

خالص سازی ترکیبات فراکشن ایمونومدولاتور سیر با استفاده از HPLC

طوبی غضنفری^{۱*}، رویا یارایی^۲، احمد آسوده^۳، طیبه رجیبیان^۴، مژگان کاردرد^۵، زهیر محمد حسن^۶، حسین نادری منش^۷، سفیه صوفیان^۸، داود جمالی^۹

- ۱- دانشیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ های 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 زیست شناسی، 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: ۸۸۹۶۷۹۲ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۹۶۶۳۱۰ (۰۲۱)
پست الکترونیک: tghazanfari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۷

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۱۴

چکیده

مقدمه: خواص دارویی گوناگونی برای سیر و ترکیبات جدا شده از آن گزارش شده است. مطالعات ما و سایرین نشان دهنده تاثیر سیر بر پاسخ های سیستم ایمنی است. در مطالعات قبلی نشان داده شد که خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به ماده موثره ای است که در فراکشن R_{10} جدا شده است.

هدف: در این تحقیق به هدف خالص سازی 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 پروتئین های بین ۱۰ الی ۵۰ کیلو دالتون از اولترافیلترسیون استفاده شد. اجزای فراکشن R_{10} جمع آوری شده به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سیمی-پرپاراتیو (۱ × ۲۵ cm) Vydac ۲۰۸ TPV که یک ستون فاز معکوس C_8 است، از یکدیگر جداسازی شدند. برای تخمین اندازه پروتئین های جدا شده با RP-HPLC از روش تریسین SDS-PAGE استفاده شد. برای رنگ آمیزی از محلول کوماسی بلو R_{250} و برای نمونه های کم که با رنگ آمیزی با کوماسی بلو مشخص نمی شوند، از رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد.

نتایج: با استفاده از ستون HPLC فاز معکوس C_8 در شیب ۰/۲۵ درصد (دقیقه / حلال B) و سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه در مدت ۶۰ دقیقه، تعداد ۶ فراکشن عمده با نام های ۱- الی ۶ جمع آوری شدند. از این میان فراکشن های ۰ و ۱ و ۳ باندهایی را در محدوده ۱۲ کیلو دالتون نشان دادند و برای بررسی های بعدی نگهداری شدند.

نتیجه گیری: با کمک سیستم اولترافیلتراسیون می توان 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 می شوند. سه فراکشن در محدوده وزن مولکولی ۱۲ KD به دست می آیند. بررسی های بیشتر جهت ارزیابی خواص ایمونومدولاتوری ترکیبات جدا شده با استفاده از آزمون های بیولوژیک ضروری است.

کل واژگان: سیر، فراکشن ایمونومدولاتور، تخلیص، HPLC



مقدمه

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 ضد عفونی، اشتها آور، هضم کننده غذا، صفرا بر، خلط آور، نیرو دهنده، کاهش دهنده فشارخون و ضد سرطان 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 جراحات 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 شده از آن گزارش شده است. از این میان می‌توان به خواص آنتی بیوتیکی شامل اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد انگلی و ضد قارچی، تاثیر بر نارسایی‌های گردش خون و سیستم قلبی - عروقی، اثرات ضد سرطانی اشاره نمود [۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵]. هم‌چنین مطالعات ما و سایرین نشان دهنده 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 [۱۶،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 ارگانوسولفور سیر مانند آلیسین نسبت می‌دهند و بررسی‌های زیادی جهت شناسایی، جداسازی و حتی تهیه پروب DNA مواد سولفور 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 لکترین‌ها هستند. بیشتر این لکترین‌ها 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 لکترین‌های سیر تشکیل می‌دهند [۲۴]. در مطالعه دیگری وزن مولکولی لکترین 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 R₁₀ 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 مورد نظر 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 ۵۰-۵۲KD و ۱۴-۱۱ KD جدا شده‌اند. خواص ایمونومدولاتوری سیر مربوط به یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۴ KD می‌باشد که در فراکشن R₁₀ حاصل از اولترافیلتراسیون عصاره سیر موجود است [۱۶].

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

¹ Allium sativum L.¹ Wen

در زمان کوتاه‌تر جهت کار آزمایشی‌های 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^۱ در یخچال نگهداری شد [۱].

روش اولترافیلترسیون

از اولترافیلترسیون با فیلترهای مختلف سیستم آمیکون استفاده شد. این فیلترها غیریونی بوده و نسبت به شونده‌ها 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 سود قرار داده شدند تا از تداخل مقادیر ناچیز گلیسرین 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^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. بدین ترتیب ۴ 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 ایمونودولاتور با استفاده از کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس (RP-HPLC)

فراکشن جمع‌آوری شده از فیلتراسیون به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سمی-پروپاراتیو (۲۵ cm × ۱) Vydac ۲۰۸ TPV۱۰ (Kenover آلمان) که یک ستون فاز معکوس C₈ 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 ۱ ml/min از ۰ درصد محلول B تا ۱۵ درصد به مدت ۶۰ min انجام شد. شدت جذب در طول موج‌های ۲۱۵، 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 درصد مختلف ۷ درصد، ۱۰، درصد و ۱۵ درصد استفاده شد.

