

مقاله پژوهشی

اثرات عصاره هیدرو الکلی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L) بر عملکرد میزان تکثیر لنفوسیت ها و پاسخ های ایمنی ذاتی بعد از چالش با واکسن REV1 در رت های ویستار

سید میثم ابطحی فروشانی^{۱*}، سعید نفیسی^۲، هادی اسمعیلی گورچین قلعه^۱، بهمن منصوری مطلق^۱، محمد صدیق شهریار یاری نور^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: گیاه دارویی هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* L. از خانواده Cucurbitaceae، از راسته کدو Cucurbitales بوده که از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها به کار برده شده است. هدف اصلی این مطالعه تعیین اثرات احتمالی عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L) بر پاسخ های هومورال و سلولی سیستم ایمنی بعد از چالش با واکسن REV1 در رت های ویستار است.

مواد و روش ها: جامعه مورد مطالعه شامل ۲۰ سر رت نر بود که به طور تصادفی در دو گروه مساوی قرار گرفتند و با واکسن REV1 (REV1 + ۰/۱ ml + ۰/۱ ml PBS) ایمونیزه شدند. گروه تیمار به صورت خوراکی روزانه ۵۰ mg/kg از عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل را از شروع مطالعه به مدت ۲ هفته دریافت کردند. ۵ روز بعد از آخرین تزریق، خون گیری از رت ها انجام شد. هم چنین ۴۸ ساعت قبل از خون گیری واکسن REV1 (REV1 + ۰/۱ ml + ۰/۱ ml PBS) به کف پای چپ رت ها تزریق گردید. سطح آنتی بادی ضد REV1 و ایمنی سلولی به ترتیب از طریق سرواگلوتیناسیون، میزان تورم کف پا و رنگ سنجی گریس سنجیده شد. میزان تکثیر لنفوسیتی، تولید نیتریک اکسید (NO)، شدت انفجار تنفسی و میزان فاگوسیتوز در بین جمعیت سلول های طحالی به ترتیب با آزمون های MTT، گریس، NBT و آزمون اسلایدی تعیین گردید.

نتایج: سطح تولید آنتی بادی ضد REV1، میزان فاگوسیتوز و تکثیر سلول های طحالی در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار یافت. در عین حال میزان ایمنی سلولی (DTH)، قابلیت انفجار تنفسی و میزان نیتریک اکسید سلول های طحالی نیز به طور معنی داری در گروه تیمار کاهش یافته بود ($p < 0/05$). نتیجه گیری: عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل می تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی با قابلیت تعدیل کننده سیستم ایمنی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: میوه هندوانه ابوجهل، ایمنی هومورال، ایمنی سلولی، ایمنی ذاتی

مقدمه

شناسایی شده در آن ها به عنوان داروهای جدید مورد استفاده قرار می گیرند و می توانند به عنوان کلیدی برای شناسایی روش های درمانی کم هزینه و دارای عوارض جانبی کمتر در درمان بسیاری از بیماری ها به کار روند (۱۵). گیاه دارویی هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* L. از خانواده Cucurbitaceae، از راسته کدو Cucurbitales بوده که از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها به کار برده شده است و تحقیقات آزمایشگاهی متعددی خواص درمانی آن را اثبات کرده اند (۱۶). عصاره میوه این گیاه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین ها، تری ترپنوئیدها و گلیکوزیدها است (۱۷). از میوه هندوانه ابوجهل به عنوان ضد قند

گیاهان دارویی در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری ها به کار برده شده اند. نتایج بررسی های علمی روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری های مختلف از جمله بیماری های عفونی (۱)، سرطان (۳)، دیابت (۴، ۵)، گوارشی (۶، ۷)، سوختگی (۸) و عصبی (۹) بسیار امیدوار کننده بوده است. اگرچه این گیاهان نیز عاری از عوارض نیستند (۱۰، ۱۱) ولی معمولاً نسبت به داروهای سنتتیک عوارض کمتری دارند و حتی در بسیاری از موارد ممکن است به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی (۱۲) سمیت داروهای دیگر را کم کنند (۱۳، ۱۴). امروزه ترکیبات

* نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
Email: meysamabtabhi@hotmail.com

گرفتند. از روز شروع ایمونیزاسیون به این موش‌ها نیز ۵۰ mg/kg آب مقطر گاوژاژ شد.

