

PAPER DETAILS

TITLE: The investigation of the effects of *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz extract on spleen: a histochemical study

AUTHORS: Nazan KESKIN,Ramazan MAMMADOV,Pinar ILI

PAGES: 68-74

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/422475>

***Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz ekstraktının dalak üzerindeki etkilerinin araştırılması: histokimyasal çalışma**

The investigation of the effects of Crataegus aronia var. dentata Browicz extract on spleen: a histochemical study

Nazan Keskin*, Ramazan Mammadov**, Pınar İli**

* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Denizli

** Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli

Özet

Amaç: Dalak, bir immün ve hematopoietik sistem organıdır ve yoğun hücrel etkileşimleri içerir. Hücrel ilişkilerde (hücre-hücre ve hücre-matriks) hücre yüzeyi ve hücre dışı alan karbohidratlarının önemi vardır. Dalak, toksik ajanlardan etkilenen bir organdır. Başlıca flavonoid bileşikler içeren *Crataegus* (alıç) türlerinin, antioksidan, kalp koruyucu, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkileri vardır. Bu çalışmada, *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz ekstraktının dalak üzerine etkileri ışık mikroskobu ile araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Bitkinin %1'lik ekstraktı 6 hafta süresince sıçanlara oral olarak verilmiştir. Süre sonunda, dokular fikse edilmiş ve doku takibi yapılarak parafine gömülmüştür. 5 µm'lik kesitler, histomorfoloji için Hematoksilen-Eosin ve Periyodik asit-şift, hemosiderin için Perl's'in Prusya mavisini boyalarıyla boyanmıştır. Lektin histokimya için, frozen kesitlere 3 digoksinin işaretli lektin; galaktoz (1→3) N-asetilgalaktosamin'e [Galβ(1→3)GalNAc] spesifik olan peanut agglutinin (PNA), galaktoza α(2→3) bağlı sialik asitleri tanıyan *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL), uç mannoz gruplarını tanıyan *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) uygulanmıştır.

Bulgular: Genel olarak, dalak histomorfolojisi ve makrofajlardaki hemosiderin birikimi, kontrol ve deney gruplarında benzerlik göstermiştir. Lektinler, her iki grupta bazı hücrelerin sitoplazmasında ve hücre yüzeylerinde pozitif reaksiyon göstermiştir. Hücre yüzeylerinde biraz daha yoğun GNA-pozitif reaksiyon gözlenmiştir.

Sonuç: %1'lik bitki ekstraktı dalakta, bazı karbohidrat moleküllerinde ve hemosiderinde değişikliğe yol açmamıştır.

Pam Tıp Derg 2012;5(2):68-74

Anahtar sözcükler: *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz, dalak, histokimya

Abstract

Aim: Spleen is an organ of immune and hematopoietic system and involves extensive cellular interactions. Cell surface and extracellular matrix carbohydrates are important in cellular interactions (cell-cell and cell-matrix). Spleen is affected by the exposure to toxic agents. *Crataegus* (Hawthorn) species, which contains mainly flavonoid compounds, have such effects as antioxidant, cardioprotective, antiinflammatory and anticarcinogenic. In this study, the effects of *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz extracts on spleen were investigated via light microscopy.

Materials and methods: The plant extract at concentration of 1% was given orally to rats for 6 weeks. At the end of the experimental period, tissues were fixed, processed and embedded in paraffin. 5 µm sections were stained with Hematoxylin and Eosin, Periodic acid-Schiff stain for histomorphology and Perl's Prussian blue stain for hemosiderin. For lectin histochemistry, frozen sections were treated with three digoxigenin labelled lectins; peanut agglutinin (PNA) specific for galactose (1→3) N-acetylgalactosamine [Galβ(1→3)GalNAc]; *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL) specific for sialic acidα(2→3)Galactose; *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) specific for terminal mannose residues.

Results: In general, the histomorphology of the spleens and the accumulation of hemosiderin in macrophages were similar for both control and experimental groups. Lectins showed positive reactions in some cell cytoplasms and on the cell surfaces of both groups. A little more intensive GNA-positive reactions were observed on the cell surfaces.

Conclusions: The plant extract at concentration of 1% did not lead to any alterations in some carbohydrate molecules and hemosiderin in the spleen.

