Anticancer and immunomodulatory activities of Jordanian *Citrullus colocynthis*

Study by

Ahmed Alrawi

Supervised by

Dr.Wamidh Talib

Co-supervised by

Dr. Reem Isaa

This Thesis was Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree in Pharmaceutical Sciences

Deanship of Scientific Research & Graduate Studies

Applied Science University

Amman- Jordan

2017/2018

الفعاليات المضادة للسرطان والمحفزة لجهاز المناعة لنبات الحنظل الاردني *(Citrullus colocynthis)*

دراسة

احمد اياد علي الراوي

المشرف

د. وميض هادي طالب

المشرف المشارك

د. ريم عيسى

قدمت هذه الرسالة استكمالا لمتطلبات الحصول على درجة الماجستير في العلوم الصيدلانية- كلية الصيدلة

عمادة البحث العلمي والدراسات العليا

جامعة العلوم التطبيقية الخاصة

الاردن-عمان

2017/2018

Abstract

Background: *Citrullus colocynthis* is a highly popular plant in Jordan and is widely consumed to prevent and treat different ailments. Although many studies were conducted to evaluate the biological activities of the Jordanian species, there are no enough studies performed to evaluate the anticancer and/or the immunomodulatory activities of *Citrullus colocynthis*.

Aims: This study was conducted to evaluate the immunomodulatory and anticancer properties of seeds and fruit of *Citrullus colocynthis* using different extraction solvents.

Methods: The plant extraction was prepared using two methods: soaking and soxhlet by using solvents with different polarities. The antiproliferative activities for each *Citrullus colocynthis* extract was tested against different breast cancer cell lines using MTT assay. The degree of apoptosis induction by the most potent antiproliferative extracts was detected using caspase 3 activity kit. In addition, ELISA test was used to measure the vascular endothelial growth factor expression in tumor cells, and also to measure levels of IFN- γ, IL-4, IL-2 and IL-10 secreted by splenocytes after treatment with the extracts. The effect of the extracts on splenocytes proliferation was also measured using the MTT assay. Macrophage function was evaluated using nitro blue tetrazolium assay, and pinocytosis function was also evaluated using neutral red method.

Results: The growth of breast cancer cell lines (T47D and MCF-7) was inhibited using *Citrullus colocynthis* different extracts in a dose dependent manner. Seeds-aqueous/methanol and fruit-dichloromethane extracts were the most potent against both cell lines with IC_{50} values of 3.12 mg/ml and 1.56 mg/ml respectively for T47D and 25 mg/ml and 6.25 mg/ml respectively for MCF-7. They showed to target cancer cells through the induction of apoptosis and the suppression of breast cancer angiogenesis. An increase in TH1 cytokines (IFN- γ, IL-2) level and a decrease in TH2 cytokine (IL-4) level were measured after lymphocytes stimulation using seeds-aqueous/ methanol and fruit-aqueous/methanol extracts. Seeds-aqueous/methanol extract was the most potent extract to stimulate lymphocytes proliferation followed by fruit-dichloromethane extract and then fruit-aqueous/methanol extract. Fruit-dichloromethane extract was also the most active extract to stimulate phagocytosis, followed by fruit-aqueous extract and then the seeds-aqueous/ methanol extract. Seeds-aqueous extract was also the most active extract type to stimulate pinocytosis followed by fruit-dichloromethane extract and then seeds-aqueous/methanol extract.

Conclusion: The use of *Citrullus colocynthis* fruit and seeds extracts provide a potential variable health benefits. Seeds-aqueous/methanol extract and fruit-dichloromethane extract exhibit an

anticancer activities and a potent stimulator effect on innate and acquired immunity. Further chemical testing are required to identify the biologically active compounds in varied *Citrullus colocynthis* extracts types.