تهیه عصاره هیدرو الکلی

بعد از تهیه میوه هندوانه ابوجهل از روستای گورچین قلعه منطقه انزل شهر ارومیه، جنس و گونه آن توسط کارشناس هرباریم گروه زیست‌شناسی تعیین گردید. بخش گوشتی میوه گیاه هندوانه ابوجهل، پس از جمع‌آوری و خشک کردن در سایه، از دانه‌ها جدا و پودر گردید. ۱۰۰ گرم از این پودر به نسبت ۵۰:۵۰ در نیم لیتر محلول آب مقطر و اتانول خیسانده شده و پس از ۴۸ ساعت از صافی عبور داده شد سپس به وسیله دستگاه فریزدرایر (Vac05 ZirBus, Germany) در دمای ۵۰°C - سانتی‌گراد و تحت شرایط خلأ تغلیظ گردید (۲۴).

تعیین دوز قابل تحمل

پس از تیمار رت‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ mg/kg) مشخص گردید غلظت ۵۰ mg/kg به عنوان حداکثر دوز با بالاترین زنده‌مانی است.

ارزیابی ایمنی هومورال

پس از خون‌گیری سرم حیوانات جدا شد و تیتراژ پادتن تولیدشده علیه REV1 به شیوه میکروهماگلوتیناسیون تعیین گردید (۱۸، ۱۹).

ارزیابی ایمنی سلولی

۴۸ ساعت قبل از خون‌گیری به کف پای چپ حیوانات واکسن REV1 (۰/۱ ml PBS+ ۰/۹ ml REV1) تزریق شد. هم‌زمان ۱ میلی‌لیتر PBS به پای راست جانوران تزریق گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت و قبل از خون‌گیری ضخامت پای رت‌ها به کمک کولیس (Mauser Dial Caliper-Germany) سنجیده شد. افزایش ضخامت کف پا به شاخص ایمنی سلولی اکتسابی طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۱۸، ۱۹):

(چپ پای تورم مقدار-راست پای تورم مقدار)/(راست پای تورم مقدار) = شاخص واکنش ایمنی سلولی

تهیه کشت سلولی طحال

به دنبال خون‌گیری از رت‌ها، طحال آن‌ها تحت شرایط استریل خارج شد. سپس بافت طحال در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma - آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (شرکت Gibco - آلمان) قطعه‌قطعه و له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲

خون، ضد فشارخون، ضد تومور، ضد تب، ضد میکروب و همچنین در درمان دیابت، بواسیر، هایپرلیپیدمی، زخم معده، بیماری‌های ادراری، روماتیسم، ضعف اعمال روده، بیماری‌های کبدی، ادم و همچنین به عنوان مسهل قوی استفاده می‌شود (۲۰-۱۸). همچنین در مطالعات معدودی به بررسی اثرات ضدالتهابی این گیاه در مدل التهاب ایجادشده با کارژینان (carrageenan) اشاره شده است (۲۱). مشخص است که واکنش‌های التهابی با عملکردهای سیستم ایمنی درهم‌تنیده شده است (۲۲). باین حال تاکنون مطالعات جامعی در مورد اثرات این عصاره بر دستگاه ایمنی بدن صورت نگرفته است. REV1 واکسن زنده تخفیف حدت یافته علیه بیماری بروسلا ملیتینسیس است که به صورت لیوفیلیزه عرضه می‌گردد. در این مطالعه ما برای تحریک سیستم ایمنی رت به عنوان آنتی‌ژن از آن استفاده نمودیم. با توجه به موارد ذکرشده هدف اصلی ما در این مطالعه تعیین اثرات احتمالی عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل بر پاسخ‌های هومورال و سلولی سیستم ایمنی بعد از چالش با آنتی‌ژن REV1 (سویه زنده واکسن بروسلا ملیتینسیس) در مدل رت است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مداخله‌ای-تجربی است. جامعه مورد مطالعه در این بررسی شامل ۲۰ سر رت نر در محدوده سنی ۶-۸ ماه است که از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شده بودند. رت‌ها در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه نوری-۱۲ ساعت تاریکی) درجه حرارت ۲۲ الی ۲۴°C با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند (۲۳). پس از طی زمان موردنظر جهت تطابق رت‌ها (۲ هفته)، حیوانات به طور تصادفی در دو گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

گروه تیمار: رت‌های این گروه در روز شروع آزمایش و یک هفته بعد از آن به صورت داخل صفاقی تحت تزریق واکسن REV1 (۰/۱ ml PBS+ ۰/۹ ml REV1) قرار گرفتند (۲۴). همچنین رت‌های گروه تیمار روزانه ۵۰ mg/kg از عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل را از شروع مطالعه به مدت ۲ هفته به صورت خوراکی دریافت کردند.

