DOI: 10.48305/jims.v40.i684.0632

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۸٤/هفته‌ی چهارم مهر ۱٤۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۰ تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۷/۲۸

اثرات عصارهی سیر بر بیان ژن‌های IFNγ، IL-17F و IL-17A در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماری Multiple Sclerosis

غزل رادپرور[۱]، مسعود صادقی دینانی[۲]، ناهید اسکندری[۳]، نسرین زارع[۴]، وحید شایگان‌نژاد[۵]، علی جهانیان نجف‌آبادی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیاه سیر، دارای ترکیبات استروئیدی ساپونینی با قابلیت مهار برخی واکنش‌های ایمنی مانند التهاب و تکثیر مونوسیت‌هاست. با توجه به اهمیت لنفوسیت‌های Th1 و Th17 در پاتوژنز بیماری MS (Multiple sclerosis)، و اثرات ساپونین‌ها بر تعدیل سیستم ایمنی و بیان برخی سایتوکاین‌ها، مطالعه‌ی حاضر با هدف یافتن یک داروی گیاهی جدید برای درمان مکمل MS اجرا گردید.

روش‌ها: این مطالعه‌ی تجربی در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. ابتدا از پیازهای گیاه سیر عصاره‌گیری شد. سپس با توجه به این‌که شایع‌ترین الگوی مشاهده شده این بیماری، نوع عودکننده- بهبودیابنده RRMS (Relapsing Remitting MS) است از ۵ بیمار جدید مبتلا به RRMS خون‌گیری شد و با استفاده از فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جداسازی گردید. سلول‌ها در محیط کشت RPMI و در مجاورت غلظت‌های ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ µg/ml از پارتیشن بوتانولی سیر به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شدند. سپس، به دنبال استخراج RNA، cDNA سنتز گردید و در نهایت با توجه به نقش سایتوکاین‌های interleukin-17A، interleukin-17F و interferon-γ در پاتوژنز این بیماری، میزان سطح بیان mRNA ژن‌های فوق ارزیابی گردید.

یافته‌ها: اگرچه تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی بوتانولی سیر تأثیر معنی‌داری در بیان ژن IL-17A نداشت، اما در غلظت‌های ۱ و ۲/۵µg/ml بیان ژن‌های IL-17F و IFNγ به صورت معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر بیانگر اثربخشی بهتر پارتیشن بوتانولی سیر در غلظت‌های پایین بر روی بیان ژن‌های IL-17F و IFNγ می‌باشد و به نظر می‌رسد با افزایش غلظت افزایش نسبی بیان ژن اتفاق می‌افتد اگرچه این افزایش از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌ی کنترل نداشت، با این وجود لازم است این مطالعه بر روی تعداد نمونه و محدوده‌ی غلظتی بیشتر نیز انجام گردد.

واژگان کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس؛ Alluim sativum؛ IL-17A؛ IL-17F؛ IFNγ

ارجاع: رادپرور غزل، صادقی دینانی مسعود، اسکندری ناهید، زارع نسرین، شایگان‌نژاد وحید، جهانیان نجف‌آبادی علی. **اثرات عصارهی سیر بر بیان ژن‌های IFNγ، IL-17F و IL-17A در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماری Multiple Sclerosis**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۸۴): ۶۳۹-۶۳۲

مقدمه

از زمان‌های بسیار دور، بسیاری از گونـه‌هـای *Allium* (از خـانواده‌ی *Amaryllidaceae*)، از جمله سیر، پیاز، تـره فرنگـی و موسـیر دارای مصارف خوراکی و درمانی بوده و در بسیاری از منـاطق جهـان مـورد

۱- دکتری عمومی داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دکترای ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، پژوهشگاه قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- استاد، گروه داخلی اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی جهانیان نجف‌آبادی: استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir

استفاده قرار می‌گرفتند (۱). سیر (*Allium.sativum*) در زمره‌ی قدیمی‌ترین گیاهان کشت شده از این خانواده است. این گیاه به عنوان ادویه، غذا و داروی سنتی به مدت بیشتر از ٤٠٠٠ سال استفاده شده است و در خصوص آن تحقیقات دارویی زیادی انجام گردیده و اثرات سودمند بسیاری از جمله ضدمیکروبی، ضد انعقاد، کاهش دهنده‌ی چربی خون، ضد آرتریت، پایین آورنده‌ی قند خون و ضد تومور در مورد آن به اثبات رسیده است (٤-۲). از جمله مهم‌ترین ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان جنس آلیوم می‌توان به ترکیبات ارگانو سولفوره، ساپونین ها و فلاونوییدها اشاره کرد (۵، ٦). به طور کلی انواع متفاوت ساپونین‌ها اثرات مختلفی بر سیستم ایمنی از خود نشان داده‌اند. گروهی از ساپونین‌ها در همراهی با برخی از آنتی‌ژن‌ها واجد اثرات ادجوانتی هستند (۷). ساپونین‌ها همچنین قادر به جلوگیری از برخی واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی مثل التهاب (۸) و تکثیر مونوسیت‌ها (۹، ۱۰) می‌باشند.

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis) MS، یک بیماری التهابی مزمن است که به واسطه‌ی دمیلینه شدن نورون‌ها به دنبال اختلال در عملکرد سیستم ایمنی ایجاد می‌شود (۱۱). این بیماری اتیولوژی پیچیده و دلایل هنوز نامشخصی دارد و افراد را در سال‌های پربار زندگی خود تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). این بیماری با توجه به سیر بالینی و روند پیشرفت، در چهار شکل عودکننده- بهبودیابنده (RR-MS)، پیشرونده‌ی اولیه (PP-MS)، پیشرونده‌ی ثانویه (SP-MS) و پیشرونده-عودکننده (PR-MS) طبقه‌بندی می‌شود (۱۳). تظاهرات بالینی MS به شدت متغیر بوده و به عواملی مانند محل و شدت ضایعات در سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system) CNS بستگی دارد. نشانه‌هایی مانند ضعف جسمی، خستگی و اختلال در راه رفتن از مشخصات MS است. اسپاسم‌های عضلانی به ویژه در ناحیه‌ی پاها، نوریت اپتیک که باعث اختلال در بینایی یا تاری دید می‌شود، پاراستزی (احساس گزگز)، هیپوستزی (کاهش حس و بی‌حسی)، آتاکسی، اختلال عملکرد مثانه از جمله بی‌اختیاری یا تکرر ادرار و شب ادراری، اختلال عملکرد شناختی مانند از دست رفتن حافظه و عدم تمرکز، اختلال عملکرد جنسی و افسردگی از جمله تظاهرات دیگر این بیماری است (١٤، ١٥).

کورتیکواستروئیدها از جمله داروهای مورد استفاده در درمان بیماری MS هستند که با پیوستن به گیرنده‌های خود در داخل سیتوزول به هسته رفته و فاکتورهای رونویسی از ژن‌های ایمونولوژیک را سرکوب می‌کنند. این داروها به ویژه در موارد عود MS استفاده می‌شوند (١٦). اما نکته‌ی منفی در مصرف کورتون‌ها، عوارض جانبی کوتاه‌مدت و بلندمدت آن‌هاست. مواردی مانند افزایش فشارخون، پوکی استخوان، هایپوگلایسمی، آتروفی مغزی و تأثیر روی حافظه و ادراک از عوارض جانبی کورتون‌هاست (۱۷، ۱۸).

لنفوسیت‌های +T CD4 به ویژه سلول‌های Th1 و Th17 و سایتوکاین‌های تولید شده توسط این سلول‌ها نقش مهمی در فرایند التهاب و پیشرفت بیماری دارند. لنفوسیت‌های Th1 قادر به عبور از سد خونی- مغزی هستند و با تولید اینترفرون گاما (IFNγ) در پاتوژنز MS نقش مهمی دارند (۱۹). از سوی دیگر اینترلوکین-۱۷ (IL-17) مهم‌ترین خانواده‌ی سایتوکاینی است که توسط سلول‌های Th17 تولید می‌شود و شامل IL-17A تا IL-17F می‌شود. IL-17A و IL-17F هومولوگ‌های قوی یکدیگرند و رسپتور مشترکی دارند. بنابراین، عملکرد آن‌ها تا حد زیادی یکسان است (۲۰).

شواهد حاکی از آن است که IL-17 در محل بافت‌های التهابی بیماری‌های خودایمنی، دچار افزایش بیان (up-regulation) شده و التهاب را به کمک سیتوکاین‌های دیگر مانند فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور-آلفا (TNFα) تقویت می‌کند (۲۱). از دیگر درمان‌های موجود برای درمان بیماری MS می‌توان به رویکردهای درمانی هدفمند سلول‌های Th17 در MS اشاره کرد که علیه سایتوکاین‌های مرتبط با Th17 از جمله IL-17، IL-23 و Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) طراحی شده‌اند و برخی در حال حاضر در کارآزمایی‌های بالینی در حال آزمایش هستند. آنتی‌بادی‌های انسانی خنثی‌کننده‌ی واسطه‌های التهابی از جمله IL-17A و GM-CSF، راهکارهای جدید دارویی برای این بیماری می‌باشند که اغلب آن‌ها در بیماری MS بهبود چشمگیری ایجاد نمی‌کنند (۲۲، ۲۳).

