مقاله پژوهشی

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

سید میثم ابطحی فروشانی[1*]، سعید نفیسی[2]، هادی اسمعیلی گورچین قلعه[1]، بهمن منصوری مطلق[1]، محمد صدیق شهریاری نور[3]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

چکیده

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

مواد و روش‌ها: جامعه موردمطالعه شامل ۲۰ سر رت نر بود که به‌طور تصادفی در دو گروه مساوی قرار گرفتند و با واکسن REV1 (۰/۱ ml REV1 + ml ۰/۹PBS) ایمونیزه شدند. گروه تیمار به‌صورت خوراکی روزانه ۵۰mg/kg از عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل را از شروع مطالعه به مدت ۲ هفته دریافت کردند. ۵ روز بعد از آخرین تزریق، خون‌گیری از رت‌ها انجام شد. هم‌چنین ۴۸ ساعت قبل از خون‌گیری واکسن REV1 (۰/۱ ml REV1 + ml ۰/۹PBS) به کف پای چپ رت‌ها تزریق گردید. سطح آنتی‌بادی 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 سلول‌های طحالی به ترتیب با آزمودن‌های MTT، گریس، NBT و آزمودن اسلایدی تعیین گردید.

نتایج: سطح تولید آنتی‌بادی ضد REV1، میزان فاگوسیتوز و تکثیر سلول‌های طحالی در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت. درعین‌حال میزان ایمنی سلولی (DTH)، قابلیت انفجار تنفسی و میزان نیتریک اکسید سلول‌های طحالی نیز به‌طور معنی‌داری در گروه تیمار کاهش‌یافته بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب طبیعی با قابلیت تعدیل‌کننده سیستم ایمنی مورد توجه قرار گیرد.

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

مقدمه

گیاهان دارویی در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری-ها به‌کاربرده شده‌اند. نتایج بررسی‌های علمی روی گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مختلف ازجمله بیماری‌های عفونی (۱، ۲)، سرطان (۳)، دیابت (۴، ۵)، گوارشی (۶، ۷)، سوختگی (۸) و عصبی (۹) بسیار امیدوارکننده 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 آنتی‌اکسیدانی (۱۲) سمیت داروهای دیگر را کم کنند (۱۳، ۱۴). امروزه ترکیبات شناسایی‌شده در آن‌ها به‌عنوان داروهای جدید مورداستفاده قرار می‌گیرند و می‌توانند به‌عنوان کلیدی برای شناسایی روش‌های درمانی کم‌هزینه و دارای عوارض جانبی کمتر در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار روند (۱۵). گیاه دارویی هندوانه ابوجهل بانام علمی *Citrullus colocynthis L.* از خانواده Cucurbitaceae، از راسته کدو Cucurbitales بوده که ازجمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌کاربرده شده است و تحقیقات آزمایشگاهی متعددی خواص درمانی آن را اثبات کرده‌اند (۱۶). عصاره میوه این گیاه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تری ترپنوئیدها و گلیکوزیدها است (۱۷). از میوه هندوانه ابوجهل به‌عنوان ضد قند

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

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 به‌عنوان مسهل قوی استفاده می‌شود (۲۰-۱۸). همچنین در مطالعات معدودی به بررسی اثرات ضدالتهابی این گیاه در مدل التهاب ایجادشده با کارژینان (carrageenan) اشاره‌شده است (۲۱). مشخص است که واکنش‌های التهابی با عملکردهای سیستم ایمنی درهم‌تنیده شده است (۲۲). بااین‌حال تاکنون مطالعات جامعی در مورد اثرات این عصاره بر دستگاه ایمنی بدن صورت نگرفته است. REV1 واکسن زنده تخفیف حدت یافته علیه بیماری بروسلا ملیتنسیس است که به‌صورت لیوفیلیزه عرضه می‌گردد. در این مطالعه ما برای تحریک سیستم ایمنی رت به‌عنوان 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 ملیتنسیس*) در مدل رت است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مداخله‌ای-تجربی است. جامعه موردمطالعه در این بررسی شامل ۲۰ سر رت نر در محدوده سنی ۸-۶ ماه است که از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه‌شده 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 به‌طور تصادفی در دو گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

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

گروه شاهد: رت‌های این گروه مشابه با گروه قبلی تحت چالش با واکسن REV1 (سویه زنده واکسن *بروسلا ملیتنسیس* به‌عنوان یک پادگن مناسب جهت تحریک سیستم ایمنی) قرار گرفتند. از روز شروع ایمونیزاسیون به این موش‌ها نیز ۵۰mg/kg آب مقطر گاواژ 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 خشک‌کردن 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 به‌وسیله دستگاه فریزدرایر (Vac05 ZirBus, Germany) در دمای ۵۰°c - سانتی‌گراد و تحت شرایط خلأ تغلیظ گردید (۲۴).