تثبیت و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو

مراحل تثبیت 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 نیترا ت 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



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

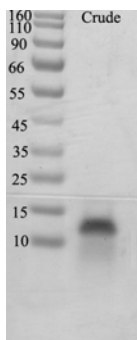
همان گونه که در شکل شماره ۵ دیده می شود فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ۶۶ کیلودالتون است. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی شود. فراکشن های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون هستند. فراکشن ۴ به صورت اسمیر خود را نشان می دهد. فراکشن های ۵ و ۶ جزء پروتئینی قابل تشخیصی ندارند. الکتروفورز فراکشن های ۱، ۳ و ۴ به همراه نمونه اولیه در ژل تریسین SDS-PAGE که به نیترات نقره رنگ آمیزی شده است نیز نشان می دهد که در فراکشن ۱، نمونه پروتئینی بالاتر از ۱۵ کیلودالتون نیز دیده می شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلودالتون از خود نشان می دهد.

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

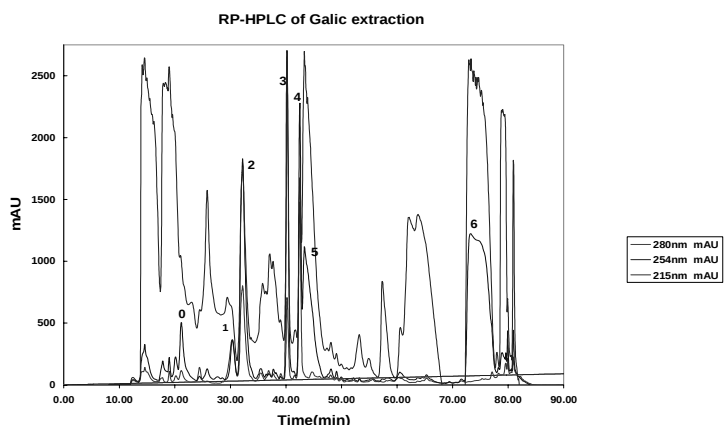
نتایج

با استفاده از روش اولترافیلتراسیون در سیستم آمیکون، فراکشن R_{10} به مقدار مورد نیاز 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 می دهد (شکل شماره ۱). در شیب ۰/۲۵ درصد (دقیقه /حلال B) و سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه در مدت ۶۰ دقیقه، تعداد ۶ فراکشن عمده با نام های ۱- الی ۶ جمع آوری شدند (شکل های شماره ۲ و ۳). فراکشن های به دست آمده از کروماتوگرافی فاز معکوس C_8 مجدداً برای خلوص بیشتر با شرایط فوق با کمک ستون

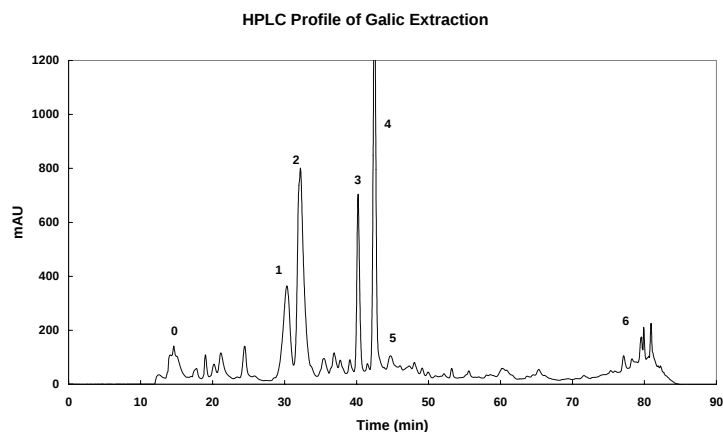


شکل شماره ۱- تصویر ژل تریسین SDS-PAGE از فراکشن R_{10} سیر (crude) در مقایسه با مارکر وزن مولکولی، نمونه R_{10} (Crude) دارای وزن مولکولی پایین (حدود ۱۲ کیلودالتون) است

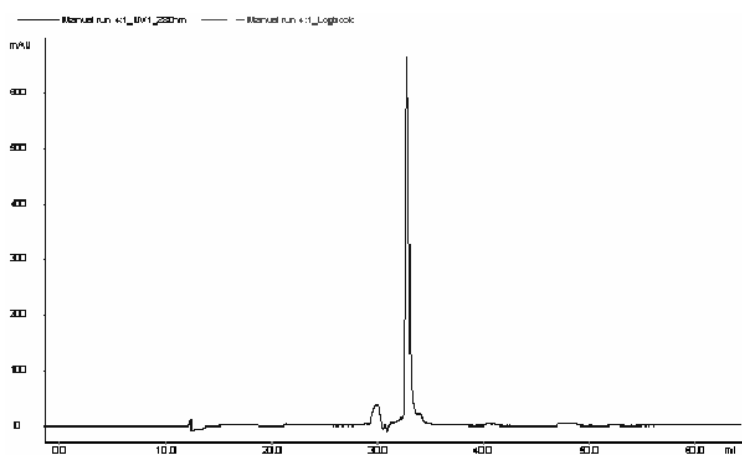


شکل شماره ۲- نمودار $RP-HPLC$ C_8 . فراکشن R_{10} سیر بر روی ستون سمی C_8 در طول موج های ۲۸۰، ۲۵۴ و ۲۱۵ نانومتر

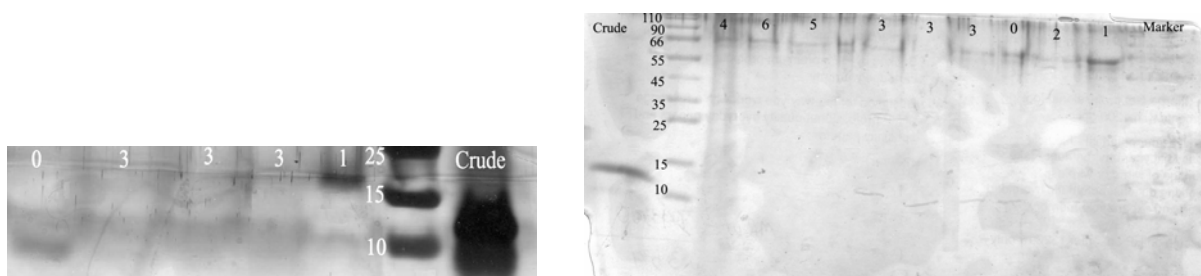




شکل شماره ۳- نمودار RP-HPLC از R10 سیر روی ستون C₈ سمی پراپراتیو در طول موج ۲۸۰ nm



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



ب

الف

شکل شماره ۵- ژل SDS-PAGE از فراکشن‌های جدا شده از ستون C₈. اعداد بالای چاهک‌ها، نشان‌دهنده شماره فراکشن هستند. شکل شماره (الف) سمت چپ، Crude مویید عصاره فیلتر شده اولیه (R₁₀) قبل از تزریق است که عمدتاً وزن مولکولی آن بین ۱۵ - ۱۰ کیلودالتون است. فراکشن ۱ دارای وزن مولکولی تقریباً ۶۶ کیلودالتون دیده می‌شود. در فراکشن ۲، باند پروتئینی دیده نمی‌شود. فراکشن‌های صفر و سه دارای وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون هستند. فراکشن ۴ به صورت اسمیر خود را نشان می‌دهد. فراکشن‌های ۵ و ۶ جزء پروتئینی قابل تشخیصی ندارند. شکل شماره (ب) الکتروفورز فراکشن‌های ۱، ۳ 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 کیلودالتون نیز دیده می‌شود. فراکشن ۳ وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلودالتون و فراکشن صفر، وزن مولکولی حدود ۱۰ کیلودالتون 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 کیلودالتون در فراکشن اولیه وجود دارد. نتایج فوق نشان می‌دهد که روش استفاده شده برای جداسازی و تخلیص ترکیبات و اجزاء فراکشن R₁₀ روش مناسبی است ولی جهت اظهارنظر درخصوص میزان اثرات ایمنومودولاتوری انجام آزمایش‌های ایمنولوژیک ضروری می‌باشد. بررسی‌های بعدی جهت انجام آزمایش‌های ایمنولوژیک 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. بدین وسیله از مسئولین محترم آن مرکز تشکر و قدردانی می‌نماید.

با توجه به نتایج فوق R₁₀ حاوی ۴ جزء جداگانه است که در فراکشن‌های ۰، ۱، ۳ و ۴ جهت بررسی‌های بعدی و مطالعات ایمنولوژی 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 لکترین متصل شونده به مانوز می‌باشد. طبق اطلاعات موجود این لکترین به صورت ۲-۳ ایزو لکترین می‌باشد [۲۶، ۲۷].

در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک HPLC فاز معکوس به جداسازی اجزاء پروتئینی موجود در فراکشن R₁₀ 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

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. 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, Navalkar 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 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 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 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 two major proteins in garlic bulb. *J. Cell Biochem.* 1995; 58: 481 - 9.