با توجه به اهمیت لنفوسیت‌های Th1 و Th17 در پاتوژنز بیماری MS، افزایش شیوع این بیماری به ویژه در جوانان و هزینه‌های بالای تأمین داروهای سنتتیک و اثرات ساپونین‌ها بر سیستم ایمنی و تعدیل آن، استفاده از داروها و مکمل‌های جدید با اثرات جانبی کمتر و سازگارتر با شرایط فیزیولوژیک بدن به عنوان یک نیاز مطرح است. بر این اساس مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثر عصاره‌ی گیاه *Allium sativum* بر میزان بیان ژن‌های IFN_{γ}، IL-17F و IL-17A به عنوان واسطه‌های درگیر در روند بیماری MS طراحی گردیده است.

روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. جهت آماده‌سازی عصاره‌ی سیر، پیازهای گیاه سیر (*Allium sativum*) خریداری شده و پس از خشک نمودن در سایه، عصاره‌گیری شد. عصاره‌گیری با استفاده از روش ماسراسیون و به صورت ٤ مرحله‌ای، به ترتیب با استفاده از حلال‌های n-هگزان،

دی‌کلرومتان، کلروفرم–متانول (۹:۱) و متانول صورت گرفت. عصاره‌ی متانولی حاصل پس از خشک شدن توسط دستگاه روتاری، توسط حلال‌های آب و بوتانول دکانته شد. پارتیشن بوتانولی تهیه شده با استفاده از دستگاه روتاری عاری از حلال گردید و توسط دستگاه فریز دراير کاملاً خشک شد. برای تهیه‌ی استوک با غلظت ۵ mg/ml ابتدا زیر هود لامینار ۲۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان کمک حلال به ۵ میلی‌گرم از پودر عصاره اضافه شد و با آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسید. بعد از حل شدن کامل پودر، محلول با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ نانومتر استریل گردید. در نهایت غلظت‌های مورد مطالعه با استفاده از این محلول ذخیره، ساخته شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs): در این مطالعه از نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به RRMS پس از کسب رضایت آگاهانه (کد اخلاق مطالعه IR.MUI.RESEARCH.REC.1399.066) استفاده شد. بیماران همگی تازه تشخیص داده شده بودند، درمان دارویی دریافت نکرده بودند و در محدوده‌ی سنی ۲۶ تا ۵۳ سال با جنسیت مؤنث قرار داشتند. با توجه به مطالعات مشابه (۲۴)، نمونه‌گیری از ۵ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان کاشانی اصفهان انجام شد. تهیه‌ی PBMCs بر اساس مطالعات مشابه صورت گرفت (۲۵). به این منظور ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی به همراه ماده‌ی ضد انعقاد در لوله‌های آزمایش جمع‌آوری و با مقدار معادل از بافر نمکی فسفات (Phosphate buffered saline) PBS استریل مخلوط گردید. سپس این مخلوط به آرامی بر روی فایکول ریخته شد و لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۸۰۰ سانتریفیوژ شدند. در نهایت لایه کدر و مجزای بین پلاسما و فایکول که واجد PBMCها می‌باشد به آرامی توسط پیپت پاستور خارج و دوبار با محلول بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو گردید.

کشت سلول‌ها: جهت کشت PBMCs، تعداد 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI حاوی 10 درصد FBS، 100U/ml پنی‌سیلین و 100µg/ml استرپتومایسین معلق و در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه‌ای یک میلی‌لیتر از لین مخلوط سلولی اضافه شد و پلیت به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور واجد ۵ درصد CO_2 در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. کشت سلول‌ها با مقادیر متفاوت از پارتیشن بوتانولی سیر شامل غلظت‌های نهایی ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ µg/ml، در حضور فیتوهماگلوتینین (PHA) به میزان ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد.

بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور به روش Real-Time PCR: پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌های کشت داده شده در شرایط مذکور، از محیط کشت جدا شده و استخراج RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت BioFACT™ Total RNA Prep Kit (بیوفکت، کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل موجود در کیت انجام شد. در پایان این مرحله مجدداً به کمک کیت سنتز cDNA بیوفکت و مطابق دستورالعمل آن، از RNA استخراج شده cDNA سنتز شد. سپس میزان سطح بیان ژن‌های IL-17A، IL-17F و IFNγ با روش Real Time PCR ارزیابی شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی بیان هر ژن را نشان می‌دهد. همچنین، از ارزیابی بیان ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع مورد استفاده در مطالعات مشابه (۲۶، ۲۷) استفاده گردید.

تغییرات بیان هر ژن از طریق معادله‌ی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. سپس میانگین نتایج هر تیمار در مورد ارزیابی میزان بیان هر یک از سایتوکاین‌ها با مقدار نمونه‌ی کنترل از طریق t-test مقایسه شد. موارد دارای اختلاف معنی‌دار با ستاره مشخص شده و همچنین Error Barها نشان‌دهنده‌ی SEM می‌باشند. $P < ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور انجام محاسبات آماری از نسخه‌ی ۸ نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده شد.

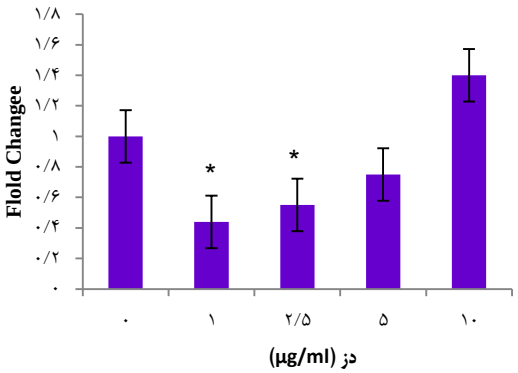
یافته‌ها

پس از استحصال سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از بیماران، تغییر میزان بیان ژن‌های $IL\text{-}17_A$، $IL\text{-}17_F$ و IFNγ به عنوان سایتوکاین‌های التهابی دخیل در MS، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از پارتیشن بوتانولی سیر، بررسی گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real-Time PCR جهت اندازه‌گیری تغییرات سطح بیان ژن‌های هدف (۲۶، ۲۷).

ژن هدف	جهت پرایمر	توالی پرایمر
IFNγ	Forward	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA
	Reverse	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
IL-17A	Forward	TCCCACGAAATCCAGGATGC
	Reverse	GGATGTTCAGGTTGACCATCAC
IL-17F	Forward	GCTGTCGATATTGGGGCTTG
	Reverse	GGAAACGCGCTGGTTTTCAT
GAPDH (Housekeeping)	Forward	TGTGGGCATCAATGGATTTGG
	Reverse	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT

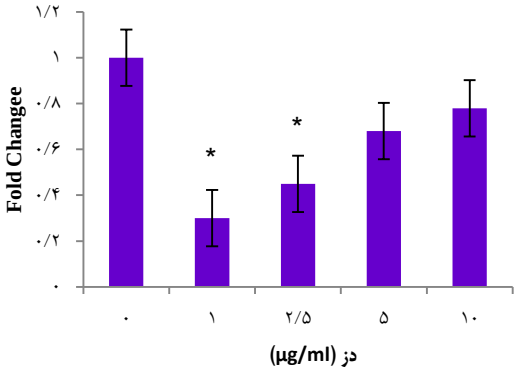
محاسبات $2^{-\Delta\Delta CT}$ و تحلیل آن‌ها به کمک آزمون‌های t-test حاکی از این بود که پارتیشن بوتانولی سیر دارای اثر کاهشی بر میزان بیان ژن‌های IL-17F (شکل ۱) و IFNγ (شکل ۲) می‌باشد که این کاهش در غلظت‌های ۱µg/ml و ۲/۵ µg/ml معنی‌دار بود.



شکل ۱. بررسی اثر تیمار سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با غلظت‌های مختلف پارتیشن بوتانولی عصاره‌ی سیر بر بیان ژن IL-17F. همانگونه که مشاهده می‌شود، تیمار فوق در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات کاهش‌دهنده‌ی قابل توجهی بر بیان IL-17F نسبت به نمونه‌ی بدون تیمار داشته است.