Pam Med J 2012;5(2):68-74

Key words: *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz, spleen, histochemistry

Nazan Keskin

Yazışma Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Denizli

e-mail: nkeskin@pau.edu.tr

Gönderilme tarihi: 13.04.2012

Kabul tarihi: 08.05.2012

Giriş

Dalak, lökositlerin farklılaşması ve eritrositlerin yıkımında rol alan immün sistemin bir organıdır. Dalak pulpası retiküler bağ dokudan oluşur ve genel olarak kan damarlarından zengin olduğu için kırmızı görünür, bu kısma kırmızı pulpa denir. Sinüsler ve kordları içeren kırmızı pulpa, eritrositlerin depolandığı ve yaşam sürelerinin düzenlendiği yerdir. Eritrositlerin yanı sıra trombosit, granulosit ve plazma hücreleri ile makrofajları da içerir. Bu yapı içindeki beyaz görünümülü lenfosit grupları, beyaz pulpa olarak adlandırılır. İmmün sistemde önemli olan bu bölgenin kırmızı pulpa ile sınırlandığı yerlerinden immünglobulinler dolaşıma katılır. Beyaz pulpadaki arterlerin çevresindeki bölgede T-lenfositler yer alır. Bu bölgedeki lenfosit kümelerinde ise B-lenfositler bulunur. Dolayısıyla dalak, hücre trafiğinin yoğun olduğu bir organdır. Bu hücrelerin işlevlerinde, hücresele bağlantıların ve ilişkilerin önemi vardır. Hücresele bağlantılarda rol alan moleküllerin yapı ve organizasyonunun hücrelerarası ilişkilerde rolü olabilir. Bu yapılarda yer alan karbohidrat molekülleri, hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinde tanıma ve tutunma, hücre göçü, farklılaşma gibi birçok olayda iş görür. Ayrıca bu moleküller, tanıma olaylarında maskeleyici rolü de oynarlar. Tanımadan sorumlu şeker reseptörlerinin bir başka şekerle kapatılmasıyla tanıma ilişkilerinin engellenmesi sağlanır [1]. Başlıca hücre zarlarında yer alan, kompleks karbohidratlara bağlı asidik monosakkaritler olan sialik asitler, makromolekülleri ve hücreleri enzimatik ve immünolojik saldırılardan korumanın yanı sıra tanıma bölgeleri olarak da iş görürler [2]. Karbohidrat moleküllerinin diğer moleküllerle bağlanarak oluşturdukları yapılar olan glikokonjugatlar (Glikoproteinler, Glikolipitler, Proteoglikanlar), hücre yüzeylerinde, sitoplazmada ve nükleusta yer alırlar. Son yıllarda bu moleküllerin çeşitli olaylardaki rolleri giderek daha çok araştırılmaktadır.

Antioksidan özelliğe sahip flavonoid bileşikler açısından oldukça zengin olan *Crataegus* türlerinin, kalp koruyucu [3-5], antiinflamatuar ve antikarsinojenik [6-8] etkileri bilinmektedir. Bu çalışmada, *Crataegus aronia* var. *dentata* Browicz ekstraktının olası etkileri dalakta, histomorfoloji için histokimyasal yöntemlerle, karbohidrat molekülleri için lektin histokimyası ile ışık mikroskobu düzeyinde araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem

Ekstraksiyon: Denizli'nin Güzelpınar köyünün orman kenarlarından toplanan *C. aronia* var. *dentata* Browicz bitkisi çiçekleri, gölgede kurutulduktan sonra toz haline getirilmiş ve %70 alkole alınarak %10'luk konsantrasyonu elde edilmiştir. Ekstrakt hava ve ışıktan korunarak, 6 saat 55°C'lik su banyosunda bırakılmıştır. Filtre edildikten sonra, %70 etil alkolde çözündürülerek tekrar 6 saat 55°C'lik su banyosunda bırakılmıştır. Bu işlem ard arda 2 kez tekrar edilmiştir. Bir kez daha filtre edilen ekstraktın alkolü rotary evaporator ile uzaklaştırılmıştır. Kalan kısım saf suda çözündürüldükten sonra liyofilize edilmiş ve %1'lik konsantrasyonda ekstrakt hazırlanmıştır.

Hayvanlar: Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik kurulundan onay alınan çalışmada, ekstrakt 150-200 g ağırlığında albino erkek sıçanlara 6 hafta süresince oral olarak verilmiştir. 5'er sıçandan oluşan 2 grup aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

Grup I: Normal diyet ve su verilen kontrol grubu
Grup II: %1'lik ekstrakt verilen deney grubu