الملخص

الخلفية: يحظى الحنظل بشعبية كبيرة في الأردن ويستهلك لمنع وعلاج أمراض مختلفة. وعلى الرغم من إجراء العديد من الدراسات لتقييم الأنشطة البيولوجية للنباتات الأردنية، إلا أن الدراسات غير كافية لتقييم الأنشطة المضادة للسرطان والأنشطة المناعية للحنظل.

الاهداف: أجريت هذه الدراسة على الخصائص المناعية والمضادة للسرطان لكل من بذور وفاكهة الحنظل بأستخدام مستخلصات مختلفة.

المنهجية: تم استخلاص نبات الحنظل بأستخدام طريقتين (soaking) و (soxhlet) بأستخدام مذيبات مختلفة . تم اختبار أنشطة مكافحة التكاثر (Antiproliferative) للحنظل ضد مختلف خطوط خلايا سرطان الثدي باستخدام فحص(MTT) .كما وتم اختبار قدرة الحنظل على تحفيز موت الخلايا المبرمج بأستخدام (Caspase 3 cascade kit). و تم استخدام (ELISA) لقياس الكشف عن تعبيرعامل نمو الأوعية الدموية (VEGF) وقياس مستوى الانترفيرون غاما (IFN-γ) والانترلوكينات (IL-) 2,4,10المفرزة من الخلايا الليمفاوية وتم قياس قدرة المستخلصات المختلفة من الحنظل على تحفيز خلايا الطحال الليمفاوية بأستخدام (MTT) اما قدرة المستخلصات المختلفة على تحفيز خلايا البلعمة فقد تم قياسها من خلال فحص (Nitro blue tetrazolium assay) و قدرة المستخلصات المختلفة على تحفيز الشرب الخلوي(Pinocytosis) فقد تم تقييمها من خلال فحص(Neutal red method)

النتائج: مستخلص الميثانول المائي للبذور ومستخلص ثنائي كلورو ميثان للفاكهة كانوا الاكثر كفاءة في تثبيط خلايا سرطان الثدي (T47D/MCF-7) وكان التركيز الذي تعيش عليه نصف الخلايا 3.12 ملغم/مل و 1.56 ملغم/مل على التوالي لخلايا T47D و 25 ملغم/مل و 6.25 ملغم/مل على التوالي لخلايا MCF-7 . وساهموا في تحفيز موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) وتثبيط عامل نمو الاوعية الدموية الغشائي (VEGF) في خلايا (T47D), مستخلص الميثانول المائي للبذور و الفاكهة ساهم في تحفيز الخلايا اللمفاوية وزيادة مستوى الانترفيرون غاما (IFN-γ) والانترلوكين (IL-2) وحفزت استجابة الجهاز المناعي بأتجاه (TH1) وتوفير حماية مناعية ضد الخلايا السرطانية, مستخلص الميثانول المائي للبذور كان الاكثر كفاءة في تحفيز الخلايا اللمفاوية (Splenocytes) و بعده مستخلص ثنائي كلورو ميثان للفاكهة و مستخلص المثانول المائي للفاكهة . مستخلص ثنائي

كلورو ميثان للفاكهة كان الاكثر كفاءة في تحفيز البلعمة لخلايا البلاعم(Phagocytosis) و بعده مستخلص المائي للفاكهة و مستخلص الميثانول المائي للبذور. المستخلص المائي للبذور كان الاكثر كفاءة في تحفيز الشرب الخلوي(Pinocytosis) وبعده مستخلص ثنائي كلورو ميثان للفاكهة و مستخلص الميثانول المائي للبذور.

الخاتمة: ختاما ومن خلال البيانات المتوفرة لدينا فان استخدام بذور وفاكهة الحنظل يوفران فوائد صحية كثيرة -مستخلص الميثانول المائي للبذور و مستخلص ثنائي كلورو ميثان للفاكهة يوفران حماية من سرطان الثدي ومحفزات قوية للمناعة الفطرية والمكتسبة. يجب عمل فحوصات اضافية لتحديد انواع المركبات الفعالة في هذا النبات.