تعیین دوز قابل‌تحمل

پس از تیمار رت‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل (۱۰۰ mg/kg، ۷۵، ۵۰، ۲۵) مشخص گردید غلظت ۵۰ mg/kg به‌عنوان حداکثر دوز با بالاترین زنده‌مانی است.

ارزیابی ایمنی هومورال

پس از خون‌گیری سرم حیوانات جدا شد و تیتر 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 REV1 +۰/۹ ml PBS) تزریق شد. هم‌زمان ۱ میلی‌لیتر PBS به‌پای 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

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

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

پس از طی مراحلی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسونی حاوی ۱×۱۰^{۶} تهیه و µl ۱۰۰ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور µl ۵۰ از محلول فیتوهماگلوتینین mg/ml ۱ و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوتینین 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 µl ۲۵ محلول mg/ml ۵ MTT در PBS افزوده‌شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT (۳-(۵،۴-دی متیل تیازول ۲-ایل)-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 طول‌موج ۴۹۲nm تعیین و نمایه تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۲۶):

(OD در حضور فیتوهماگلوتینین - OD بلانک)/(OD فیتوهماگلوتینین حضور در عدم -OD بلانک) = نمایه تحریک

اندازه‌گیری نیتریک اکسید

میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی و استفاده از منحنی استاندارد (Griess) نیتریت سدیم تعیین گردید .به‌طور خلاصه، سلول‌های طحالی پس از مجاور سازی با فیتوهماگلوتینین 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 ۱-۱ 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 طول‌موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا نگار قرائت گردید. همزمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم‌شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

سنجش قابلیت انفجار تنفسی در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحال

سوسپانسیون سلولی به تعداد ۲×۱۰^{۶} 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 -آمریکا) 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 سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الایزا نگار در طول‌موج 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 هماتوکسیلین-ائوزین، رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی x ۴۰ بررسی شدند. تعداد ۵ شان به ازای هر لام موردمطالعه قرار گرفت. هر شان حدوداً حاوی ۱۰۰-۷۰ 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 $p<۰/۰۵$ 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

ایمنی سلولی اکتسابی به دنبال چالش با REV-1 بر مبنای واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) سنجیده شد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده‌شده است، رت‌های تحت تیمار با عصاره هیدرو الکلی میوه هندوانه ابوجهل به‌طور معنی‌داری یک کاهش ۲/۷ برابری را در واکنش DTH نشان دادند. در مقابل تیتر 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 به‌دست‌آمده 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 کاهش قابلیت انفجار تنفسی مونوسیت/ماکروفاژهای طحالی در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد است (جدول ۲). درنهایت نتایج به‌دست‌آمده حاکی از میزان تولید نیتریک اکسید در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است (جدول ۲).

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

گروه‌ها	تیتر آنتی‌بادی علیه REV1	درصد تورم کف پا	MTT(جذب نوری)
کنترل	۳۲۰/۶۵±۸/۲۲	۳۵/۴۹±۲/۳۳	۰/۵۴۲±۰/۱۲
تیمار	۱۰۲۶/۰۸±۴/۱۱	۱۳/۱۴±۳/۲۳	۱/۶۰۴±۰/۱۴
P value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۰۱

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	NBT(جذب نوری)
کنترل	۵۹/۳۶±۱/۰۱	۴۶±۱۰/۳۳	۱/۰۵۴±۰/۰۳
تیمار	۴۱/۱۱±۳/۳۰	۷۴±۸/۳۳	۰/۷۲۳±۰/۰۳
P value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی موجود زنده به دنبال چالش-های 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، تری‌ترپن‌ها (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 گزارش‌شده است (۳۰). هم‌چنین کاربرد مؤثر این ترکیبات در بهبود آلرژی،

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 ازجمله بازیگران مهم پاسخ‌های DTH می‌باشند (۳۳، ۳۴). نتایج ما حاکی از آن است که باوجودی که قابلیت فاگوسیتوز در سلول‌های تک‌هسته‌ای فاگوسیت کننده طحال به دنبال تیمار با عصاره میوه هندوانه ابوجهل افزایش‌یافته 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) گزارش‌شده 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 ازجمله سازوکارهای التهاب‌زایی این ماده 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. ازآنجایی‌که 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 ازجمله 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 گزارش‌شده است (۳۵، ۳۶). البته این مطالعات در شرایط in vitro انجام‌شده 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 نیتروژن حاکی از ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های تک‌هسته‌ای فاگوسیت کننده است (۳۷، ۳۸). واکنش‌های DTH و تولید نامناسب رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن نقش بسیار مهمی در پیشرفت و گسترش بیماری‌های خود ایمن از قبیل اسکلروز 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 منافعی را اعلام نکرده اند.

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, Crreat 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 Persion].
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, Durrling K. In vitro investigation of a standardized dried extract of Citrullus colocynthison 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, Delirezh 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. Oxigen 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 carrageenaninduced 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 S[2], Esmaili Gourvarchin Galeh H[1], Mansori Motlagh B[1], Sedig Shahryari Nor M[3]

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