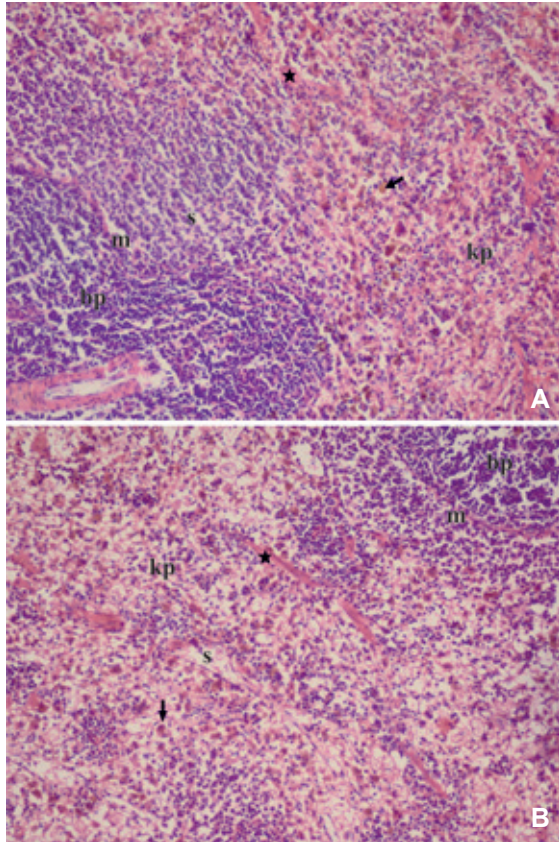
Histokimyasal Uygulamalar: Deney sonunda, anestezi altında hayvanlardan alınan dalak dokularının bir kısmı, Sainte-Marie fiksatifinde fiksasyon işleminden sonra doku takibi yapılarak parafine gömülmüştür. 5 µm'lik kesitlerinden hazırlanan kesitlerine, Hematoksilen-Eosin (H-E), Periyodik asit-şifit (PAS) ve Perls'in Prusya mavisi (PM) boyama yöntemleri uygulanmıştır. Lektinler, glikokonjugatların uç karbohidratlarına bağlanan proteinlerdir. Dokular ayrıca lektin histokimya uygulaması için frozen gömme materyaline (OCT) gömüldükten sonra sıvı nitrojende dondurulmuş ve -86°C'de saklanmıştır. Kriyostat ile alınan 6 µm'lik kesitlere, 3 farklı digoksijenin (DIG) işaretle lektin; galaktoz (1→3) N-asetilgalaktozamin'e [Galβ(1→3)GalNAc] spesifik olan peanut agglutinin (PNA), galaktoza α(2→3) bağlı sialik asitleri tanıyan *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL), uç mannoz gruplarını tanıyan *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) [DIG Glycan Differentiation Kit (Cat: 11210238001, Roche Applied Science)] uygulanmıştır.

Kesitler önce, Tris-buffer saline (TBS) ile yıkandıktan sonra, blokama tamponu [%10 blocking reagent (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche) ve %90 TBS-pH 7,5] ile oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve bir kez TBS ve iki kez buffer 1 [TBS, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂, pH 7,5] ile yıkanmıştır. Daha sonra, buffer 1 ile

seyreltilmiş lektinlerle [GNA (20 µg/ml), PNA (10 µg/ml), MAL (10 µg/ml)] nemli ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İki kez TBS ile yıkanan kesitler, TBS ile hazırlanan 2 µl/ml anti-digoksijenin alkale fosfataz (Roche Applied Science) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İki kez TBS yıkamasının ardından buffer 2 (0.1M Tris-HCl, 0.05M MgCl₂, 0.1M NaCl, pH 9.5) ile hazırlanan 20 µl/ml nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) (Roche Applied Science) ile renklenme oluşuncaya kadar boyanmıştır. Renklenme reaksiyonu distile su ile durdurulan kesitler, gliserin ile kapatılmıştır. Negatif kontroller TBS ile inkübe edilmiştir. Tüm preparatlar, Olympus BX50 mikroskobu ve Olympus DP2-BSW mikroskop dijital kamera sistemi ile incelenerek fotoğraflanmıştır.