گروه شاهد: رت‌های این گروه مشابه با گروه قبلی تحت چالش با واکسن REV1 (سویه زنده واکسن بروسلا ملیتینسیس) به عنوان یک پادگن مناسب جهت تحریک سیستم ایمنی قرار

میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتیریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور، به‌منظور حذف RBCها، بر روی رسوب سلولی به‌دست‌آمده ۵ ml بافر لیز کننده افزوده و بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتیریفیوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به حالت سوسپانسیون درآورده شد (۲۶).

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های موجود در بین جمعیت سلول‌های طحالی با روش MTT

پس از طی مراحل که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسونی حاوی 1×10^6 تهیه و ۱۰۰ μ l از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور ۵۰ μ l از محلول فیتوهماگلوتنینین ۱ mg/ml و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوتنینین در نظر گرفته شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده گردید. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 به هر چاهک ۲۵ μ l محلول ۵ mg/ml MTT در PBS افزوده‌شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT (۳-۵،۴-دی متیل تiazول ۲-یل)-۵،۲-دی فنیل تترازولیوم بروماید) وسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل بلوره‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۲nm تعیین و نمایه تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۲۶):

$$\text{OD} \text{ در حضور فیتوهماگلوتنینین} - \text{OD (بلانک)} / \text{OD} \text{ در حضور فیتوهماگلوتنینین} = \text{نمایه تحریک}$$

اندازه‌گیری نیتریک اکسید

میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی و استفاده از منحنی استاندارد (Griess) نیتريت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه، سلول‌های طحالی پس از مجاور سازی با فیتوهماگلوتنینین مشابه با روش توضیح داده‌شده در مورد آزمون MTT مجاور شدند. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت سلول‌های طحال به‌صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma، امریکا) به چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد ۱- N نفتیل اتیلن دی آمین دی

هیدروکلراید (شرکت Sigma-امریکا) اضافه و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. درنهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا نگار قرائت گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم منحنی استاندارد ترسیم‌شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

سنجش قابلیت انفجار تنفسی در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحال

سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^6 cell/ml تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه گردید، سپس خانه‌ها با محیط کشت هنکس به‌منظور حذف لنفوسیت‌ها شستشو داده شدند. سلول‌های باقیمانده به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه گردید. آن‌گاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زی‌موزان و NBT (نیترو بلو تترازولیوم) (شرکت Sigma-امریکا) به هریک از خانه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. درنهایت ۴۰۰ میکرولیتر N-N دی متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه شده و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتیریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الیزا نگار در طول موج ۵۴۰ nm قرائت گردید (۲۶).

سنجش فاگوسیتوز

پس از جداسازی سلول‌های طحالی سلول‌ها و انکوبه نمودن آن‌ها با مخمر اپسونیزه مشابه با مراحل قبلی، سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. آنگاه سلول‌ها با همتوکسیلین-ائوزین، رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰ x بررسی شدند. تعداد ۵ شان به ازای هر لام مورد مطالعه قرار گرفت. هر شان حدوداً حاوی ۷۰-۱۰۰ سلول طحالی بود. شاخص فاگوسیتوز به‌صورت درصد سلول‌هایی که شامل حداقل یک سلول فاگوسیت شده بودند، گزارش شد (۲۷).

آنالیز آماری: جهت مقایسه میانه‌ها از آزمون Mann-Whitney-U استفاده گردید. سطح $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۱ انجام و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار (Microsoft Excel 2013) استفاده گردید.

نتایج

کاهش قابلیت انفجار تنفسی مونوسیت/ماکروفاژهای طحالی در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد است (جدول ۲). در نهایت نتایج به دست آمده حاکی از میزان تولید نیتریک اکسید در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است (جدول ۲).

ایمنی سلولی اکتسابی به دنبال چالش با REV-1 بر مبنای واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) سنجیده شد. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، رت‌های تحت

جدول ۱- مقایسه پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به دنبال چالش با REV-1 بین گروه‌های شاهد و تیمار

گروه‌ها	تیترا آنتی‌بادی علیه REV1	درصد تورم کف پا	(جذب نوری) MTT
کنترل	$320/65 \pm 8/22$	$35/49 \pm 2/33$	$0/542 \pm 0/12$
تیمار	$1026/08 \pm 4/11$	$13/14 \pm 3/23$	$1/604 \pm 0/14$
P value	$<0/001$	$<0/01$	$<0/001$

جدول ۲- مقایسه پاسخ‌های سلول‌های فاگوسیت کننده طحال به دنبال چالش با REV-1 بین گروه‌های شاهد و تیمار

گروه‌ها	نیتریک اکسید (میکرومول در میلی‌لیتر)	درصد فاگوسیتوز	(جذب نوری) NBT
کنترل	$59/36 \pm 1/01$	$46 \pm 1/33$	$1/054 \pm 0/03$
تیمار	$41/11 \pm 3/30$	$74 \pm 8/33$	$0/723 \pm 0/03$
P value	$<0/001$	$<0/001$	$<0/001$

بحث و نتیجه‌گیری

تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی موجود زنده به دنبال چالش‌های ایمونولوژیک، نقش مهمی را در بهبود عملکرد طبیعی سایر دستگاه‌های بدن بازی می‌کند. امروزه استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت تعدیل‌کننده ایمنی و ضدالتهابی، جایگزین نوینی برای داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی شده است (۲۸). مطالعات انجام‌شده کاربرد عصاره میوه گیاه هندوانه ابوجهل را در اختلالات گوارشی، عفونت‌های باکتریایی و کاندیدیایی، اختلالات قندی و چربی، دیابت نوع II، اختلالات تولیدمثلی و باروری، سرطان پستان مفید دانسته‌اند (۲۹). ترکیبات گزارش‌شده موجود در عصاره گیاه هندوانه ابوجهل شامل نشاسته، تانن، ساپونین، انواع پروتئین‌ها، قندهای احیاکننده، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و گلیکوزیدها، تری‌ترین‌ها (α - and β - amyrins, oleanolic acid, ursolic acid, lupeol, glycirretinic acid) می‌باشند (۱۶). اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آلکالوئیدها و فلاونوئیدها در مطالعه شیک و همکاران گزارش شده است (۳۰). هم‌چنین کاربرد مؤثر این ترکیبات در بهبود آلرژی،

تیمار با عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل به‌طور معنی‌داری یک کاهش ۲/۷ برابری را در واکنش DTH نشان دادند. در مقابل تیترا آنتی‌بادی اختصاصی علیه REV-1 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری یک افزایش ۳/۲ برابری را نشان می‌دهد (جدول ۱). نتایج آزمون MTT حاکی از افزایش در میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی با عصاره آبی گیاه شیرین‌بیان در قیاس با گروه شاهد است (جدول ۱). بر اساس داده‌های به دست آمده به نظر می‌رسد که شدت فاگوسیتوز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به ترتیب افزایش معنی‌داری یافته است (جدول ۲). در آزمون احیای NBT توانایی و ظرفیت سلول‌های فاگوسیت کننده در تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه آنیون سوپراکسیداز مشخص می‌گردد. آنیون سوپراکسیداز تولیدشده، ماده رنگی NBT (زرد، شفاف و محلول در آب) را احیا نموده و به فورمازان آبی نامحلول و رسوب در داخل فاگوسیت تبدیل می‌کند. میزان فورمازان تولیدشده با روش فتومتری سنجش شده که میزانی از ارزیابی عملکرد انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها است (۲۴). نتایج حاصل از این آزمون حاکی از

