٩٤٤٤٤٩ه
نامدار
١٢ ایرانی

١٠٣٥٠٥

۸۷/۱/۱۰۰۱٤۰
۸۷/۹/۱۲٥

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته ایمنی شناسی پزشکی

اثر گلیکوپروتین 14Kd جدا شده از سیر کهنه بر روی بلوغ سلول های دندریتیک موش های Balb/C

نگارش :

حسن نامدار احمدآباد

استاد راهنما:

دکتر زهیر محمد حسن

استاد مشاور:

دکتر سید محمد موذنی

۱۳۸۷ /۹/ ۱۲

تابستان ۱۳۸۷

۱۰۲۰۰۶

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای حسن نامدار احمد آباد رشته: ایمنی شناسی گرایش: تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر زهیر صراف (استاد راهنما)

دکتر سید محمد موذنی (استاد مشاور)

دکتر معصومه ابتکار (استاد ناظر)

دکتر طوبی غضنفری (استاد ناظر)

دکتر علی اکبر پور فتح الله (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس تاریخ .....

نظر به این که چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیت‌های علمی ـ پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۱. در صورت اقدام چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادهٔ ۲. در صفحه سوم (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشتهٔ ایمنی‌شناسی پزشکی است. که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ علوم‌پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر زهیر حسن صراف و مشاورهٔ جناب آقای دکتر سید محمد موذنی از آن دفاع شده است».

مادهٔ ۳. به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ٤. در صورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادهٔ ۵. دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ٤ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ٦. اینجانب حسن نامدار احمدآباد دانشجوی رشته ایمنی‌شناسی مقطع کارشناسی‌ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
حسن نامدار
تاریخ و امضاء ۸۷/۱۲/۲

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به‌صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه / رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ٤ : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه / رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥ : این دستورالعمل در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲٥ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

حسن نامداراحمدآباد
۸۷/۸/۲۳

این ناچیز را اگر قدریست تقدیم می کنم به :

کشور عزیزم ایران

و

به همه مردان و زنانی غیوری که برای سربلندی و عزت این کشور اسلامی-آریایی از جان عزیزشان دریغ ننمودند.

«تشکر و قدردانی»

سپاس فراوان خویش را از زحمات تمام عزیزانی که برای انجام این پروژه تحقیقاتی یارو یاورم بودند اعلام می دارم که بی شک اگر نبود کمک و رهنمودهای این عزیزان انجام این پروژه کاری سخت و طاقت فرسا و شاید غیر ممکن بود.

- مراتب تشکر و قدردانی خویش را از خانواده محترمم که گرمی بخش زندگیم و چراغ هدایت راهم بودند را اعلام می دارم.
- از اساتید بزرگوار و دانشمند گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس جناب آقای دکتر پورفتح اله، جناب آقای دکتر زواران و سرکار خانم دکتر ابتکار و بطور خاص و ویژه استاد راهنمای عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر حسن و استاد مشاور مهربان و دلسوزم جناب آقای دکتر سید محمد موذنی کمال تشکر و قدردانی را دارم.
- از کارشناسان گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس سرکار خانم اسکافی و سرکار خانم محسنی و کارشناسان گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس سرکار خانم افشار و سرکار خانم اعتمادی و همچنین از سرکار خانم حیات کارشناس بخش بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران و جناب آقای جان زمین کارشناس پژوهشکده رویان که در انجام فلوسایتومتری یارم نمودند نهایت سپاس و قدردانی را ابراز می نمایم.
- از دانشجویان گروه ایمنی شناسی پزشکی آقایان؛ سعید دانشمندی، محمود بزرگمهر، حسین کریمی، مهدی مهدوی، محمد انصاری، کمال عبدالمحمدی، محمد مهدی افتخاریان و خانم ها؛ صفری، حاجی مرادی، رحیمی و شاهرخی، نیکو و همچنین دوستان عزیزم جواد کوچعلی، مجید تاکی، کمال سپاس و قدردانی را دارم.