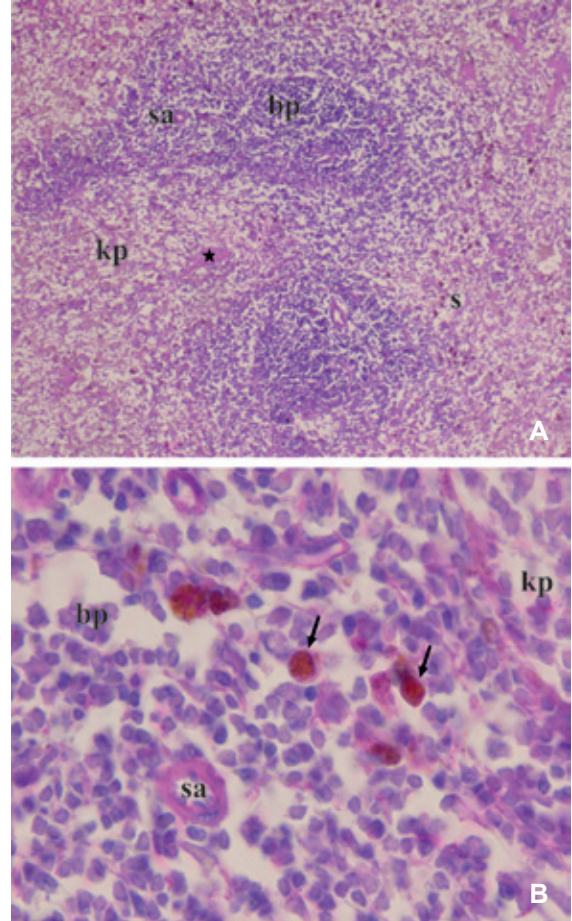
Bulgular

Histokimya bulguları: H-E boyama ile, kontrol ve deney gruplarında, beyaz ve kırmızı pulpanın marjinal zonla birbirinden ayrıldıkları görülmektedir. Kırmızı pulpada, hücreler arasında sinüsler ve trabeküller yer almaktadır (Resim 1).

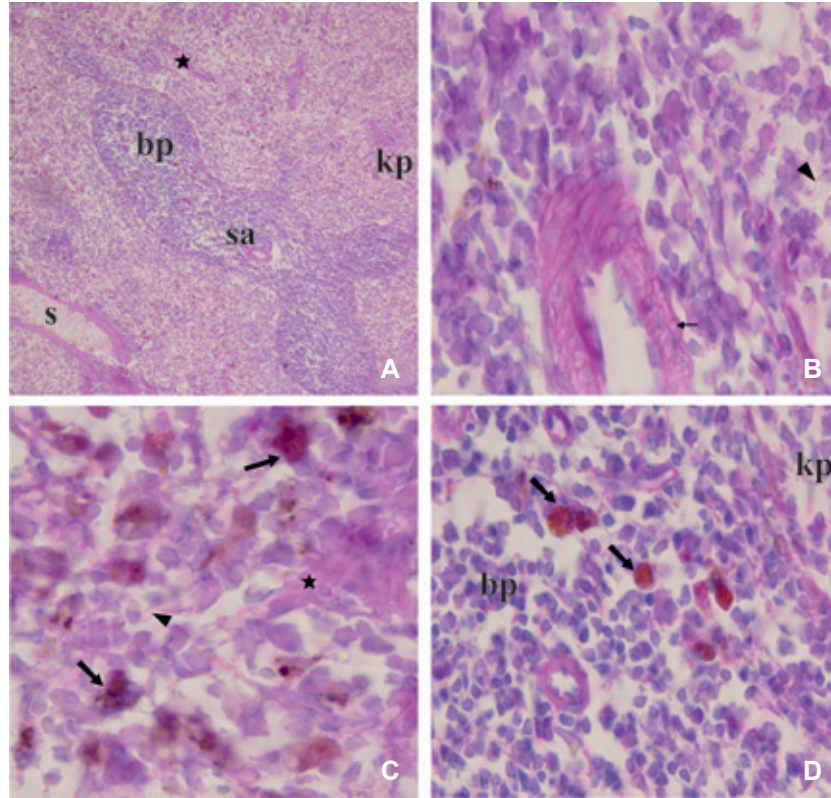


Resim 1. Kontrol (A) ve deney (B) grupları dalak histolojisi. bp: beyaz pulpa, kp: kırmızı pulpa, s: sinus, m: marjinal bölge, trabekül (yıldız), makrofaj (ok), H-E boyama, x200