است. کاهش عملکردهای التهاب آور سلول‌های مونوسیت-ماکروفاژ به دنبال تیمار حیوان با عصاره هندوانه ابوجهل که در این تحقیق مشاهده نمودیم، ممکن است که اثرات مهارکننده التهاب ناشی از کارژینان توسط این ماده را توجیه کند. از آنجایی که شدت انفجار تنفسی و قابلیت تولید نیتریک اکسید در سلول‌های فاگوسیتیک به‌طور مشخصی کاهش می‌یابد، بنابراین به نظر نمی‌رسد که هندوانه ابوجهل اثر واقعاً مفیدی در تقویت سیستم ایمنی از جمله دفاع ضد میکروبی و یا کمک با تقویت ایمنی به دنبال واکسیناسیون علیه یک باکتری داخل سلولی (به‌طور مثال عامل بروسلا) داشته باشد. در برخی مطالعات خواص آنتی باکتریایی، خاصیت ضد سرطانی گیاه هندوانه ابوجهل گزارش شده است (۳۵، ۳۶). البته این مطالعات در شرایط *in vitro* انجام شده و به بررسی اثر مستقیم ترکیبات گیاه بر روی عوامل عفونی و یا سلول‌های سرطانی پرداخته است. طبیعی است که موارد یادشده هیچ‌کدام نمی‌تواند حاکی از اثر تقویت‌کننده سیستم ایمنی توسط این گیاه باشد. افزایش قابلیت فاگوسیتوز در کنار کاهش قابلیت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیترژن حاکی از ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های تک‌هسته‌ای فاگوسیت‌کننده است (۳۷، ۳۸). واکنش‌های DTH و تولید نامناسب رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیترژن نقش بسیار مهمی در پیشرفت و گسترش بیماری‌های خود ایمن از قبیل اسکروز متعدد، دیابت خود ایمن و روماتوئید آرتریت بازی می‌کند (۳۹)؛ بنابراین ممکن است که عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل اثرات سودمندی در این بیماری‌ها داشته باشد. به‌هرحال این مطالعه صرفاً یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعات بیشتری بر روی مدل‌های خود ایمن صورت گیرد. در نهایت به نظر می‌رسد که عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب طبیعی باقابلیت تعدیل‌کننده سیستم ایمنی موردتوجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله از زحمات تمامی کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع را اعلام نکرده‌اند.

اختلالات کبدی، ترمیم زخم و تومورهای توپر نشان داده‌شده است (۳۱). در این مطالعه نیز کاهش معنی‌دار انفجار تنفسی در سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در موش‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل احتمالاً ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه هندوانه ابوجهل است.

ایمنی باواسطه سلول‌های T نقش مهمی را در بیماری‌های خود ایمن اختصاصی اندام خاص بازی می‌کند (۳۰-۳۲). ازدیاد حساسیت تأخیری (delayed type hypersensitivity)، یکی از نمونه‌های پاسخ ایمنی باواسطه سلول‌های T است که در ایجاد واکنش‌های التهابی دخالت دارد (۳۳). برای بروز واکنش DTH باید دسته‌ای خاص از سلول‌های T توسط آنتی‌ژن خاصی تحریک شوند (۳۰). اغلب پاسخ DTH به‌واسطه سلول‌های Th1 و ماکروفاژ القا می‌گردد (۳۳، ۳۴). در مطالعه حاضر برخلاف افزایش معنی‌دار تکثیر سلول‌های طحالی در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد، میزان واکنش DTH در گروه تیمار کاهش معنی‌دار یافته بود؛ بنابراین ممکن است که افزایش تکثیر سلول‌های T به دلیل پولاریزه شدن آن‌ها به سمت دیگری فرضاً Th2 بوده است. افزایش تولید آنتی‌بادی که در تحقیق مشاهده‌شده است از این فرضیه حمایت می‌کند. به عبارت بهتر، به نظر می‌رسد که عصاره گیاه باعث شیف‌ت پاسخ‌های ایمنی از سمت ایمنی به سمت ایمنی هومورال است. افزایش وزن طحال هم در راستای افزایش تکثیر لنفوسیتی و احتمالاً به دلیل افزایش سلول‌های مولد آنتی‌بادی بوده است.

سلول‌های رده منوسیت - ماکروفاژ از جمله بازیگران مهم پاسخ‌های DTH می‌باشند (۳۳، ۳۴). نتایج ما حاکی از آن است که باوجودی که قابلیت فاگوسیتوز در سلول‌های تک‌هسته‌ای فاگوسیت‌کننده طحال به دنبال تیمار با عصاره میوه هندوانه ابوجهل افزایش یافته است ولی میزان شدت انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکسید به دنبال برداشت مخمر اپسونیزه کاهش می‌یابد. کاهش التهاب و تورم کف پا به دنبال تزریق کارژینان در موش‌های دریافت‌کننده عصاره آبی گیاه هندوانه ابوجهل توسط مرزوک و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است (۲۱). این محققین در ادامه کار خود (۲۰۱۲) گلایکوزید 11-Deoxocucurbitacin-I-2-O-β-d-glucoside را از دانه این گیاه جدا و آن را مسئول اثرات ضدالتهابی گیاه گزارش کردند (۲۲). تولید واسطه‌های التهابی توسط کارژینان از جمله سازوکارهای التهاب‌زایی این ماده