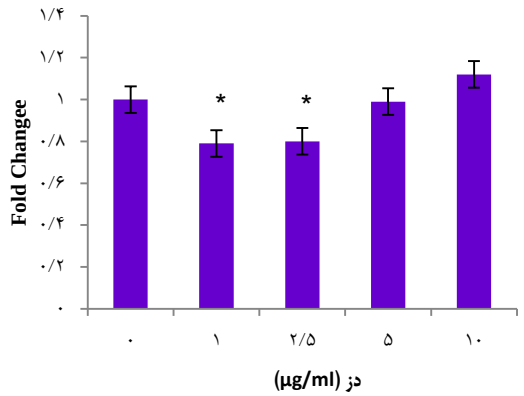
Error bars :SEM ،P = ۰/۰۵ ،n = ۵ :*

اما در خصوص ژن IL-17A (شکل ۳)، اگرچه تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پارتیشن بوتانولی سیر سبب کاهش بیان ژن نسبت به کنترل منفی شد اما اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.



شکل ۲. بررسی اثر تیمار سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با غلظت‌های مختلف پارتیشن بوتانولی عصاره‌ی سیر بر بیان ژن IFNγ. همانگونه که مشاهده می‌شود، تیمار فوق در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات کاهش‌دهنده‌ی قابل توجهی بر بیان IFNγ نسبت به نمونه‌ی بدون تیمار داشته است.

Error bars :SEM ،P = ۰/۰۵ ،n = ۵ :*



شکل ۳. بررسی اثر تیمار سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با غلظت‌های مختلف پارتیشن بوتانولی عصاره‌ی سیر بر بیان ژن IL-17A. همانگونه که مشاهده می‌شود، تیمار فوق اگرچه در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات کاهش‌دهنده‌ای بر بیان IL-17A نسبت به نمونه‌ی بدون تیمار داشته است ولی از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نبود.

Error bars :SEM ،n = ۵ :*

بحث

ما در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر پارتیشن بوتانولی سیر بر میزان بیان ژن‌های IL-17A، IL-17F و IFNγ در سلول‌های خون محیطی موارد جدید مبتلایان به MS پرداختیم. مطالعات متعددی در زمینه‌ی بررسی اثر گونه‌های مختلف *Allium* و به ویژه سیر در بیماری‌های خودایمنی از جمله آرتریت روماتوئید و یا بیماری‌هایی نظیر سرطان انجام شده است (۲۸، ۲۹) اما تعداد مطالعات به طور خاص در زمینه‌ی مورد مطالعه‌ی حاضر و بیان ژن‌های مذکور تاکنون محدود به یک مورد بوده است (۲٤).

در مطالعه‌ای که توسط Kebir و همکاران در سال ۲۰۰۹ جهت بررسی نقش سلول‌های Th17 و همچنین بیان IFNγ در MS انجام شد، شواهد قابل توجهی از نقش لنفوسیت‌های Th1 با تولید IFNγ و لنفوسیت‌های Th17 با تولید IL-17 در مالتیپل اسکلروزیس و همچنین مدل حیوانی آن (Experimental autoimmune encephalomyelitis) EAE به دست آمد (۳۰).

نتایج مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۰۷ نشان داد که لنفوسیت‌های Th17 انسانی می‌توانند با تولید واسطه‌های پیش‌التهابی از جمله IL-17A باعث کاهش اتصال پروتئین‌ها در سد خونی- مغزی (Blood-brain barrier) BBB و در نتیجه افزایش نفوذپذیری BBB شوند که در نتیجه این موضوع، مهاجرت مولکول‌های التهابی و سلول‌های ایمنی به داخل CNS افزایش می‌یابد. به این ترتیب لنفوسیت‌های Th17 با تولید سایتوکاین‌هایی مانند IL-17 نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های التهابی از جمله مالتیپل اسکلروزیس دارند (۳۱).

در تأیید شواهد به دست آمده از مطالعات فوق، مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۱، اثر سینرژیک IL-17 و TNFα را بر افزایش آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها بررسی کرد. در این مطالعه، شواهد قابل قبولی از نقش هر دو سایتوکاین مذکور در مهار سیستم‌های بقای الیگودندروسیت به دست آمد که با ریسک ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی میلین در CNS مانند مالتیپل اسکلروزیس ارتباط مستقیمی داشت (۳۲).