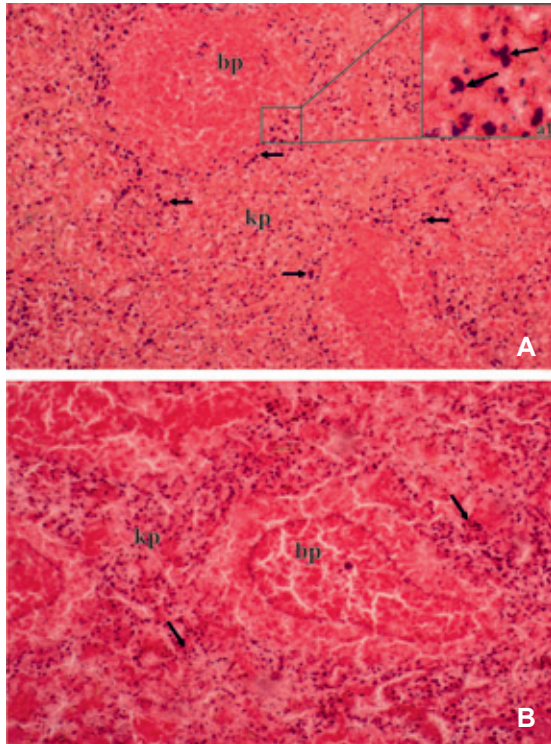
PAS boyama ile, kontrol ve deney gruplarında beyaz ve kırmızı pulpa yapılarında açık kahverengi iri makrofajlar ayırt edilmektedir. Trabeküler arter hücre zarlarının PAS-pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür. Hücreler arasında ince fibril yapılar da belirlenmiştir (Resim 2, 3). Prusya mavisi boyama ile, her iki grupta da kırmızı pulpada ve beyaz pulpanın germinal merkezi çevresinde hemosiderin partikülleri görülmüştür (Resim 4).



Resim 2. Kontrol grubu dalak histolojisi. bp: beyaz pulpa, kp: kırmızı pulpa, sa: sentral arter, s: sinus, trabekül (yıldız), makrofaj (kalın ok), PAS boyama, A: x100, B: x1000



Resim 3. Deney grubu dalak histolojisi. bp: beyaz pulpa, kp: kırmızı pulpa, sa: sentral arter, s: sinus, arterde PAS+ hücre zarı (*ince ok*), trabekül (*yıldız*), fibril (*ok başı*), kırmızı pulpada (**C**) ve beyaz pulpada (**D**) makrofajlar (*kalın ok*), PAS boyama, A: x100, B,C, D: x1000



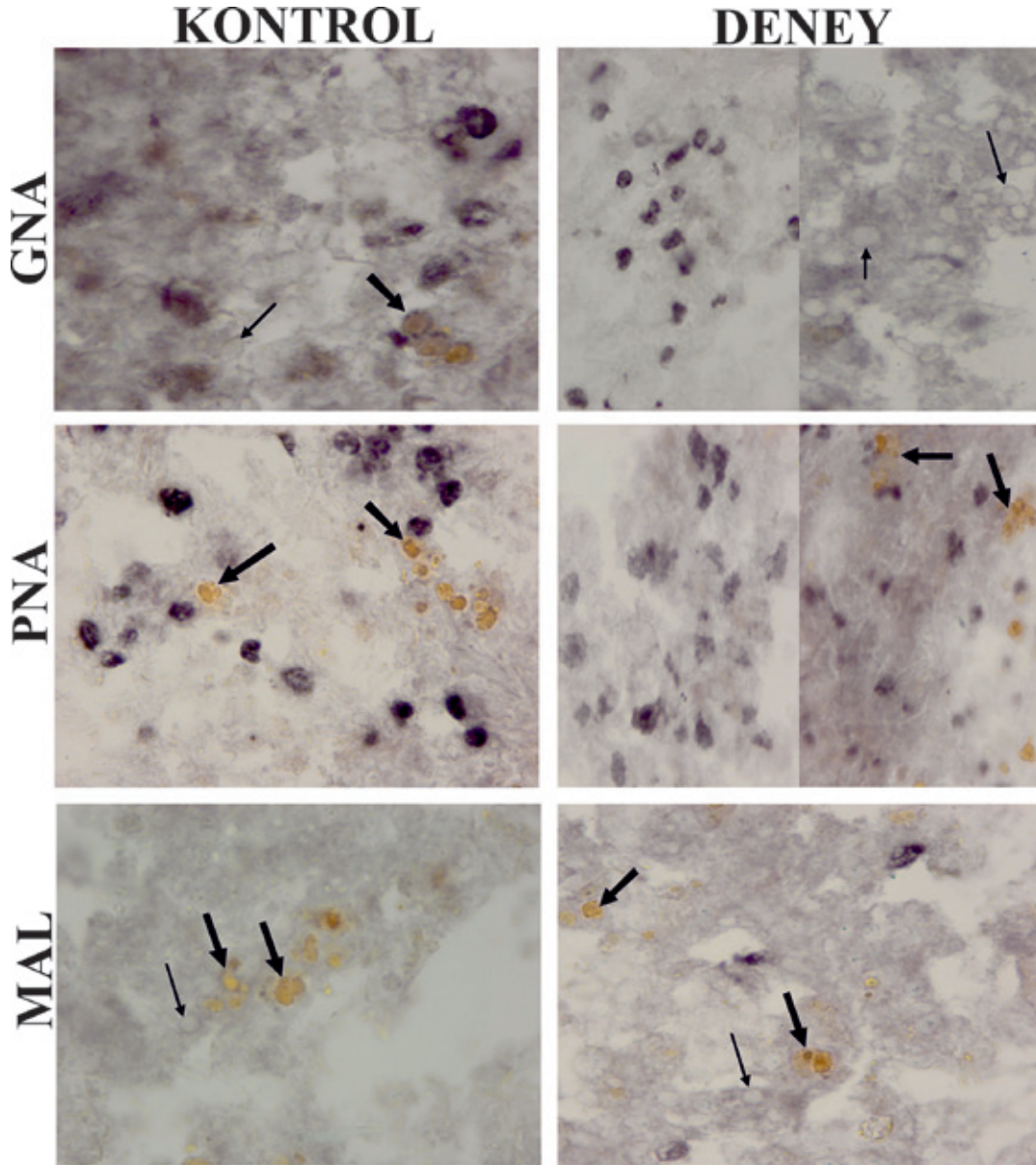
Resim 4. Kontrol grubunda (**A**) ve deney grubunda (**B**) hemosiderin partikülleri (*ok*). bp: beyaz pulpa, kp: kırmızı pulpa, PB boyama, A, B: x100, a1: x1000