چکیده

سیر با هدف های مختلفی در پزشکی مورد استفاده قرار می گیرد و دارای خواص متعددی همچون خواص ضد باکتریایی، ضد سرطانی و ممانعت کننده از لخته شدن خون می باشد. یکی از فراکشن هایی که در چند سال اخیر از سیر تخلیص و مورد مطالعه زیادی قرار گرفته یک فراکشن گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی 14kD می باشد. در این مطالعه اثر این فراکشن تخلیص شده از سیر کهنه بر روی بلوغ سلول های دندریتیک مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

عصاره آبی سیر کهنه بروشی که مانتیس و همکاران شرح داده بودند تهیه شد، سپس پروتئین های موجود در این عصاره با استفاده از سولفات آمونیوم رسوب داده شد. و گلیکوپروتئین 14kD با استفاده از تکنیک ژل فیلتراسیون و سفادکس G50 تخلیص گردید. همچنین به منظور جداسازی فراکشن 45kD از اولترافیلتراسیون آمیکون و ژل فیلتراسیون با سفادکس G50 استفاده شد و نتایج مربوط به تخلیص فراکشن ها با SDS-PAGE و HPLC تایید گردید.

در ادامه سلول های دندریتیک از موش های Balb/C از طریق فرایند هضم آنزیمی طحال و استفاده از محیط گرادیان نایکودنز استخراج گردیدند و پس از اینکه این سلول ها ۲ ساعت انکوبه شدند سلول های غیر چسبان حذف گردیدند و سایر سلول های باقی مانده به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در مجاورت غلظت 5μg/ml از فراکشن 14kD و یا در گروه دیگر در مجاورت غلظت 5μg/ml از فراکشن 45kD قرار داده شدند. پس از طی زمان فوق سلول های دندریتیک جمع آوری و از نظر سطوح بیان CD40، CD86 و MHCII با فلوسایتومتری مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند.

نتایج بدست آمده نشان داد که فراکشن 14kD استخراج شده از سیر کهنه سبب افزایش سطوح بیان مارکر CD40 می گردند در حالی که تاثیری بر روی بیان مارکرهای MHCII و CD86 در مقایسه با گروه کنترل ندارند.

برای انجام واکنش مختلط لنفوسیتی آلوژنیک سلول های دندریتیک پالس شده با فراکشن 14kD که 3000rad اشعه دیده بودند به عنوان گروه تحریک کننده و سلول های T جدا شده از موش های C57 با تکنیک نایلون وول به عنوان سلول های پاسخ دهنده انتخاب شدند و تکثیر سلولی با استفاده از MTT assay تعیین گردید.

نتایج حاصله نشان داد که سلول های دندریتیک پالس شده با فراکشن 14kD و سلول های دندریتیک که با هیچ آنتی ژنی پالس نشده اند از توانایی مشابه ای به منظور القاء تکثیر سلول های T برخوردار می باشند.

کلمات کلیدی؛ سیر، سلول های دندریتیک، واکنش مختلط لنفوسیتی آلوژنیک،

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل ۱- مقدمه و کلیات و مرورکارهای گذشته 16