این مطالعات فقط به عنوان گوشه‌ای از بررسی مطالعات قبلی گواه این مطلب است که بررسی بیشتر بر روی سلول‌های Th1 و Th17 و بیان ژن‌های IL-17 و IFNγ می‌تواند به نتایج سودمندی در درمان بیماری MS منجر شود. از سوی دیگر، گیاه سیر از زمان‌های بسیار دور به عنوان یک داروی سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است و شواهدی از اثرات سودمند آن و اختصاصاً استروئید ساپونین‌ها در درمان بیماری‌ها وکاهش التهابات وجود دارد (۲، ۲۸).

برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Hodge و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که سیر به طور قابل ملاحظه‌ای تولید سایتوکاین‌های التهابی لکوسیت‌ها را به صورت in vitro مهار می‌کند. این موضوع نشان‌دهنده‌ی نقش بالقوه‌ی سیر در درمان بیماری‌های التهابی مانند بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel disease) IBD می‌باشد. به این منظور خون کامل و نیز PBMCs تعدادی بیمار مبتلا به IBD در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ی سیر قرار گرفت و تولید و ترشح تعدادی سایتوکاین با استفاده از تکنیک ELISA بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، بیان و ترشح سایتوکاین‌هایی مانند TNFα و IFNγ به میزان قابل توجهی کاهش یافت (۳۳).

در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای توسط Moutia و همکاران به صورت in vitro جهت بررسی اثر *Allium sativum* بر میزان بیان ژن IL-17 در PBMCs انجام شد که زمینه‌ساز انجام پژوهش حاضر است. در آن مطالعه، تأثیر عصاره‌ی سیر بر روی تکثیر لنفوسیت‌های CD8+ و CD4+ با استفاده از فلوسایتومتری سنجیده شده و برای بررسی این اثر بر روی بیان ژن از qRT-PCR استفاده شد. در نهایت نتایج حاکی از آن بود که عصاره‌ی سیر در محدوده‌ی ۰/۵–۴ µg/ml برای PBMC سمی نبوده و در حضور PHA به عنوان میتوژن، باعث کاهش چشمگیر و وابسته به دوز در بیان ژن IL17 شده است. با این حال تغییر محسوسی در بیان ژن IL4 به عنوان یک سایتوکاین ضدالتهابی رخ نداده است. همچنین پژوهشگران این مطالعه موفق به بررسی اثر عصاره‌ی گیاه سیر بر روی بیان ژن IFNγ نشده‌اند. بنابراین در این مطالعه، نقش بالقوه‌ی سیر در کاهش بیان ژن IL-17 نشان داده شد و از پژوهشگران جهت انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه دعوت شده است (۲۴). با در نظر گرفتن نتایج آن مطالعه و با توجه به نقش ساپونین‌ها در کاهش التهابات در نهایت تصمیم بر این شد که به طور خاص نقش استروئید ساپونین‌های گیاه *Allium sativum* بر میزان بیان ژن‌های IL-17A، IL-17F و IFNγ به عنوان سایتوکاین‌های التهابی دخیل در MS مورد بررسی قرار گیرد.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد، میزان بیان ژن IL-17A در PBMCs موارد جدید بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تحت تأثیر غلظت‌های مختلف پارتیشن بوتانولی پیاز سیر در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری ندارد. اما در مورد ژن‌های IL-17F و IFNγ نتایج، امیدوارکننده بود به گونه‌ای که میزان بیان ژن‌ها به خصوص در غلظت‌های ۱ µg/ml و ۲/۵ µg/ml به طور محسوسی کاهش پیدا کرد. در مورد غلظت‌های ۵ µg/ml و ۱۰ µg/ml این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود که می‌تواند بیانگر اثربخشی بهتر پارتیشن بوتانولی سیر در غلظت‌های پایین باشد. به این صورت که در خصوص ژن‌های IL-17 و IFNγ پارتیشن بوتانولی سیر در غلظت‌های کمتر تأثیر بیشتری در کاهش بیان ژن دارد و با افزایش غلظت یک مکانیسم معکوس را در پیش می‌گیرد تا حدی که در خصوص IL-17F افزایش نسبی بیان ژن در غلظت ۱۰ µg/ml مشاهده شد که البته از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌ی کنترل نداشت. از سوی دیگر نتایج حاصله می‌تواند حاکی از وابسته نبودن اثربخشی پارتیشن بوتانولی سیر به غلظت باشد که قطعاً نیاز به بررسی و تأمل بیشتر دارد.