Sonuç olarak, uygulanan histokimyasal yöntemlerin bulgularının, genel olarak her iki grupta da benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Lektin Histokimya Bulguları: GNA-pozitif reaksiyon her iki grupta da hücre yüzeylerinde biraz daha yoğun olarak görülmüştür. Lektinlerle pozitif reaksiyon gösteren hücreler koyu olarak ayırt edilmiştir. Bu hücreler arasındaki açık parlak sarı olarak görülen hücrelerin makrofajlar olabileceği söylenebilir. Genel olarak, her iki grupta da lektin histokimya bulguları benzerlik göstermiştir (Resim 5).

Tartışma

Son zamanlarda, bitkilerin fitomedikal özellikleri ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Çeşitli bitki fitokimyasallarının immünoloji [9, 10] ve dalak hücrelerinin gelişimi [11] üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Bununla birlikte, bitki ekstraktlarının çeşitli dokulardaki histolojik etkileri [12,13] üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır. Dalakta, çili biberinin ağırlık ile lökositlerde artışa neden olduğu, dolayısıyla fazla tüketiminin dalakta hasarlara yol açabileceği bildirilmiştir [14]. Bitki polifenolik fitokimyasalları olan flavonoidlerin, antioksidan



Resim 5. Kontrol ve deney gruplarında GNA, PNA ve MAL lektin histokimyası. Koyu hücreler lektin-pozitif hücrelerdir. Makrofaj (*kalin ok*), hücre zarı reaksiyonu (*ince ok*). x1000

[15-17] etkileri vardır. Bu çalışmada, flavonoid bakımından zengin olan *C. aronia* var. *dentata* Browicz'in % 1'lik konsantrasyondaki ekstraktının dalak histomorfolojisi üzerindeki etkileri, histokimyasal yöntemlerle ve bazı karbohidrat yapıları üzerine etkileri lektin histokimyası yöntemiyle araştırılmıştır.

Talasemi gibi bazı kronik anemilerde, hemosiderin ve ferritin olarak biriken fazla miktardaki demirin dokularda toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Flavonollerin metal şelatörleri oldukları bildirilmiştir [18]. Flavonoid içeren ve demir şelasyonu aktivitesi gösteren

bitki ekstraktlarının [19], talasemi hastaları için iyi bir demir şelasyon kaynağı olabileceği ortaya konmuştur [20]. Çalışmamızda, deney grubu dalak kesitlerinde görülen hemosiderin partikül yoğunluğu, kontrol grubunda görülen yoğunlukla benzerlik göstermiştir. Bu bulgu, bitki içeriğinin uygulanan konsantrasyonda demir birikimini önleyici bir etkisinin olmadığını gösterir niteliktedir. Ancak, bu bulgunun genelleştirilebilmesi için, *C. aronia* var. *dentata* Browicz'in farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarıyla çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Nötral şekerleri gösteren PAS boyama ile dalağın yoğun hücre popülasyonu arasında hücrel artıkları içeren iri fagositik hücreler, hemosiderin yüklü makrofajlar olarak ayırt edilmiştir. Hücre grupları arasında, PAS pozitif retiküler fibriller de yer almaktadır. Flavonoid olan quercetin içeren *Citrullus colocynthis* [21] ekstraktının, doza bağlı olarak (400 mg/kg) karaciğer fibrozisini indüklediği bildirilmiştir [22]. Çalışmamızda, PAS boyama ile deney ve kontrol gruplarında genel görünümde farklılık izlenememiştir. Bulgu, % 1'lik konsantrasyondaki bitki ekstraktının fibriller düzeyinde de bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu konuda da bitkinin farklı konsantrasyonlarıyla çalışmalar yapmak uygun olacaktır.