References

1. Kahn C, Ronald K, George L, Moses Alan C, Weir Gordon C, Jacobson Alan M, et al. Diabetes mellitus. 4th Ed. London: Lippincott. Williams and Wilkins; 2005, 48-69.
2. Lynnc J, Ccreat P. Diabetes for nurses. 3th Ed. London: Whurr Published Ltd; 1999, 3-16.
3. Larsen RP, Kronenberg HM, Melmed S, polonsky Kenneth WS. Textbook of Endocrinology. 10th Ed. Philadelphia. Saunders; 2003; 65-75.
4. Amin Gh. Traditional herbal medicine of Iran. 1th Ed. Iran: Published by ministry of health and medical education of Iran. 1992; 112-117 [in Persian].
5. Roger T. Malseed. Springhouse Nurses Drug Guide. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams wilkins; 2005, 185-196.
6. Fallah hosseini H, Fakhrzadeh H, Larijani B, Sheykhsamani AH. Review on the plants used for Diabetes. J Herbal Plants. 2005; 5(10): 1-8[in Persian].
7. Fallah Hosseini H, Heshmat R, Larijani B, Fakhr Zadeh H, Jafari Azar Z, Darvish Zadeh F, et al. The clinical investigation of Citrullus Colocynthis (L.) Schrad. fruit in treatment of type II diabetic patients: A randomized, double-blind, placebocontrolled study. J Med Plants. 2006; 5(52): 31-5[in Persian].
8. Zargar A. Pharmaceutical plants. 8th ed. Tehran: Publication of Tehran University; 1993, 390-4.
9. Nmila R, Gross R, Rchid H, Roye M, Manteghetti M, Petit P, et al. Insulinotropic effect of Citrullus colocynthis fruit extracts. Planta Med. 2000; 66(5): 418-23.
10. Nikbakht MR, Gheitasi I. Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of Citrullus colocynthis in normoglycemic and streptozocine (STZ) induced diabetic male rats. Armaghane j. 2006; 42(12): 703-10[in Persian].
11. Mahdavi R, Dashti N, Ostadrahimi A, Delazar A, Rezazadeh H. Antidiabetic effect of Citrullus colocynthis fruit aqueous extract on plasma glucose levels in diabetic rabbits. J Pharm Sci. 2005; 18(3): 15-9.
12. Adam SE, Yahya MA, Al Farhan AH. Combined toxicity of Cassia senna and Citrullus colocynthis in rats. Vet Hum Toxicol. 2001; 43(2): 70-2.
13. Al-grawi AA, Adam SE. Effect of combination of capsicum frutescens and citrullus on growth. Haematological and Pathophysiological parameters of rats. Phytother Res. 2003; 17(1): 92-5.
14. Barth A, Muller D, Durriling K. In vitro investigation of a standardized dried extract of Citrullus colocynthis on liver toxicity in adult rats. Exp Toxicol Pathol. 2002; 54(3): 223-30.
15. Diwan FH, Abdel-Hassan IA, Mohammed ST. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. East Mediterr Health J. 2000; 6(2- 3): 345-51
16. Kumar S, Kumar D, Manjusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. Antioxidant and free radical scavenging potential of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. methanolic fruit extract. Acta Pharm. 2008;58(2):215-220.
17. Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, Fenina N, Bouraoui A, Aouni M. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of Citrullus colocynthis from southern Tunisia. J Ethno pharmacol. 2010;128(1):15-19
18. Marzouk Z, Marzouk B, Mahjoub MA, Haloui E, Zine M, Aouni M, et al. Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. from Mednine. J. Food Agric. Environ. 2010; 8(2):161-165.
19. Gebhardt R. Antioxidative, antiproliferative and biochemical effects in Hep G2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination. Arzneimittelforschung. 2003;53(12):823-830.
20. Wang Z, Wang N, Chen J, Shen J. Emerging glycolysis targeting and drug discovery from chinese medicine in cancer therapy. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;12(10):873175.
21. Marzouka B, Marzoukb Z, Halouib Z, Feninab N, Bouraouic, Mahjoub Aounia A. Antiinflammatory and analgesic activities of a new cucurbitacin isolated from Citrullus colocynthis seeds. Med Chem Res. 2013; 22(8): 398-399.
22. Anonymous. The Ayurvedic Formulary of India, Ministry of Health and Family Planning. Govt of India. 1978;51(5) 249-254.
23. Anonymous. Canadian Council on Animal Care Guide. 2nd Ed. 1993
24. Habibian R, Morshedi A, Delirez N. Effect of Humic acid on humoral immune response and phagocytosis. Global veterinaria. 2010;4(2):135-139.
25. Yoshikawa M, Morikawa T, Kobayashi H, Nakamura A, Matsuhira K, Nakamura S, et al. Bioactive saponins and glycosides. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from Citrullus colocynthis. Chem. Pharm. Bull. 2007; 55(3): 428-434.
26. Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. Asian Pac J Cancer Prev 2003;4(4):281-8.
27. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis—new aspects of an old disease. J Appl Microbiol. 2005;98(6):1270-1281.
28. Nagelkerke LAJ, Pannevis MC, Hoalihan DF, Secombes CJ. Oxygen uptake of rainbow trout on corhynchus mykiss phagocytes following stimulation of the respirator burst. Dexp Bio. 1990;1(154):339-53.
29. Qadry JS. Shah and Qadry's pharmacognosy. 12th ed. B. S. Shah Prakashan: Ahmadabad; 2004, p. 260-264.
30. Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA, Tariq Mohammeda S. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of Citrullus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol. 2000;71(1-2): 325-330.
31. Shaik A, Kotta RK, Jonnalagadda VG, Peeriga R. Assessment of anti-inflammatory activity of Artemisia vulgaris leaves by cotton pellet granuloma method in Wistar albino rats. J of Pharm res. 2013;7(12):463-467.
32. Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. J Pharm Pharmacol. 1992;44(5):456-458.

33. Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopolou AN, Papapeorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res*. 2000;17(5):501-507.
34. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31(12):907-916.
35. El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5(2):189-197.
36. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med*. 2011; 6(6):487-495.
37. Moore KW, De Waal M, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol*. 2001;19(7): 683-765.
38. Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. 1987 ;46(1):11826.
39. Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18(7):672-676.
40. Abtahi Froushani SM, Esmaili Gourvarchin Galeh H. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(9):632-637.

Original Article

The Effects of *Citrullus Colocynthis* (L.) Hydroalcoholic Extract on the Function of Lymphocyte Proliferation and Innate Immune System Responses after Challenge with the REV1 Vaccine in Wistar Rats

Abtahi Froushani SM^{1*}, Nafisi S², Esmaili Gourvarchin Galeh H¹, Mansori Motlagh B¹, Sedig Shahryari Nor M³

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia

2. Department of Basic Science, Veterinary of Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

3. Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29 Dec 2015

Accepted: 12 Mar 2016

Abstract

Background & Objectives: The main objective of this study is to determine the possible effects of hydroalcoholic extract of *Citrullus Colocynthis* on the humoral and cellular immune responses in Wistar rats after challenge with REV-1 vaccine.

Materials & Methods: The studied population included 20 male rats that were randomly divided into two equal groups and were immunized with Rev1 vaccine (0.1 ml Rev1+0.9 ml PBS). Treatment group received hydroalcoholic extract of the *C. colocynthis* (50 mg/kg) orally every day from the beginning of the study and it continued for two weeks. Blood sampling was performed five days after the last injection. Moreover, 48 hours before blood sampling, Rev1 vaccine (0.1 ml Rev1+0.9 ml PBS) was injected into the left foot of rats. The levels of anti-Rev1 antibody and the specific cellular immune responses were measured by sero-agglutination test, footpad thickness, and griess colorimetric method, respectively. Lymphocyte proliferation, nitric oxide production, respiratory burst, and phagocytosis in splenocytes were determined by MTT test, Griess test, NBT assay, and slide test, respectively.

Results: The levels of anti-Rev1 antibody, phagocytosis and Lymphocyte proliferation index in splenocytes were increased in treatment group compared to control group. Nevertheless, the levels of the cellular immunity (food pad thickness), NBT, and Nitric oxide in treatment group showed a significant decrease compared to control group ($p<0/05$).

Conclusion: The hydroalcoholic extract of *C. colocynthis* may be used as a natural source for modulating the immune system.

Keywords: *Citrullus Colocynthis*, Humoral immunity, Cellular immunity, Innate immunity

* Corresponding author: Seyyed Meysam Abtahi Abtahi Froushani, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia.
Email: meysamabtahi@hotmail.com