۱-۱- مقدمه ۱۶

۱-۲- سیر و تاریخچه آن ۱۷

۱-۳- ترکیبات موجود در سیر ۱۸

۱-۳-۱- آلین یا آلین سیستئین ۲۲

۱-۳-۲- آلیناز (Alliinase) ۲۲

۱-۳-۳- آلیسین (Allicin) یا دی الکیل تیوسولفینات ۲۳

۱-۳-۴- S- آلیل سیستئین (SAC) ۲۳

۱-۳-۵- دی آلیل سولفید (DAS) ۲۳

۱-۳-۶- آجوائن (Adjoen) ۲۴

۱-۳-۷- دی آلیل دی سولفید (DADS) ۲۴

۱-۳-۸- لکتین های موجود در سیر ۲۴

۱-۳-۹- پپتیدها و پروتئین های موجود در سیر ۲۵

۱-۴- اثرات مختلف سیر کهنه (AGE) ۲۶

۱-۴-۱- جلوگیری از بیماری های قلبی و عروقی توسط AGE ۲۷

۱-۴-۲- اثرات آنتی اکسیدانتی AGE ۲۸

۱-۴-۳- اثرات ضد ویروسی AGE ۲۸

۱-۴-۴- اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی AGE ۲۹

۱-۴-۵- اثرات ضد سرطانی AGE ۳۰

۱-۴-۶- اثرات ضد آلرژی ۳۱

۱-۴-۷- اثرات ضد پیری ۳۲

۱-۵- اثرات سیر و فراکشن های تخلیص شده از آن بر روی سیستم ایمنی ۳۲

۱-۶- سلول های دندریتیک (Dendritic Cells) ۳۴

۱-۷- پردازش و عرضه آنتی ژن توسط DCs ۳۵

۱-۸- تولرانس در مقابل آنتی ژن های خودی به کمک DC s ۳۶

۱-۹- بلوغ سلول های DC ۳۷

۱-۱۰- فاکتورهای لازم برای ایجاد DC ایمونوژنیک ۳۷

۱-۱۱- زیر مجموعه های سلول های DC ۳۸

۱-۱۲- سلول های DC مستقر در ارگان های لنفوئیدی ۴۰
۱-۱۲-۱- سلول های DC مستقر در بافت ۴۱
۱-۱۲-۲- سلول های DC پلاسماسیتوئید ۴۲
۱-۱۳- منشاء سلول های DC ۴۲
۱-۱۴- اثر سلول های DC در تمایز سلو ل های T ۴۴
فصل ۲- مواد و روش ها 48
۲-۱- تهیه بافر فسفات سالین (PBS) ۰/۱۵ مولار با pH: ۷/۲ ..... ۴۸
۲-۲- محیط کشت RPMI ناقص (فاقد FCS) ۴۹
۲-۳- الکتروفورز به روش SDS-PAGE ۵۰
۲-۴- محلول برادفورد و اندازه گیری غلظت پروتئین ۵۲
۲-۴-۱- تهیه محلول برادفورد ۵۲
۲-۴-۲- اندازه گیری غلظت پروتئین بروش برادفورد ۵۳
۲-۵- تهیه تریپان بلو ۰/۴ درصد (TB) و بررسی درصد Viability سلول ها ۵۴
۲-۶- محلول پارافرمالدهید ۲ درصد (PFA) ۵۵
۲-۷- تهیه عصاره آبی سیر ۵۵
۲-۸- رسوب گیری پروتئین به کمک نمک سولفات آمونیوم ۵۶
۲-۹- دیالیز ۵۸
۲-۱۰- ژل فیلتراسیون ۵۸
۲-۱۱- سیستم اولترافیلتراسیون آمیکون ۶۰
۲-۱۲- تعیین خلوص فراکشن های پروتئینی با استفاده از HPLC فاز معکوس (RP-HPLC) ۶۱
۲-۱۳- حیوان آزمایشگاهی ۶۱
۲-۱۴- آماده سازی محلول های لازم برای جداسازی سلول های دندریتیک ۶۲
۲-۱۴-۱- بافر هضم کننده ۶۲
۲-۱۴-۲- محیط گرادیان ایزوتونیک نایکودنز ۶۳
۲-۱۵- مراحل جداسازی سلول های دندریتیک از طحال موش ۶۵
۲-۱۵-۱- هضم بافت طحال و جداسازی سلول های تک هسته ای ۶۵
۲-۱۵-۲- جداسازی سلول های کم چگال توسط محیط نایکودنز ۶۶
۲-۱۵-۳- اتصال سلول های دندریتیک به سطح پلیت پلاستیکی ۶۷
۲-۱۵-۴- کشت شبانه ۶۸
۲-۱۶- تعیین خلوص و حضور مارکرهای بلوغ در سطح سلول های دندریتیک با استفاده از فلوسایتومتری ۶۹
۲-۱۷- تخلیص سلول های T از گره های لنفاوی موش های C57 به کمک نایلون وول ۷۱
۲-۱۷-۱- آماده سازی و استریل کردن ستون نایلون وول ۷۱
۲-۱۷-۲- آماده سازی ستون برای بارگذاری سلولی ۷۳

۲-۱۷-۳- جداسازی غدد لنفاوی موش و تخلیه سلول روی ستون نایلون ول ۷۳
۲-۱۸- تعیین میزان خلوص سلول های لنفوسیت های T ۷۵
۲-۱۹- تعیین غلظت اپتیمم از سلول های دندریتیک در واکنش MLR آلوژنیک ۷۶
۲-۲۰- انجام واکنش MLR آلوژنیک با سلول های دندریتیک پالس شده با پروتئین 14kD تخلیص شده از سیر کهنه ۷۷
۲-۲۱- روش آنالیز آماری ۷۹

فصل ۳- نتایج 81

۳-۱- تهیه عصاره آبی سیر کهنه ۸۱
۳-۲- نتایج رسوب دهی پروتئین ها به کمک سولفات آمونیم ۸۱
۳-۳- نتایج حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۳
۳-۴- نتایج حاصل از تعیین میزان خلوص فراکشن 14kD با استفاده از HPLC فاز معکوس (RP-HPLC) ۸۵
۳-۵- نتایج حاصل از جداسازی فراکشن 45kD با اولترافیلتراسیون ۸۶
۳-۶- تعیین غلظت پروتئین های تخلیص شده با ژل فیلتراسیون ۸۷
۳-۷- نتایج جداسازی سلول های دندریتیک ۸۸
۳-۷-۱- نتایج جداسازی سوسپانسیون سلولی به کمک بافر هضم کننده از نظر بقاء و تعداد ۸۸
۳-۷-۲- نتایج جداسازی سلول ها با محیط گرادیان نایکودنز ۸۹
۳-۷-۳- نتایج جداسازی سلول های دندریتیک پس از کشت شبانه ۹۰
۳-۷-۴- نتایج تعیین خلوص سلول های دندریتیک ۹۰
۳-۸- نتایج تعیین غلظت موثر از فراکشن های تخلیص شده از سیر برای پالس با DCs ۹۲
۳-۹- نتایج حاصل از بارگذاری سلول های دندریتیک با فراکشن های تخلیص شده از سیر کهنه. ۹۴
۳-۱۰- نتایج حاصل از تعیین خلوص سلول های T ۹۹
۳-۱۱- نتایج تعیین نسبت مناسب سلول های دندریتیک و لنفوسیت های T در واکنش MLR آلوژنیک ۱۰۰
۳-۱۲- نتایج انجام واکنش MLR آلوژنیک با سلول های دندریتیک پالس شده با پروتئین 14kD تخلیص شده از سیر کهنه در حضور گروه های کنترل ۱۰۲

فصل ۴- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات 107

۴-۱- طرح مسئله ۱۰۷
۴-۲- تهیه عصاره سیر کهنه و رسوب پروتئین های موجود در این عصاره ۱۱۲
۴-۳- تخلیص پروتئین های 14kD و 45kD از رسوب پروتئینی ۱۱۴
۴-۴- جداسازی سلول های دندریتیک از طحال موش ۱۱۵
۴-۵- انتخاب غلظت آنتی ژنی برای بارگذاری سلول های دندریتیک ۱۲۰

۴-۶- بارگذاری سلول های دندریتیک با فراکشن 14kD تخلیص شده از سیر کهنه در حضور گروه های کنترل ۱۲۳
۴-۷- تخلیص لنفوسیت های T با استفاده از ستون نایلون وول ۱۲۷
۴-۸- واکنش MLR آلوژنیک با سلول های دندریتیک پالس شده با پروتئین 14kD تخلیص شده از سیر کهنه در حضور گروه های کنترل ۱۲۸
۴-۹- بحث و نتیجه گیری ۱۳۰
۴-۱۰- پیشنهادات ۱۳۳
فهرست مراجع 136

فهرست شکل ها

عنوان شکل | صفحه

شکل۱-۱- ترکیبات فعال موجود در سیر..... ۲۱
شکل۱-۲- تغییرات شیمیایی در سیر بدنبال نگهداری سیر در سرما و خرد کردن یا بریدن آن..... ۲۲
شکل۱-۳- زیر مجموعه های مختلف سلول های دندریتیک موش و محل قراگیری آنها..... ۳۹
شکل۱-۴- تمایز سلول های T Naive به انواع مختلف سلول های Th1، Th2،Th17..... ۴۵
شکل۲-۱- شکل شماتیک از الگوی MLR آلوژنیک با سلول های دندریتیک پالس شده با فراکشن 14kD تخلیص شده از سیر در حضور گروه های کنترل..... ۷۸
شکل۳-۱- الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین های حاصل از رسوب دهی با درصد های مختلف از نمک سولفات آمونیوم..... ۸۳
شکل۳-۲- نمودار مربوط به تعیین میزان OD فراکشن های جمع آوری شده حاصل از ستون ژل فیلتراسیون..... ۸۴
شکل۳-۳- الکتروفورزSDS-PAGE فراکشن های حاصل از ژل فیلتراسیون با سفادکس G50 . فراکشن های اولیه پروتئین 14kD به همراه فراکشن 45kD می باشد که در فراکشن های بعدی تنها پروتئین 14kD مشاهده گردید..... ۸۵
شکل۳-۴- نمودار RP-HPLC از فراکشن 14kD روی ستون C8 آنالیتیکالAquapore RP300 در طول موج ۲۸۰ نانومتر..... ۸۶
شکل۳-۵- الکتروفورزSDS-PAGE فراکشن های حاصل از ژل فیلتراسیون با سفادکس G50 برای نمونه های حاصل از اولترافیلتراسیون. با توجه به وزن مولکولی بالای پروتئین 45kD (نسبت به پروتئین تداخل کننده14kD) در فراکشن های اولیه حضور این پروتئین 45kD بصورت خالص تایید گردید..... ۸۷
شکل۳-۶- فرمول و نمودار خط مربوط به غلظت های مختلف BSA . OD غلظت های مختلف BSA با روش برادفورد سنجیده و نمودار خط و فرمول مربوط به آن تعیین گردیده است..... ۸۸
شکل۳-۷- سلول های دندریتیک در زیر میکروسکوپ فازکنتراست پس از کشت ۲ ساعته با بزرگنمایی ۲۰۰..... ۹۰
شکل۳-۸- نمایی از سلولهای دندرتیک با بزرگنمایی 200 در زیر میکروسکوپ فازکنتراست. زوائد سیتوپلاسمی سلول ها و رنگ تیره آنها پس از کشت شبانه دچار کاهش شده است..... ۹۱

شکل۳-۹- تعیین درصد خلوص سلول های دندریتیک با استفاده از آنتی بادی منوکلونال متصل به PE . ۹۲
شکل۳-۱۰- تعیین غلظت موثر از فراکشن 14kD به منظور بلوغ سلول های دندریتیک با بررسی فلوسایتومتری مارکرهای CD40، CD86، وMHCII پس از کشت شبانه. ۹۳
شکل۳-۱۱- مقایسه سطوح بیان مارکرهای بلوغ در سطح سلول های دندریتیک در حضور فراکشن های 14kD و 45kD تخلیص شده از سیر کهنه و کنترل مثبت و منفی. ۹۶
شکل۳-۱۲- نتایج مربوط به تعیین درصد سطوح بیان همزمان مارکرهای CD11c و CD40 در منطقه Up right مربوط به سلول های دندریتیک با بارگذاری های مختلف نشان داده شده است- شکل a کنترل منفی با درصد بیان ۴۱ درصد، شکل b کنترل مثبت با درصد بیان ۵۷ درصد، شکل c تیمار سلول های دندریتیک با فراکشن 45kD با درصد بیان ۴۱ درصد و شکل d تیمار سلول های دندرتیک با 14kD با درصد بیان ۵۶ درصد. ۹۸
شکل۳-۱۳- تعیین درصد خلوص لنفوسیت های T با استفاده از آنتی بادی منوکلونال CD3 متصل به PE ۱۰۰
شکل۳-۱۴- نمودار مربوط به پاسخ تکثیری سلول های T در مقابل شمار متفاوت از سلول های دندریتیک در واکنش MTT . ۱۰۱
شکل۳-۱۵- مقایسه میزان تکثیر لنفوسیتی پس از اضافه نمودن MTT در گروه های مختلف سلول های دندریتیک. ۱۰۴

فهرست جداول

عنوان جدول صفحه

جدول۱-۱- ترکیبات محلول در آب و ترکیبات محلول در روغن موجود در سیر. ۱۹
جدول۱-۲- فرمول شیمیایی و مقدار برخی ترکیبات ارگانوسولفوره حاضر در سیر. ۲۱
جدول۱-۳- برخی ترکیبات موثر موجود در AGE که موجب بهبود برخی کانسر ها در مدل های حیوانی شده است. ۳۱
جدول۲-۱- رسوب با آمونیوم سولفات . گرم آمونیوم سولفات مورد نیاز برای تهیه درصد های مختلف از این نمک با عصاره سیر کهنه در حجم یک لیتر. ۵۷
جدول۲-۲ - مراحل رنگ آمیزی سلول های دندرتیک با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال فلورسنت علیه مارکر های بلوغ. ۷۱
جدول۳-۱ - غلظت پروتئین حاصل از رسوب دهی با درصدهای مختلف سولفات آمونیوم. ۸۲
جدول۳-۲- تعیین درصد بیان مارکرهای CD40، CD86 و MHCII در سطح سلول های دندریتیک پس از کشت شبانه در غلظت های مختلف از فراکشن 14kD. ۹۴
جدول۳-۳- میزان بیان درصدهای مختلف بروز مارکرهای بلوغ در سطح سلول های دندریتیک پس از تیمارهای مختلف این سلول ها با فراکشن های 14kD و 45kD و کنترل های مثبت و منفی. ۹۷
جدول۳-۴-تعداد مختلف میزان سلول های دندریتیک در مقابل تعداد ثابت از سلول هایT در واکنش MTT، میزان متوسط OD هر غلظت سلولی در سه آزمون مستقل با سه تکرار برای هر غلظت سلولی به همراه انحراف معیار مربوطه در جدول مشاهده می گردد. ۱۰۲
جدول۳-۵- نتایج آزمون MLR آلوژنیک که میزان OD حاصل از گروه های آزمایش و کنترل را با تعداد تکرار انجام شده را پس از افزودن نمک MTT به محیط آزمایش نشان داده شده است. ۱۰۵

فصل اول:

مقدمه، کلیات و مطالعات

گذشته نگر

فصل ۱- مقدمه و کلیات و مرورکارهای گذشته

۱-۱- مقدمه

سیر در زبان و فرهنگ های مختلف به نام های متفاوتی معروف است در فارسی: سیر، عربی: ثوم، عبری: شومیم؛ سانسکریت: لهسن؛ بنگالی: رُسوم؛ پنجابی: ثوم؛ انگلیسی:garlic، فرانسوی:ail، آلمانی: knoblauch، لاتینی:allium، ایتالیایی:aglio، یونانی:skordo، اسپانیایی:ajo، روسی:chesnok. و نام علمی: Allium sativum (از تیره ی سوسنLiliaceae) و نام قرآنی این گیاه فوم است.

سیر به علت اینکه دارای ترکیبات ارگانوسولفوره می باشد و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانتی دارد به منظور پیشگیری از خیلی از بیماری ها تجویز می گردد اما تجویز سیر تازه به علت اینکه منجر به سوء هضم، کاهش وزن، کم خونی، اسهال، مهار اسپرماتوژنز و کاهش پروتئین وکلسیم سرم می گردد، از طرفی دارای ترکیبات التهاب زا و فعالیت اکسیدانتی می باشد و همچنین بوی زننده ای دارد که مشکلات اجتماعی را برای فرد مصرف کننده بوجود می آورد برای هر کسی توصیه نمی گردد به منظور رفع این موانع از یک منبع جایگزین سیر تازه که دارای بوی کمتر، فعالیت آنتی آکسیدانتی بیشتر است تحت عنوان عصاره سیر کهنه (Aged Garlic Extract) استفاده می گردد سیر کهنه در واقع به سیری گفته می شود که بیش از ۲۰ ماه در ظروف استیل در سرما نگهداری شده است. مطالعات صورت گرفته حاکی از نقش موثر AGE در محافظت در مقابل بیماری های قلبی و عروقی و آترواسکلوزیس دارد و همچنین باعث افزایش قدرت سیستم ایمنی فرد می گردد. در یکسری از مطالعات پیش کلینیکی مشخص شده که AGE قادر است از انواع مختلفی از سرطان ها پیشگیری نماید و دارای اثرات مثبتی در جلوگیری از بیماری های تخریب کننده اعصاب (neurodegenerative disease) و پیری دارد. با توجه

به اینکه مطالعه حاضر نیز به بررسی اثر فراکشن تخلیص از سیر کهنه پرداخته شده است در ادامه سعی شده به مطالعات گذشته نگر در این زمینه اشاره شود.

۱-۲- سیر و تاریخچه آن

سیر با نام علمی (Allium sativum) گیاهی است از راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagales) از تیره پیازها (Alliaceae) و سرده سیرها (Allium) که گیاهی علفی دوساله و چند ساله است که اولین بار در آسیای مرکزی کشت شده است و قرن‌ها است که بعنوان ادویه، سبزی و گیاه دارویی در مناطق مدیترانه‌ای تا آسیای مرکزی استفاده می‌شود. سیر در قالب نواحی ایران نیز بخصوص در نواحی شمالی کشور می‌روید و ارتفاع ساقه آن به ۳۰ تا ۱۰۰سانتی متر می‌رسد.گلهای سیر به رنگ صورتی کم رنگ یا سبز متمایل به سفید است که هر بوته آن هشت تا بیست حبه دارد پیازهای تازه سیر خاصیت دارویی دارند که آنها را با زرد شدن برگها در اواخر تیر تا مهرماه برداشت می‌کنند. ولی با این وجود مهمترین بخش این گیاه که مصرف دارویی و طبی دارد، هسته آن است هر هسته سیر از ۴ تا ۲۰ دانه تشکیل شده است و وزن هر دانه به حدود یک گرم می‌رسد.

کارشناسان گیاهان دارویی در سرتاسر جهان سیر را به عنوان یکی از مهمترین داروهای گیاهی تلقی می‌کنند. این گیاه در میان بسیاری از فرهنگ ها در طول هزاران سال هم مصرف غذایی و هم مصرف دارویی داشته است.گفته می‌شود کارگران ساختمانی که اهرام مصر را می‌ساختند برای مراقبت از خود در قبال بیماریها سیر مصرف می‌کردند و بر این باور بودند که مصرف سیر توسط طبقه کارگری موجب افزایش توان و بازده کاری آنها می گردد [۱]. از ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد سیر در چین به عنوان قسمتی از

رژیم غذایی روزانه مورد استفاده قرار می گرفت و در پزشکی قدیم چین از سیر برای درمان ناراحتی های گوارشی و تنفسی تجویز می گردید [۲].

در یونان باستان به منظور افزایش تحمل و استقامت سربازان و ملوانان به آنها توصیه می شد که سیر مصرف نمایند همچنین در این دوره از سیر به منظور درمان نیش زدگی های حشرات ،درمان ناراحتی های معده – روده ای ، درد مفاصل و سیروز استفاده گردید. همچنین گورکنان فرانسوی در اوایل قرن نوزدهم عصاره سیر مصرف می‌کردند تا از ابتلای آنها به طاعون که جان بسیاری از انسانها را در اروپا تلف کرده بود پیشگیری نمایند [۳]. سیر در پزشکی هند قدیم نیز به فراوانی مورد استفاده قرار می گرفت .آقای Charaka-Samhita در ۲۰۰۰ سال قبل استفاده از سیر را برای درمان بیماری های قلبی توصیه کرد و ۳۰۰ سال پس از میلاد استفاده گسترده از سیر به منظور درمان عفونتها، ناراحتی های معده روده ای ،خستگی و ضعف عمومی در میان هندی ها مرسوم بود[٤].

۱–۳– ترکیبات موجود در سیر

در حدود ۶۵ درصد وزن سیر را آب تشکیل می دهد و وزن جسم خشک سیر از کربوهیدرات های حاوی فرکتوز که با ترکیبات سولفور، پروتئین، فیبر و آمینواسیدهای آزاد همراه می باشد [۵]. سیر همچنین در بر گیرنده سطوح بالایی از ساپونین، فسفر، پتاسیم، سولفور، روی و مقدار متوسطی سلنیوم و ویتامین A و C و همچنین مقدار کمی کلسیم، منیزیم ،سدیم، آهن، منگنز، ویتامین های B کمپلکس، پروستاگلاندین ها، گلیکوزید های استروئیدی، پکتین و آدنوزین می باشد. سیر همچنین محتوای بالایی از ترکیبات فنلی را دارا می باشد [٦]. ۹۷ درصد ترکیبات موجود در سیر محلول در آب و حدود ۰/۱۵– ۰/۷ درصد از این ترکیبات محلول در روغن می باشند (**جدول۱-۱**).

جدول۱-۱- ترکیبات محلول در آب و ترکیبات محلول در روغن موجود در سیر.

Water-soluble	Oil Soluble
S-allylcysteine	Diallyl disulphide
Alliin	Diallyl trisulphide
S-propylcysteine	Methylallyl sulphide
S-ethylcysteine	Dipropyl disulphide
S-methylcysteine	Dipropyl sulphide
Se-(methyl) selenocysteine	Allyl mercaptan
Selenomethionine	Allyl methy sulphide
Selenocystine	

ترکیبات اصلی موجود در روغن فرار سیر شامل ترکیبات ارگانوسولفوره بخصوص آلیسین، دی آلیل سولفید (DAS)، دی آلیل دی سولفید (DADS)، دی آلیل تری سولفید (DATS) و اجوئن (Ajoene) می باشند در (**شکل۱-۱**) ساختار شیمیایی برخی از این ترکیبات فعال موجود در سیر نشان داده شده است، همچنین در (**جدول۱-۲**) نیز فرمول شیمیایی و مقدار آنها در سیر نشان داده شده است.

یک شیمیدان آلمانی بنام Theodor Wertheim اولین مطالعه شیمیایی را بر روی سیر انجام داد [۸,۷]. در سال ۱۸۴۴م او روغن سیر را از سیر تازه بوسیله تقطیر سازی استخراج نمود و خواص سولفور موجود در این روغن را توضیح داد و گروه هیدروکربنی حاضر را آلیل نامید.که این نام امروزه نیز استفاده می شود. و فرمول این ترکیب بصورت CH_2=CH-CH_2- است. در سال ۱۸۹۲م یک ترکیب دیگر بنام دی آلیل دی سولفید توسط Smmler در روغن سیر مورد شناسایی قرار گرفت. Cavallito یک ماده ناپایدار و بودار را در سیر بنام آلیسن (Allicin) را شناسایی کرد که این ترکیب بدنبال اثر آنزیم آلیناز روی مشتقات سیستئین حاصل می گردد. آلیناز موجود در سیر برای اولین بار در سال ۱۹۷۴م مورد توجه قرار گرفت [۹]. Stoll و Seebeck بلافاصله پیش ساز آلیسین بنام آلین (Allin) را شناسایی کردند.