Hücre zarlarında ve hücre dışı alanda yer alan karbohidratlar, hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinde rol alan moleküllerdir. Bu nedenle bu moleküllerin dalaktaki hücrel ilişkilerde önemi vardır. Lektinler, hücre yüzeylerinde, sitoplazmik ve nukleer yapılarda ve hücre dışı alan bileşenlerinde bulunan spesifik karbohidrat uzantılarına bağlanırlar. Lektin-karbohidrat bağlantılarının belirlendiği çalışmalar birçok biyolojik olay ve patolojilerde önemlidir. Doku kesitlerinde lektin histokimyası, hücrelerin dağılımını göstermesi bakımından diğer histokimyasal yöntemlere göre daha seçici olabilir. Dalak ve timusta lektin histokimya çalışmaları bulunmaktadır [23-26]. Dalakta, mannoz spesifik lektin, *Chelidonium majus* agglutinin (CMA) ile makrofajların yanı sıra, özellikle retiküler hücrelerin boyandığı ve CMA'nın stromal yapının çalışılmasında iyi bir araç olduğu belirtilmiştir [24]. Çalışmamızda, mannoz'a spesifik lektin GNA'nın yanı sıra, galaktoza $\alpha(2\rightarrow3)$ bağlı sialik asitlere spesifik MAL ve Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc disakkaritine spesifik PNA lektinleri uygulanmıştır. Dalağın lenf nodlarında sinusları çevreleyen hücrelerin, GlcNAc, mannoz, GalNAc ve sialik asite spesifik lektinlerle işaretlendiği bildirilmiştir [25]. Çalışmamızda, 3 tip lektinle hücre zarlarında ve bazı hücrelerde pozitif reaksiyon görülürken, iri ve açık sarı hücrelere de rastlanmıştır. Açık sarı ve irice görülen bu hücrelerin, H-E bulgularına da benzer şekilde makrofajlar olabileceği söylenebilir. Bulgular her iki grup için de benzer olduğu için, mannoz, galaktoza $\alpha(2\rightarrow3)$ bağlı sialik asitler ve Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc yapılarında değişiklik olmadığı söylenebilir.

C. aronia syn. Azarolus (L) ekstraktı ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 200 mg kg⁻¹ ekstrakt ile eritrosit sayısında (RBC) ve

paketlenmiş hücre hacminde (PCV), 100-500 mg kg⁻¹ ekstrakt ile protrombin zamanı (PT) ve aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanında (APTT) belirgin bir artış olduğu, karaciğer ve böbrek fonksiyonları ile elektrolitlerde değişiklik olmadığı bildirilmiştir. 2000 mg kg⁻¹ veya altı değerlerde bitkinin akut veya subakut olumsuz etkisinin olmadığı, RBC, PCV, PT ve APTT artışının ileri araştırmalar gerektirdiği ileri sürülmüştür [27]. Bu çalışmada, *C. aronia* var. *dentata* Browicz'in % 1'lik konsantrasyondaki ekstraktının uygulandığı sıçan dalağında, histokimya ve lektin histokimya bulgularının her iki grupta da benzerlik gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, *C. aronia* var. *dentata* Browicz'in %1'lik ekstraktının dalak histomorfolojisi ve bazı karbohidrat yapıları üzerinde farklı etkisi olmadığı söylenebilir. Ancak, bitki içeriğinin morfolojik ve moleküler etkilerinin ortaya konması bakımından hayvan modellerinde farklı konsantrasyonlarda, dalakta ve diğer organlarda yapılacak olan histomorfolojik araştırmalara ve ileri moleküler analizlere ihtiyaç vardır.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar çıkar ilişkilerinin olmadığını beyan etmiştir.

