکولی لکتین 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 فراکشن R_{10} جدا شده است با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی 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 لنفوسیت‌های 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 ۵۲KD–۵۰ و ١٤ KD – ۱۱ جدا شده‌اند. خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ١٤ KD می‌باشد که در فراکشن R_{10} حاصل از اولترافیلتراسیون عصاره سیر موجود است [١٦].

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

[1] *Allium sativum* L.

[1] Wen

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]

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 جداکردن 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[1] 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 شیمیایی مقاوم هستند و قدرت جذبی بسیار پایینی دارند. ابتدا فیلترهای موردنظر به مدت چند ثانیه در محلول ۰/۱ نرمال سودقرارداده شدند تا از تداخل مقادیر ناچیز گلیسیرین وتری اتیلن 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[2] 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 ٤۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بدین ترتیب ٤ فراکشن باقی‌مانده روی فیلتر به نام‌های R100, R30, R10, Residue (R)5 و در آخر یک فیلتره به نام F5 به دست آمد. تمامی مواد به دست آمده تا زمان استفاده بعدی در یخچال نگهداری شدند.

خالص‌سازی 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 Vydac ۲۰۸ TPV۱۰ (۱ × ۲۵ cm) (Kenover آلمان) که یک ستون فاز معکوس C_8 است، از یکدیگر جدا شدند. خالص‌سازی با کمک محلول A (۰/۱ درصد TFA در آب) و محلول B (۰/۰۹ درصد TFA در استونیتریل) و با سرعت جریان ml/min ۱ از ۰ درصد محلول B تا ۱۵ درصد به مدت min ٦۰ انجام شد. شدت جذب در طول موج‌های ۲۱۵، ۲٥٤ 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 [۲٤]. ژل الکتروفورز در ۳ درصد مختلف ۷ درصد، ۱۰، درصد و ۱۵ درصد استفاده شد.

تثبیت و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو

مراحل تثبیت با کمک محلول کوماسی بلو R_{250} انجام شد (در این محلول ۲۵۰ میلی‌گرم کوماسی بلو R_{250} 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 ٤۰ 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

[1] Crude extract [2] Residue

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]

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

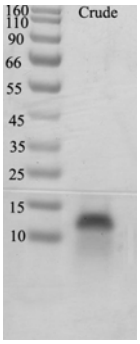
نتایج

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

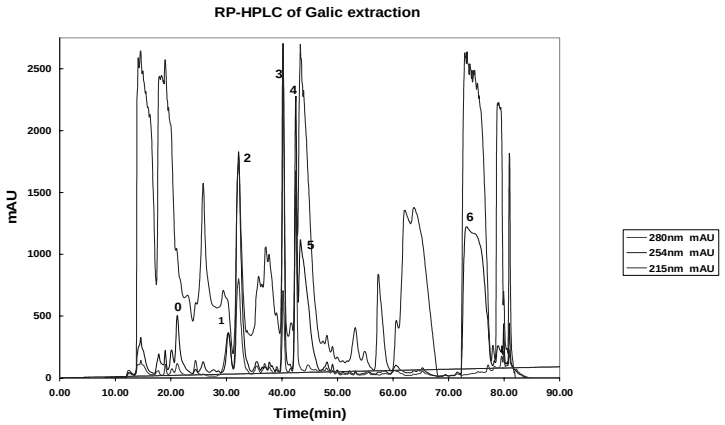
الکتروفورز SDS-PAGE وجود یک باند پهن در ناحیه ۱۰ الی ۱۵ کیلو دالتون را نشان می‌دهد (شکل شماره ۱).

در شیب ۰/۲۵ درصد (دقیقه /حلال B) و سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه در مدت ٦۰ دقیقه، تعداد ٦ فراکشن عمده با نام‌های ۱- الی ٦ جمع‌آوری شدند (شکل‌های شماره ۲ و ۳). فراکشن‌های به دست آمده از کروماتوگرافی فاز معکوس C_8 مجدداً برای خلوص بشتر با شرایط فوق با کمک ستون سمی C_8 کروماتوگرافی شدند. برای تایید خلوص آن ها نیز از ستون آنالیتیکال C_8 استفاده شد (شکل شماره ٤).

همان‌گونه که در شکل شماره ۵ دیده می‌شود فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ٦٦ کیلودالتون است. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی‌شود. فراکشن‌های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون هستند. فراکشن ٤ به صورت اسمیر خود را نشان می‌دهد. فراکشن‌های ۵ و ٦ جزء 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 کیلودالتون نیز دیده می‌شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلودالتون از خود نشان می‌دهد.

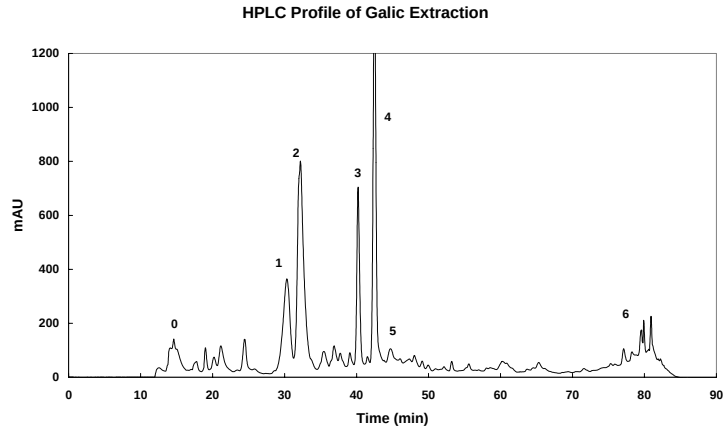


شکل شماره ۱- تصویر ژل تریسین SDS-PAGE از فراکشن R_{10} سیر (crude) در مقایسه با مارکر وزن مولکولی، نمونه R_{10} (Crude) دارای وزن مولکولی پایین (حدود ۱۲ کیلودالتون) است

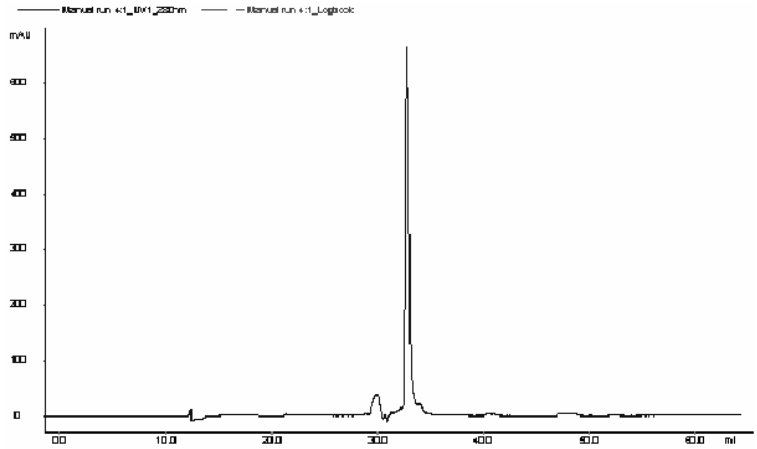


شکل شماره ۲- نمودار RP-HPLC C_8. فراکشن R10 سیر بر روی ستون سمی C_8 در طول موج‌های ۲۸۰، ۲٥٤ و ۲۱۵ نانومتر

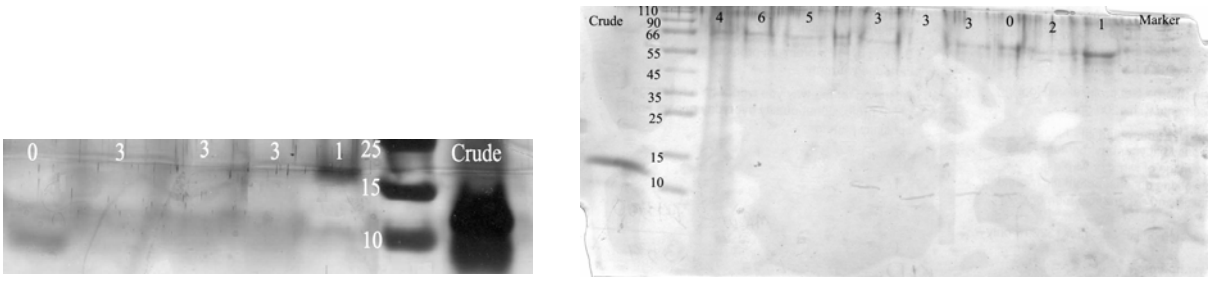
[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]



شکل شماره ۳- نمودار RP-HPLC از R10 سیر روی ستون C_8 سمی پرپاراتیو در طول موج ۲۸۰ nm



شکل شماره ٤-. نمودار RP-HPLC از فراکشن ۳ روی ستون C_8 آنالیتیکال Aquapore RP300 در طول موج ۲۸۰ nm



الف ب

شکل شماره ۵- ژل SDS-PAGE از فراکشن‌های مختلف جدا شده از ستون C_8. اعداد بالای چاهک‌ها، نشاندهنده شماره فراکشن هستند. شکل شماره (الف) سمت چپ، Crude موید عصاره فیلتر شده اولیه (R_{10}) قبل از تزریق است که عمدتاً وزن مولکولی آن بین ۱۵ – ۱۰ کیلودالتون است. فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ٦٦ کیلودالتون دیده می‌شود. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی‌شود. فراکشن‌های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲کیلودالتون هستند. فراکشن ٤ به صورت اسمیر خود را نشان می‌دهد. فراکشن‌های ۵ و ٦ جزء پروتئینی قابل تشخیصی ندارند. شکل شماره (ب) الکتروفورز فراکشن‌های۰، 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 ۱۵کیلودالتون نیز دیده می‌شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲کیلودالتون و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰کیلودالتون از خود نشان می‌دهد.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]

با توجه به نتایج فوق R_{10} حاوی ٤ جزء جداگانه است که در فراکشن‌های ۰، ۱، ۳ و ٤ جهت بررسی‌های بعدی و مطالعات ایمونولوژی جمع‌آوری شد.

نتیجه‌گیری و بحث

با کمک سیستم اولترفیلتراسیون می‌توان به سرعت به ترکیبات پروتئینی با وزن بین ۱۰ الی ۱۵ کیلودالتون 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 ۲-۳ ایزو لکتین می‌باشد [۲٦،۲۷].

در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک HPLC فاز معکوس به جداسازی اجزاء پروتئینی موجود در فراکشن R_{10} حاصل از فیلتراسیون عصاره سیر پرداخته شد. با اعمال شیب 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 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 ٤ ایزوتیپ با وزن تقریبی ۱۲ کیلودالتون 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 اثرات 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 اسست. بدین‌وسیله از مسؤولین محترم آن مرکز تشکر و قدردانی می‌نماید.

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. Re*s. 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. Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *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.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]

Chemother. 1994; 38: 337 - 9.

9. Sata N, Matsunaga S, Fusetani N, Nishikawa H, Takamura S, Saito T. New antifungal and cytotoxic steroidal 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 aprotein 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 cytokin pathern 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 Modarres 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.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2009.8.29.12.3]