توجه به این نکته ضروری است که تفاوت مختصری که در میزان بیان ژن‌های مذکور در مطالعه‌ی فعلی با مطالعه‌ی قبلی وجود دارد، می‌تواند به دلیل تفاوت در پارتیشن بوتانولی سیر و همچنین تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی نیز باشد. زیرا در مطالعه‌ی قبلی اثر عصاره‌ی کامل سیر مورد بررسی قرار گرفته در حالی که در مطالعه‌ی حاضر پارتیشن بوتانولی سیر و به طور خاص استروئید ساپونین‌ها بررسی شدند.

نتیجه‌گیری

اگرچه پارتیشن بوتانولی عصاره‌ی گیاه سیر تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن IL-17A نشان نداد اما این پارتیشن در غلظت‌های پایین بر روی بیان ژن‌های IL-17F و IFNγ اثربخشی کاهنده‌ی قابل توجهی داشت و به نظر می‌رسد با افزایش غلظت عصاره‌ی این اثر مهاری کاهش می‌یابد.

به منظور تکمیل نتایج به دست آمده از این مطالعه در تحقیقات آتی پیشنهاد می‌گردد از تعداد نمونه‌های بیشتر و همچنین غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از پارتیشن بوتانولی سیر بررسی شود. بررسی اثر پارتیشن گیاه سیر بر سایر سایتوکاین‌های مترشحه از Th1 و Th17 و

نیز بر روی تعداد لنفوسیت‌های Th1 و Th17 و Regulatory T cells (T_{reg}) هم از دیگر پیشنهادات برای پژوهش‌های بعدی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دانشجوی دکترای عمومی داروسازی بـــا کـــد علمـــی ۳۹۹۰۲۷ و کـــد اخـــلاق IR.MUI.RESEARCH.REC.1399.066 بوده و توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد حمایت مالی قرار گرفته است. بدین‌وسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه و همراهی بیماران در انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Chase MW, Reveal JL, Fay MF. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. Bot J Linn Soc 2009; 161(2): 132-6.
2. Thomson M, Ali M. Garlic [Allium sativum]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. Curr Cancer Drug Targets 2003; 3(1): 67-81.
3. Milner JA. Garlic: its anticarcinogenic and antiumorigenic properties. Nutr Rev 1996; 54(11 Pt 2): S82-6.
4. Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. J Nutr 2001; 131(3): 951S-S.
5. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr 2001; 131(3): 955S-62S.
6. Sang S, Mao S, Lao A, Chen Z, Ho CT. New steroid saponins from the seeds of Allium tuberosum L. Food Chem 2003; 83(4): 499-506.
7. Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, Yoshikawa M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. Biol Chem 2000; 381(1): 67-74.
8. Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from Acacia victoriae (Bentham), inhibit activation of nuclear factor-κB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(20): 11557-62.
9. Delmas F, Di Giorgio C, Elias R, Gasquet M, Azas N, Mshvildadze V, et al. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α-hederin, β-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. Planta Med 2000; 66(4): 343-7.
10. Yui S, Ubukata K, Hodono K, Kitahara M, Mimaki Y, Kuroda M, et al. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of Securidaca inappendiculata. Int Immunopharmacol 2001; 1(11): 1989-2000.
11. Karimi A, Delpisheh A, Ashtari F, Sayehmiri K, Meamar R. The relationship between the amount of radiation, relative humidity, and temperature with the risk of multiple sclerosis in Isfahan Province, Iran, during the years 2001-2014 [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2017; 35(427): 434-9.
12. Shaygannezhad V, Amini H. Comparing the efficacy of monthly cyclophosphamide as monotherapy versus daily fingolimod in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2017; 35(435): 719-25.
13. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. Eur Neurol 2014; 72(3-4): 132-41.
14. Bagert B, Camplair P, Bourdette D. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: natural history, pathophysiology and management. CNS Drugs 2002; 16(7): 445-55.
15. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology 1996; 46(4): 907-11.
16. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. Cochrane Database Syst Rev 2012; 12: CD006921.
17. Manson SC, Brown RE, Cerulli A, Vidaurre CF. The cumulative burden of oral corticosteroid side effects and the economic implications of steroid use. Respir Med 2009; 103(7): 975-94.
18. Ontaneda D, Rae-Grant AD. Management of acute exacerbations in multiple sclerosis. Ann Indian Acad Neurol 2009; 12(4): 264-72.
19. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-γ shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. J Immunol 2000; 164(5): 2759-68.
20. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. Mediators Inflamm 2017; 2017: 3908061.
21. Qian Y, Kang Z, Liu C, Li X. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. Cell Mol Immunol 2010; 7(5): 328-33.
22. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH 17 cells in chronic inflammation. Nat Rev Drug Discov 2012; 11(10): 763-76.
23. Constantinescu CS, Asher A, Fryze W, Kozubski W, Wagner F, Aram J, et al. Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2015; 2(4): e117.
24. Moutia M, Seghrouchni F, Abouelazz O, Elouaddari A, Al Jahid A, Elhou A, et al. Allium sativum L. regulates in vitro IL-17 gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. BMC Complement Altern Med 2016; 16(1): 337.
25. Kamali E, Hojati Z, Rahbarizadeh F. Targeted gene eEditing in human primary T cells using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2021; 39(612): 66-75.
26. Liu Y, Cui X, Wang S, Liu J, Zhao N, Huang M,