Kaynaklar

1. Karaçalı S. Glikobiyoloji güncel moleküler biyoloji. Turk J Vet Anim Sci 2003;27:489-495.
2. Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. Zoology 2004;107:49-64.
3. Al Makdessi S, Sweidan H, Dietz K, Jacob R. Protective effect of *Crataegus oxyacantha* against reperfusion arrhythmias after global no-flow ischemia in the rat heart. Basic Res Cardiol 1999;94:71-77.
4. Holubarsch CJF, Colucci WS, Meinertz T, Gaus W, Tendra M. The efficacy and safety of Crataegus extract WS® 1442 in patients with heart failure: the SPICE trial. Eur J Heart Fail 2008;10:1255-1263.
5. Verma SK, Jain V, Verma D, Khamesra R. *Crataegus oxyacantha*-A cardioprotective herb. J Herb Med Toxicol 2007;1:65-71.
6. Ahumada C, Saenz T, Garcia D, De La Puerta R, Fernandez A, Martinez E. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. J Pharm Pharmacol 1997;49:329-331.
7. Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Yin YF, Wang CP, Tseng TH. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. J Agric Food Chem 2005;53:430-436.
8. Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Chu CY, Tseng TH. Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application. Food Chem Toxicol 2007;45:1795-1804.

9. Seo N, Ito T, Wang N, Yao X, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M, Kitanaka S. Anti-allergic *Psidium guajava* extracts exert an antitumor effect by inhibition of T regulatory cells and resultant augmentation of Th1 cells. *Anticancer Res* 2005;25:3763-3770.
10. Shariffar F, Pournourmohammadi S, Arabnejad M. Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Achillea wilhelmsii* C. Koch in mice. *Indian J Exp Biol* 2009;47:668-671.
11. Zandonai RH, Coelho F, Ferreira J, Mendes AKB, Biavatti MW, Niero R, Cechinel V, Bueno EC. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Braz J Pharm Sci* 2010;46:323-333.
12. Muhi-eldeen Z, Al-Shamma KJ, Al-Hussainy TM, Al-Kaissi EN, Al-Daraji AM, Ibrahim H. Acute toxicological studies on the extract of Iraqi *Peganum harmala* in rats. *Eur J Sci Res* 2008;22:494-500.
13. Gupta PC. A preliminary study on effects of leaf extract of *Ficus bengalensis* (Linn.) on spermatogenesis and fertility in albino mice. *Int J Pharm Tech Res* 2012;4:226-232.
14. Al-Dahmesh B, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Chili pepper-induced injury to splenic tissue of rabbit. *J Med Plants Res* 2011;5:2015-2020.
15. Coskun O, Kanter M, Armutcu F, Cetin K, Kaybolmaz B, Yazgan O. Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer. *Eur J Gen Med* 2004;1:37-42.
16. Vijayaraghavan R, Gautam A, Sharma M, Satish HT, Pant SC, Ganesan K. Comparative evaluation of some flavonoids and tocopherol acetate against the systemic toxicity induced by sulphur mustard. *Indian J Pharmacol* 2008;40:114-120.
17. Bahri-Sahloul R, Ammar S, Fredj RB, Saguem S, Grec S, Troten F, Skhiri FH. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. *Pak J Biol Sci* 2009;12:660-668.
18. Miller NJ, Castelluccio C, Tijburg L, Rice-Evans C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators?. *FEBS Lett* 1996;392:40-44.
19. Salprima Yudha S, Angasa E, Ningsih S, Manaf S, Anggria Murni S, Umbara F. Iron chelating and antiradical activity of kayu manik leaves (*Trema orientalis*). *Indo J Chem* 2011;11:196-199.
20. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF. Correlation between the in vitro iron chelating activity and poly phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Pak J Biol Sci* 2009;12:934-938.
21. Meena MC, Patni V. Isolation and identification of flavonoid "quercetin" from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian J Exp Sci* 2008;22:137-142.
22. Khatibi R. Effect of alcoholics extract on rat livers and antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *J Hortic For* 2011;3:386-391.
23. Tsukada M, Spicer SS. Heterogeneity of macrophages evidenced by variability in their glycoconjugates. *J Leukoc Biol* 1988;43:455-467.
24. Düllman J, Feldhaus S, Van Damme EJM, Peumans WJ, Schumacher U. Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the stromal architecture of white pulp and the sinuses of red pulp. *J Histochem Cytochem* 2000;48:923-931.
25. Düllmann J, Van Damme EJM, Peumans WJ, Ziesenitz M, Schumacher U. Lectin histochemistry of the rat lymph node: visualisation of stroma, blood vessels, sinuses, and macrophages. A contribution to the concept of an immune accessory role of sinus-lining endothelia. *Acta Histochem* 2002;104:77-83.
26. Balcan E, Tuglu I, Sahin M, Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. *Acta Histochem* 2008;110:14-25.
27. Shatoor AS. Acute and sub-acute toxicity of *Crataegus aronia* syn. *azarolus* (L.) whole plant aqueous extract in wistar rats. *Am J Pharm & Toxicol* 2011;6:37-45.