

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 کالیمتری MTT Test برای ارزیابی فعالیت حیاتی سلولی استفاده شد. میزان سایتوکاین TNF- α در سوپرناتانت کشت سلولهای CD8⁺ T بوسیله روش ELISA اندازه گیری شد. داده های بدست آمده با استفاده از آزمون Nonparametric Test و آزمونهای Keraskel & Wanny's Test مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند.

نتایج: یافته ها نشان می دهند که تمام رقتهای فراکشن R10، فعالیت حیاتی سلولهای CD8⁺ T را در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش می دهند و در حضور میتوزن ConA، رقت ۱:۵۰ فراکشن R10 فعالیت حیاتی سلولهای CD8⁺ T را در مقایسه با میتوزن ConA افزایش می دهد. ترشح سایتوکاین TNF- α بطور قابل ملاحظه ای بوسیله تمام رقتهای فراکشن R10 افزایش می یابد. **نتیجه نهایی:** یافته ها پیشنهاد می کنند که فراکشن R10 عصاره آبی سیر می تواند بعنوان یک داروی ایمونومدولاتور برای القای ایمنی سلولی در تومور تراپی استفاده گردد.

کلید واژه ها: سلولهای CD8⁺ T / سایتوکاین ها / سیر / فراکشن R10 / فعالیت حیاتی

مقدمه:

موجود در فراکشن R10 که وزن مولکولی ۱۰ و ۳۰ > دالتون دارد، است. از طرفی لنفوسیت های T خصوصا لنفوسیت های CD8⁺ T نقش کلیدی در ایمنی بر ضد تومور دارند (۵). لنفوسیت های CD8⁺ T سلولهای توموری را بوسیله خصوصیت سایتوتوکسیتی خود با یکی از سه مسیر زیر از بین می برند: ۱- اتصال لیگاند Fas و گیرنده Fas با راه اندازی 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 سایتوکاین هایی مانند IFN- γ و TNF- α (۶)

استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق العاده ای 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)، سلولهای NK Natural Killer Cell (۳) و پاسخ افزایش حساسیت تاخیری (DTH) (۴) مورد بررسی قرار گرفته است. طی این مطالعات مشخص شده است که اثرات ایمونومدولاتوری آن بیشتر مربوط به پروتئینهای حدود ۱۴ کیلو دالتونی

* 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

۲ میلی لیتر محلول لایزینگ بافر (محلول کلرید آمونیوم ۸۳٪ و محلول تریس ۰۶٪/۲۰ به ترتیب با نسبت ۹ به ۱) حذف شدند. بعد از ۲ دقیقه، ۲ میلی لیتر از FBS (Fetal bovine serum) (شرکت زیگما) اضافه و بلافاصله بمدت ۱۰ دقیقه مانند قبل سانتریفیوژ شدند. سپس به آنها ۲ میلی لیتر محیط RPMI 1640 داری ۱۰٪ FBS اضافه شد. سپس سلولها با لام نئوبار شمارش شدند. بعد از شمارش دوباره سوسپانسیون سلولی در ۳۰۰ برای هر دقیقه سانتریفیوژ و مایع روی دور ریخته شد. به ازای هر ۱۰ میلیون (۱۰^۷) 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 آنتی بادی متصل به مگنت بید اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۸-۴^oC 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 سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و به آنها ۲ میلی لیتر محیط RPMI 1640 داری 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] و ۲ و ۵ دی فنیل ۲- تترازولیم برومید (شرکت سیگما) با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به مقدار ۲۰ میکرولیتر پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت استفاده شد (۹) که در آن تحت تاثیر دهیدروناز میتوکندریها این ماده که زرد رنگ و محلول می باشد 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 می شود.

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

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:

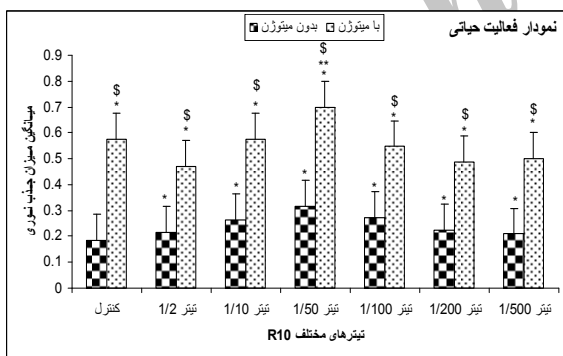
تهیه عصاره سیر: عصاره آبی سیر با استفاده از حبه های سیر تازه منطقه همدان و به روش استفاده شده توسط غضنفری و همکاران (۱) تهیه شد، به این صورت که ابتدا حبه های سیر خشک را پوست کنده و بعد از یک شب نگهداری در فریزر، بوسیله دستگاه مخلوط کن، مخلوطی یکنواخت از آن داخل آب مقطر استریل تهیه گردید. به منظور مشخص 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 ۰/۲ μm استریل شد و داخل یخچال نگهداری گردید. تهیه فراکشن R10 از عصاره سیر: برای فراکشن گیری 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 R50، R100، R30، R10، F10 به دست می آیند. فراکشن R10 که وزن مولکولی >۱۰ و <۳۰ دالتون دارد در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

پروتوکول جداسازی سلولهای CD8⁺T بوسیله کیت مگنت بید (آلمان، Miltenyi Biotec): ابتدا ۴ سر موش Balb/C ماده با سن ۶-۸ هفته خریداری شده از انستیتو پاستور ایران با اثر Lab scan- Ireland) بی هوش 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

شستشو، سوپسترا تترا متیل بنزیدین tetra methyl benzidine (TMB) (Invitrogen, USA) اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در جای تاریک در دمای اتاق انکوبه شد. با محلول متوقف کننده (1.8N H₂SO₄) واکنش متوقف و غلظت سایتوکاینها در خانه ها با الیزا ریدر در ۴۵۰ نانومتر تعیین شد. آنالیز آماری: داده‌های حاصله با نرم افزار Spss نسخه ۱۹ با استفاده از آزمون Nonparametric Test و آزمونهای Keraskel & Wanny's Test بررسی شدند.

نتایج:

نتیجه فعالیت حیاتی سلولهای CD8⁺ T تیمار شده با رقت های مختلف فراکشن R10 در مدت ۴۸ ساعت (آزمون MTT): همانگونه که نتایج (شکل ۱) نشان می‌دهند میانگین جذب نوری حاصل از احیاء MTT توسط سلولهای CD8⁺ T مجاورت داده شده در تمام رقتهای با یا بدون میتوزن از فراکشن R10 به طور معناداری در مقایسه با کنترل منفی افزایش داشته‌اند. رقت ۱:۵۰ در حضور میتوزن حتی نسبت به میتوزن افزایش معناداری در فعالیت حیاتی سلولها را باعث شده است. بقیه رقتها در حضور میتوزن یا تفاوت معناداری ندارند و یا تحریکی کمتر از میتوزن بجا گذاشته‌اند. مقایسه هر گروه (تیتراهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوزن نشان می‌دهد که در تمام دوزهای بکار رفته در حضور میتوزن فعالیت 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 میتوزن

علامت *: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل منفی (بدون

میتوزن) می‌باشد ($P \leq 0.05$)

علامت **: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها با گروه کنترل مثبت (با

میتوزن) می‌باشد ($P \leq 0.05$)

علامت \$: نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوتها بین گروهها (تیتراهای یکسان)

در حضور و عدم حضور میتوزن ($P \leq 0.05$)

بدست آورد زیرا تنها سلولهای زنده قادر به انجام این تبدیل می‌باشند و بنابراین از این روش می‌توان جهت بررسی قابلیت زنده ماندن سلولها استفاده کرد.

MTT مورد نیاز با غلظت مناسب (5 mg/ml) در آزمایشگاه تهیه و در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سلولهای CD8⁺ T به تعداد ۲۰۰,۰۰۰ سلول در خانه‌های کنترل و تستها در پلیتهای ۹۶ خانه‌ای کشت شدند. سپس رقتهای مختلف فراکشن R10 (۱/۲، ۱/۱۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰) تهیه و به خانه‌های مورد نظر دارای سلول اضافه شدند. بعد از این مرحله میتوزن ConA (Concanavalin A) به میزان $25 \mu\text{l/ml}$ به خانه‌های مورد نظر اضافه شد و پلیت برای ۴۸ ساعت در دمای 37°C و ۹۰٪ رطوبت انکوبه شد. بعد از این مرحله، محلول MTT را که مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه از قبل قرار داده شده بود به مقدار ۲۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه شد. سپس پلیت در انکوباتور قرار داده شد و پس از گذشت ۴ ساعت پلیت خارج شد و با سمپلر ۲۰۰ اقدام به تخلیه محیط کشت خانه‌های پلیت گردید، پس از تخلیه تمام خانه‌ها، ایزوپروپانول اسیدی (0.04 N HCl) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه شد. این ترکیب باعث حل شدن کریستالهای بنفش رنگ کف خانه‌ها می‌شود. سپس ماده حل شده از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه به داخل خانه‌های پلیت مخصوص الیزا انتقال داده شد. پلیت مخصوص الیزا در دستگاه خواننده الیزا 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 سلولهای زنده 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 اینویترژن (Invitrogen, USA) استفاده شد (۹). پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف به صورت overnight در 4°C با آنتی‌بادیهای موشی ضد TNF- α کوت شد. سپس پلیت شستشو و با بافر assay (Invitrogen, USA) به مدت یک ساعت خانه‌ها بلوک شدند. سه بار با بافر (0.05% Tween 20 in PBS) شستشو شدند. نمونه‌های سوپرناتانت و رقتهای مختلف استاندارد به خانه‌ها اضافه و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. ۵ بار شستشو و آنتی‌بادی ثانویه اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد بعد از

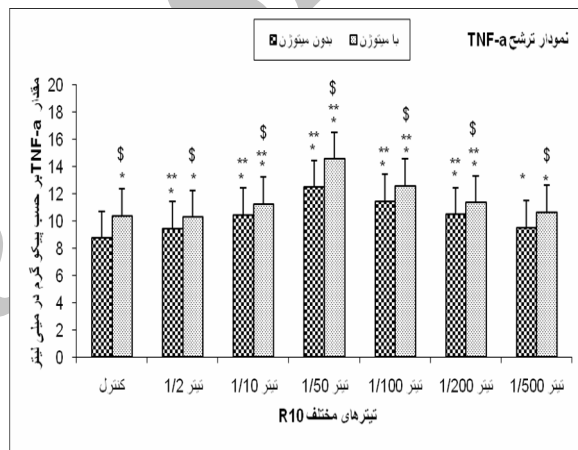
قسمت عمده تلاشهایی که جهت ایمونوترایی انجام می‌گیرد، برای افزایش توانایی و کارایی این سلولها برای مقابله با سلولهای توموری می‌باشد. بنابراین، از آنجایی که پاسخ ایمنی اختصاصی غالب در برابر تومورها و سرطانها با واسطه لنفوسیت‌های T صورت می‌پذیرد (۱۱)، سلولهای T سایتوتوکسیک تخلیص و مورد استفاده قرار گرفتند.

سیر از محصولات طبیعی موثر است و گزارش شده که اثرات ضد توموری مستقیم و تقویت‌کننده سیستم ایمنی دارد که آن را به ابزار مفیدی برای ایمونوترایی 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 T CD8⁺ تحت تاثیر فراکشن ایمونومدولاتور سیر (R10) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تمام تیتراهای فراکشن R10 فعالیت حیاتی سلولهای T CD8⁺ را در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش می‌دهد، اثر اپتیمم فراکشن R10 بر روی فعالیت حیاتی سلولهای T CD8⁺ در تیترا ۱/۵۰ این فراکشن در حضور و در غایب میتوزن 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 T CD8⁺ متعاقب مواجهه با تیتراهای مختلف فراکشن R10 خصوصا تیترا ۱/۵۰ در حضور و غایب میتوزن 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 سایتوتوکسیسته 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 T CD8⁺ را افزایش می‌دهد. افزایش قابل

نتایج میزان سایتوکاین TNF- α به دست آمده از سلولهای T CD8⁺ تیمار شده با رقتها مختلف فراکشن R10 در مدت ۴۸ ساعت (آزمون اندازه گیری سایتوکاین با روش الیزا): همانگونه که شکل ۲ نشان می‌دهد مقدار سایتوکاین TNF- α تولید شده توسط سلولهای T CD8⁺ تیمار شده با رقتهای مختلف فراکشن R10 در تمام رقتهای بدون میتوزن بطور معناداری در مقایسه با کنترل منفی افزایش نشان می‌دهند و در مقایسه با کنترل مثبت (میتوزن) بجز رقتهای ۱/۲ و ۱/۵۰ همراه با میتوزن و رقت ۱/۵۰۰ بدون میتوزن بقیه رقتها چه با میتوزن و چه بدون میتوزن تفاوت معنی داری نشان می‌دهند. مقایسه میزان ترشح سایتوکاین TNF- α هر گروه (تیتراهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوزن نشان می‌دهد که در تمام دوزهای بکار رفته در حضور میتوزن TNF- α بیشتر بوده است.



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

علامت *: نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها با گروه کنترل منفی (بدون میتوزن) می‌باشد ($P \leq 0.05$)
 علامت **: نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها با گروه کنترل مثبت (با میتوزن) می‌باشد ($P \leq 0.05$)
 علامت \$: نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها بین گروهها (تیتراهای یکسان) در حضور و عدم حضور میتوزن ($P \leq 0.05$)

بحث:

سلولهای T نقش مهمی در مراقبت و رد تومور ایفاء می‌کنند. از میان سلولهای T، سلولهای T CD8⁺ نقش حیاتی در دفاع میزبان علیه بدخیمی‌ها هم در مطالعات انسانی و هم در مطالعات حیوانی دارند (۱۰) و در واقع

سلولها و سایتوکاینهای فوق در *In vivo* قویتر و موثرتر تحریک و تومور را بطور کارآمدتری ریشه کن خواهد کرد. بنابراین R10 و اجزاء پروتئینی اش یک کاندید مناسب برای ایمونوتراپی جهت مطالعات کلینیکی روی بدخیمی های انسانی هستند. در ضمن قدرت تقویت کننده R10 روی سلولهای CTL می تواند ابزار خوبی جهت ایمونوتراپی سلولی در سرطانهای مختلف باشد.

نتیجه نهایی:

در مجموع می توان فراکشن R10 جدا شده از سیر را به عنوان یک فعال کننده بالقوه سیستم ایمنی در ایمونوتراپی تلقی کرد و در این نوع درمان ها به کار گرفت. عوامل مختلفی برای فعال کردن سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می گیرند که انتخاب یک گزینه از بین سایر گزینه ها، می تواند بر نتیجه درمان تاثیر گذار باشد.

سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد می باشد. بدین وسیله، از همکاری جناب آقای داود جمالی کارشناس گروه ایمونولوژی دانشگاه شاهد که ما را در انجام این مطالعه یاری نمود، تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

- 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.
- Gao YM, Xie JY, Piao YJ. Ultrastructural observation of intra tumoral neutrophils and macrophages induced by garlic oil. *Chung kuo Chung Hsi Chied Ho Tsa Chih* 1993;13(9):546-8, 18.
- 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.
- 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.
- Michalek J, Buchler T, Hajek R. T lymphocyte therapy of cancer. *Physiol Res*. 2004;53: 463-9.
- Andersen M, Schrama D, Straten PT, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *J Invest Dermatol* 2006; 32: 41-126.
- Ghazanfari T, Hassan Z, Ebtakar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major* infected

توجه سایتوکاین $TNF-\alpha$ در سلولهای تیمار شده با R10 در این مطالعه موافق با مطالعه گو و همکاران (۱۳) است که نشان دادند، قرص سیر بطور قابل ملاحظه ای تولید سرمی سایتوکاینهای $TNF-\alpha$ و IL-2 را به صورت وابسته به دوز در موشهای درمان شده با قرص سیر افزایش می دهد. در مطالعات زیادی اثرات سایر ترکیبات سیر مورد بررسی قرار گرفته است. کیس (۱۴) نشان داده است که آلیسین اثر مهباری روی تولید سایتوکاینهای $TNF-\alpha$ و IL-2 ندارد. پاتیا (۱۵) نشان داده است که تکثیر سلولهای طحالی و سلولهای منونوکلئور خون انسانی و سایتوتوکسیسیته سلولهای منونوکلئور خون انسانی با آلیسین افزایش می یابد. موتو (۱۶) گزارش کرده است که اثرات ضد توموری قابل توجهی در موشهای تلقیح شده با ملانوما B16 بواسطه آلیسین القاء می گردد. تاکی یاما (۱۷) نیز گزارش کرده است که آمینواسیدهای حاوی سولفور مشتق از عصاره سیر تکثیر رده سلولی ملانومایی را بصورت وابسته به دوز مهار می کند. با این وجود در این مطالعه چون براساس روش جداسازی، ترکیبات با وزن مولکولی خیلی پایین مانند آلیسین و ترکیبات سولفوردار از فراکشن R10 جدا شده اند به نظری 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 سایتوکاین $TNF-\alpha$ در سلولهای $CD8^+$ T اثرات تقویت کننده بر سیستم ایمنی نشان می دهد. مطالعه ی ون و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان داد که ۹۶٪ از پروتئینهای سیر را دو پروتئین عمده با وزنها ۴۵ و ۱۴ شامل آلیسین و لکتینهای سیر تشکیل می دهند (۱۸) و در مطالعه دیگر وزن مولکولی لکتین سیر بصورت مونومر ۱۱ KD محاسبه شد (۱۹) مطالعات قبلی ما نیز نشان داده است که پروتئین ۱۴ کیلودالتونی سیر (۷) که در فراکشن R10 موجود است، علت خواص ایمونومدولاتوری آن می باشد (۲۰). با در نظر گرفتن مطالب فوق، احتمالاً فراکشن R10 نیز حاوی پروتئینهای لکتین بوده و ممکن است از طریق تحریک پلی کلونال سلولهای ایمنی آنها را فعال نموده و باعث ایجاد خواص ایمونومدولاتوری گردد.

با توجه به اثبات اثر R10 روی سلولهای T کمکی و سایتوکاین هایش (۷) و اثر بر ایمنی ذاتی (NK Cell) (۳) در مطالعات قبلی، به نظر می رسد که این اثر ایمونومدولاتوری R10 بر سلولهای $CD8^+$ T در کنار

- Balb/c mice. *Scand J Immunol* 2000;52:491-5.
8. Teresi 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. The effect 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 lecture 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 lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF- κ B 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 of 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.

Archive

*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.