et al. Elevated microRNA-326 levels regulate the IL-23/IL-23R/Th17 cell axis in Hashimoto's thyroiditis by targeting a disintegrin and metalloprotease 17. Thyroid 2020; 30(9): 1327-37.

27. Kolagar TA, Mohebbi SR, Ashrafi F, Shoraka S, Aghdaei HA, Zali MR. Evaluation of IL-17A and IL-17F gene expression in peripheral blood mononuclear cells in different clinical stages of chronic hepatitis B infection in an Iranian population. MJT 2020; 24(2): 59-64.

28. Tesfaye A. Revealing the therapeutic uses of garlic (allium sativum) and its potential for drug discovery. ScientificWorldJournal 2021; 2021: 8817288.

29. Hosseinzadeh F, Sadeghi-Dinani M, Jahanian-Najafabadi A. The cytotoxic and pro-apoptotic effects of various extracts of allium giganteum on MCF-7 and hela cell lines [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2021; 39(636): 578-83.

30. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. Ann Neurol 2009; 66(3): 390-402.

31. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Giuliani F, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. Nat Med 2007; 13(10): 1173-5.

32. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. J Neurochem 2011; 116(4): 508-21.

33. Hodge G, Hodge S, Han P. Allium sativum (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. Cytometry 2002; 48(4): 209-15.

DOI: *10.48305/jims.v40.i684.0632*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 684, 4th Week, October 2022**

Received: 13.11.2021 Accepted: 02.10.2022 Published: 20.10.2022

The Effects of Garlic Extract on IL-17A IL-17F and IFNγ mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Multiple Sclerosis Patients

Ghazal Radparvar[1], Masoud Sadeghi-Dinani[2], Nahid Eskandari[3], Nasrin Zare[4], Vahid Shaygannejad[5], Ali Jahanian-Najafabadi[6]

Original Article

Abstract

Background: Garlic contains steroidal saponins which modulate several aspects of the immune system including inflammation and monocyte proliferation. Considering the importance of Th1 and Th17 lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS), and the modulatory effects of saponins on the immune system, the present study was performed in search for a novel herbal medicine for the treatment of MS.

Methods: This experimental study was performed at Isfahan University of Medical Sciences in 2020. Garlic onions were collected and subjected to extraction. Next, blood samples were collected from five new cases with Relapsing remitting MS (RRMS) being the most prevalent type of MS, and Peripheral Blood mononuclear cells were isolated using Ficoll™. Cells were cultured in RPMI medium and treated with 1, 2.5, 5 and 10 µg/ml of garlic butanol partition for 18 hrs. Then, the cells were subjected to RNA extraction, cDNA synthesis and Real-Time PCR for analysis of IL-17A, IL-17F and IFNγ mRNA expression levels.

Findings: Although treatment of the cells with the above concentrations of the garlic butanolic extract showed no significant effect on the IL-17A gene expression level, but the 1 and 2.5 µg/ml concentrations significantly reduced mRNA expression levels of IL-17F and IFNγ genes.

Conclusion: Since reduction in the expression level effects was not significant at 5 and 10 µg/ml, it is concluded that the extract might be effective at low concentrations or the effect should not be concentration dependent. Further studies on more samples and with a range of lower concentrations should be performed.

Keywords: Multiple sclerosis; Allium sativum; IL-17A; IL-17F; IFNγ

Citation: Radparvar G, Sadeghi-Dinani M, Eskandari N, Zare N, Shaygannejad V, Jahanian-Najafabadi A. **The Effects of Garlic Extract on IL-17A IL-17F and IFNγ mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Multiple Sclerosis Patients.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(684): 632-9

1- Doctor of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD in Medical Immunology, Applied Physiology Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Jahanian-Najafabadi, Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir