

# Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de la cabeza floral de *Sphaeranthus indicus* Linn

*Immunomodulatory activity of methanol extract of flower-heads of Sphaeranthus indicus Linn*

BAFNA AR, AND MISHRA SH.\*

Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering,  
The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002, Gujarat, India

\*Dirección para correspondencia: Dr.S.H.Mishra, Pharmacy department, Faculty of Technology and Engineering,  
The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002. Gujarat, India.  
Correo electrónico:shmishra48@rediffmail.com

## RESUMEN

El extracto de metanol y sus fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol sobrante de las cabezas florales de *Sphaeranthus indicus* Linn demostraron su eficacia al aumentar la actividad fagocítica, el título de anticuerpos de la hemaglutinación y la hipersensibilidad de tipo retardado, mientras que sólo la fracción de metanol restante resultó activa en la normalización de los niveles de leucocitos totales en el caso de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. Por tanto, el presente estudio revela que el fármaco augura buenos resultados como agente inmunomodulador, al actuar como estimulante de la inmunidad celular y humoral y de la función fagocítica.

PALABRAS CLAVE: *Sphaeranthus indicus*. Actividad inmunomoduladora. Hemaglutinación. Mielosupresión.

## ABSTRACT

*Methanol extract, its petroleum ether, chloroform and remaining methanol fractions, of flower heads of Sphaeranthus indicus Linn. were found effective in increasing phagocytic activity, haemagglutination antibody titer and delayed type hypersensitivity, whereas only remaining methanol fraction was found active in normalizing total WBC levels in case of cyclophosphamide induced myelosuppression in mice. Present study, therefore, reveals that the drug holds promise as immunomodulatory agent, which acts by stimulating both humoral as well as cellular immunity and phagocytic function.*

KEY WORDS: *Sphaeranthus indicus*. Immunomodulatory activity. Haemagglutination. Myelosuppression.

## INTRODUCCIÓN

Los fármacos herbales son conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras y por estimular de forma generalizada la inmunidad específica y no específica<sup>1</sup>. Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado poseer actividades inmunomoduladoras. Algunas de estas plantas estimulan tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral, mientras que otras sólo activan los componentes celulares del

## INTRODUCTION

Herbal drugs are known to possess immunomodulatory properties and generally act by stimulating both specific and non-specific immunity<sup>1</sup>. Many plants used in traditional medicine are reported to have immunomodulating activities. Some of these stimulate both humoral and cell mediated immunity while others activate only the cellular components of the immune system, i.e. phagocytic function without affecting the

sistema inmunitario, es decir, la función fagocítica sin afectar a la inmunidad celular o humoral. El extracto de hoja de *Picrorrhiza kurroa* actúa como estimulante de la respuesta humoral y de la función fagocítica del sistema reticuloendotelial. Algunas de estas plantas también actúan como supresores de la inmunidad celular y humoral<sup>2,3</sup>.

Aproximadamente unas 34 plantas se identifican como *rasayanas* en el sistema de medicina Ayurvedic de la India y presentan diversas propiedades farmacológicas inmunoestimulantes, tónicas, neuroestimulantes, anti-envejecimiento, antibacterianas, antivirales, antirreumáticas, anticancerígenas, adaptogénicas, antiestrés, etc.<sup>4</sup> La materia médica ayurvédica dedica una sección completa a los fármacos utilizados para mejorar la resistencia corporal titulada 'Rasayana'. Se identificaron diversas plantas con actividad inmunomoduladora potencial, entre las que se encontraban algunas con las que ya se había emprendido la evaluación de sus actividades en animales y, en cierta medida, en humanos. *Asparagus racemosus*, *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, *Ocimum sanctum*, *Panax ginseng*, *Picrorrhiza kurroa*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera* etc. son algunos ejemplos evidentes de plantas con una actividad prometedora. Aún quedan por investigar muchas más, lo que amplía las posibilidades para futuras investigaciones<sup>4</sup>.

*Sphaeranthus indicus* Linn. (Compositae) es una hierba que se encuentra principalmente en el sur de la India que posee propiedades antiulcerosas, estomacales, estimulantes, curativas,pectorales, demulcentes y emolientes de forma externa. Los médicos locales recomiendan el agua destilada preparada como el agua de rosas procedente de la hierba para las afecciones biliares y la diseminación de varios tipos de tumores. Las flores (la cabeza floral) son muy apreciadas por sus propiedades curativas, depurativas, febrífugas y tónicas, muy útiles como purificadoras de la sangre en patologías dérmicas. El fármaco es también muy útil para combatir la ictericia y las secreciones uretrales. La presente investigación se realizó con el propósito de estudiar la actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las cabezas florales de *S.indicus* y sus distintas fracciones mediante los métodos establecidos para justificar las indicaciones tradicionales legadas por el fármaco como rasayana.

humoral or cell mediated immunity. Leaf extract of *Picrorrhiza kurroa* stimulated the humoral response and the phagocytic function of the reticuloendothelial system. Some of these plants also suppress both humoral and cell mediated immunity<sup>2,3</sup>.

About 34 plants are identified as *rasayanas* in Indian Ayurvedic system of medicine having various pharmacological properties such as immunostimulant, tonic, neurostimulant, antiageing, antibacterial, antiviral, antirheumatic, anticancer, adaptogenic, antistress etc.<sup>4</sup>. An entire section of materia medica of Ayurveda is devoted to drugs entitled as 'Rasayana' used for enhancement of body resistance<sup>5</sup>. Many plants with potential immunomodulatory activity are reported, some of these have already been undertaken for evaluation of their activities in animals, and also to some extent in humans. Some glaring examples with promising activity are *Asparagus racemosus*, *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, *Ocimum sanctum*, *Panax ginseng*, *Picrorrhiza kurroa*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera* etc. A lot more are still to be explored and offer scope for further investigation<sup>4</sup>.

*Sphaeranthus indicus* Linn. (Compositae) is a herb found mostly in southern part of India used as bitter stomachic, stimulant, alterative, pectoral and demulcent, and externally emollient. Distilled water prepared like rose water from the herb is recommended by local physicians for bilious affections and for dispersions of various kinds of tumours. Flowers (flower heads) are highly esteemed as alteratives, depuratives, refrigerants and tonics, useful as blood purifiers in skin diseases. The drug is also useful in urethral discharges and in jaundice<sup>6</sup>. The present investigation was aimed to study the immunomodulatory activity of methanol extract of flower heads of *S.indicus* and its different fractions using reported methods in order to justify the traditional claims endowed upon the drug as rasayana.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals:** Swiss albino mice of either sex, weighing 20-25 gms, housed in standard conditions of temperature, humidity and light were used. They were fed with standard rodent diet and water *ad libitum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** Ratones albinos suizos de ambos sexos, con un peso de entre 20 y 25 g., mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y luz. Fueron alimentados con una dieta estándar de roedor y agua *ad libitum*.

**Material de la planta y preparación del extracto:** Se recogieron cabezas florales frescas de *S.indicus* procedentes de los jardines de la ciudad y se autenticaron en el Departamento de botánica de la M.S.University, Baroda. La maceración de las cabezas florales disecadas al aire de *S.indicus* proporcionó un 6,65% de extracto de metanol (w/w). El extracto de metanol obtenido de este modo se fraccionó por maceración en disolventes de distintas polaridades como el éter de petróleo, el benceno, el cloroformo y el metanol. Todas sus respectivas fracciones se concentraron al vacío y se utilizaron para el cribado farmacológico y fitoquímico. El extracto de metanol resultó positivo en las pruebas de alcaloides, felónicos, esteroides, terpenoides y carbohidratos. Las fracciones de cloroformo, benceno y éter de petróleo resultaron positivas en las pruebas de terpenoides y esteroides, mientras que la fracción de metanol resultó positiva en las pruebas de alcaloides, felónicos y carbohidratos en el cribado fitoquímico<sup>7</sup>.

**Muestras de prueba:** Las cantidades pesadas de los extractos de prueba se suspendieron en un 1% de carboximetilcelulosa de sodio para preparar las formas de dosificación adecuadas. A los animales controlados se les proporcionó un volumen equivalente de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo. La ciclofosfamida se utilizó como inmunosupresor estándar.

**Suspensión de tinta de carbón:** Se diluyó tinta Pelican AG, Germany ocho veces con solución salina y se utilizó para la prueba de depuración del carbón en una dosis de 10µl/gm de peso corporal de los ratones.

Los eritrocitos de cordero se lavaron tres veces en solución salina normal y se ajustaron a una concentración del 20% para la inmunización y del 1% para la prueba como antígeno.

**Plant material and extract preparation:** Fresh flower heads of *S.indicus* were collected from the outfield of city, and were authenticated in Botany Department of M.S.University, Baroda. Maceration of air-dried, powdered flower heads of *S.indicus* afforded 6.65% methanol extract (w/w). Methanol extract so obtained was then fractionated by maceration into different polarity solvents like petroleum ether, benzene, chloroform and methanol. All respective fractions were concentrated under vacuum and used for phytochemical and pharmacological screening. Methanol extract gave positive tests for alkaloids, phenolics, steroids, terpenoids and carbohydrates. Petroleum ether, benzene and chloroform fractions gave positive tests for terpenoids and steroids whereas methanol fraction gave positive tests for alkaloids, phenolics and carbohydrates on phytochemical screening<sup>7</sup>.

**Test samples:** Weighed quantities of test extracts were suspended in 1% sodium carboxy methylcellulose to prepare suitable dosage form. The control animals were given an equivalent volume of sodium carboxy methylcellulose vehicle. Cyclophosphamide was used as a standard immunosuppressant.

**Carbon ink suspension:** Pelican AG, Germany, ink was diluted eight times with saline and used for carbon clearance test in a dose of 10µl/gm body weight of mice.

Sheep red blood cells (SRBCs) were washed with three times in normal saline and adjusted to a concentration 20% for immunization and 1% for challenge as Antigen.

## METHODS

### *Phagocytic activity*

Phagocytic index was determined as per the method reported by Gonda et al.<sup>8</sup> Mice were divided into 11 groups, of six animals each. The control group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle; while animals of the treatment groups were given test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 5 days. Carbon ink suspension was injected via tail vein to each mouse after 48 hours of 5 days treatment. Blood samples were drawn from orbital vein at

## MÉTODOS

### *Actividad fagocítica*

El índice fagocítico se determinó mediante el método establecido por Gonda et al.<sup>8</sup> Los ratones se dividieron en 11 grupos con seis animales cada uno. El grupo de control sólo recibió un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 5 días. A cada ratón se le inyectó la suspensión de tinta de carbón a través de la vena de la cola 48 horas después del tratamiento de 5 días. Se extrajeron muestras de sangre de la vena orbital a los 0 y 15 minutos. La sangre (25- $\mu$ l) se mezcló con un 0,1% de carbonato sódico (2 ml) y se sometió a la determinación de densidades ópticas a 660 nm.

El índice fagocítico (K) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

donde  $OD_1$  y  $OD_2$  son las densidades ópticas en los momentos  $t_1$  and  $t_2$ , respectivamente.

### *Mielosupresión inducida por ciclofosfamida*

La mielosupresión inducida por ciclofosfamida se estudió de acuerdo con el método descrito por Manjarekar et al.<sup>9</sup> Los animales se dividieron en 12 grupos de seis animales cada uno. El grupo de control y el grupo de la ciclofosfamida recibieron un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio sólo como vehículo diariamente durante 13 días, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 13 días. Los días 11, 12 y 13, a todos los animales excepto a los del grupo de control se les inyectó ciclofosfamida (30 mg/kg, intraperitoneal) 1 hora después de la administración de los extractos. Las muestras de sangre se extrajeron el día 14 y se determinó el recuento de leucocitos totales.

0 and 15 min. Blood (25- $\mu$ l) was mixed with 0.1 % sodium carbonate (2 ml) and subjected for determination optical densities at 660 nm.

The phagocytic index K, was calculated by using following equation:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

where  $OD_1$  and  $OD_2$  are the optical densities at times  $t_1$  and  $t_2$ , respectively.

### *Cyclophosphamide induced Myelosuppression*

Cyclophosphamide induced myelosuppression was studied according to the method described by Manjarekar et al.<sup>9</sup> Animals were divided into 12 groups of six animals each. The control group and cyclophosphamide group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle daily for 13 days while animals in treatment groups were given the test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 13 days. On days 11, 12, 13 all the animals except in the control group were injected with cyclophosphamide (30mg/kg, i.p.) 1 hour after administration of the extracts. Blood samples were collected on day 14 and total white blood cell (WBC) count was determined.

### *Humoral antibody (HA) titre and delayed type hypersensitivity (DTH) response:*

The method described by Puri et al.<sup>10</sup> was adopted. Animals were divided into 11 groups of six animals each. The control group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle; while animals in the treatment groups were given the test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 7 days. The animals were immunized by injecting 0.1 ml of 20% of fresh sheep red blood cells suspension intraperitoneally on 0 day. Blood samples were collected in micro centrifuge tubes from individual animal by retro-orbital plexus on 7<sup>th</sup> day to obtain serum. Antibody levels were determined by haemagglutination technique. Briefly, equal volumes of individual serum samples of each group were pooled. Two fold dilutions of pooled serum samples were made in 25  $\mu$ l volumes of normal saline in microtitration plate and to it added 25  $\mu$ l of 1% suspension of sheep red blood cells in

### ***Título de anticuerpos humorales y la respuesta de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH):***

Se adoptó el método descrito por Puri et al.<sup>10</sup> Los animales se dividieron en 11 grupos de seis animales cada uno. El grupo de control recibió un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio sólo como vehículo, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 7 días. El día 0, los animales fueron inmunizados mediante la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión fresca de eritrocitos de cordero al 20%. Las muestras de sangre se extrajeron en tubos microcentrífugos a cada animal de forma individual del plexo retroorbital el día 7 para la obtención de suero. Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante la técnica de hemaglutinación. En síntesis, se obtuvo el mismo volumen de suero de las muestras individuales de cada grupo. Las diluciones de factor dos de las muestras de suero mezclado se realizaron en volúmenes de 25 µl de solución salina normal en placas de microtítulo y a las que se añadieron 25 µl de suspensión de eritrocitos de cordero en solución salina al 1%.

Una vez realizada la mezcla, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se examinaron bajo el microscopio en busca de hemaglutinación. Se tomó como título de anticuerpos la muestra recíproca de la dilución más alta de los sueros de prueba que resultó positiva en aglutinación. El día 7, se midió el grosor de la pata trasera derecha mediante el calibrador digital Vernier. A continuación, se inyectó a los ratones 20µl de eritrocitos de cordero al 1% en la pata trasera derecha. Se midió de nuevo el grosor de la pata pasadas 24 horas. La diferencia entre el grosor de la pata antes y después de la inyección expresada en mm se tomó como medida de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).

### ***Análisis estadístico***

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  del análisis S.E.M. y el análisis estadístico se realizó con el empleo de pruebas *t* de estudiantes.

saline. After mixing, the plates were incubated at room temperature for 1 hr. and examined for haemagglutination under microscope. The reciprocal of the highest dilution of the test serum giving agglutination was taken as the antibody titre.

On 7<sup>th</sup> day, the thickness of the right hind footpad was measured using digital vernier caliper. The mice were then challenged by injection of 20µl of 1% SRBCs in right hind footpad. Foot thickness was again measured after 24 hrs of this challenge. The difference between the pre and post challenge foot thickness express in mm was taken as a measure of delayed type hypersensitivity (DTH).

### ***Statistical analysis***

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical analysis was carried out employing Student's *t*-test.

## RESULTS

### ***Carbon clearance test***

Methanol extract of *S.indicus* and its fractions in different solvents possess macrophage stimulatory activity as evidenced by increased phagocytic index in carbon clearance test. The phagocytic activity of reticuloendothelial is generally measured by the rate of removal of carbon particles from blood stream. The phagocytic index for control group was found to be  $0.094 \pm 0.0065$  whereas all test extracts of *S.indicus* increased it significantly. The maximum effect was found in case of methanol extract and its petroleum ether and remaining methanol fractions ( $P < 0.001$ ) (Table 1).

## RESULTADOS

### Prueba de depuración del carbón

El extracto de metanol de *S.indicus* y sus fracciones en distintos disolventes poseen actividad estimuladora macrófaga como demostró el aumento del índice fagocítico en la prueba de depuración del carbón. La actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial generalmente se midió en relación con la velocidad de eliminación de las partículas de carbón del flujo sanguíneo. El índice fagocítico del grupo de control fue de  $0,094 \pm 0,0065$ , mientras que en todos los extractos de prueba de *S.indicus* aumentó de forma significativa. El máximo efecto se encontró en el caso del extracto de metanol y la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante ( $P < 0,001$ ) (Tabla 1).

**TABLA I:** Efecto del extracto de metanol y sus distintas fracciones cromatográficas sobre el título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH, el índice fagocítico y la mielosupresión inducida por ciclofosfamida.

**TABLE I:** Effect of methanol extract and its different Fractions on HA titre, DTH response, phagocytic index and cyclophosphamide induced myelosuppression.

| Tratamiento<br>Treatment                                 | Dosis<br>Dose<br>mg/kg | Título de anticuerpos<br>humorales<br>Media $\pm$ análisis S.E.M.<br>HA titre<br>Mean $\pm$ S.E.M. | Respuesta DTH (mm)<br>Media edema de la pata $\pm$<br>análisis S.E.M.<br>DTH response (mm)<br>Mean paw edema $\pm$ S.E.M. | Índice fagocítico<br>Media $\pm$ análisis S.E.M.<br>Phagocytic index<br>Mean $\pm$ S.E.M. | Recuento de leucocitos totales<br>Media $\pm$ análisis S.E.M.<br>Total WBC count<br>Mean $\pm$ S.E.M. |
|--|------------------------|--|---|---|---|
| Control  | -                      | 64,00 $\pm$ 14,311   | 0,313 $\pm$ 0,038   | 0,0943 $\pm$ 0,006  | 5800 $\pm$ 99,16  |
| Ciclofosfamida<br>Cyclophosphamide                       | 30                     | -  | -   | -   | 2142 $\pm$ 248,1  |
| Extracto de metanol<br>Methanol extract                  | 100                    | 682,7 $\pm$ 107,9 <sup>c</sup>   | 0,590 $\pm$ 0,054 <sup>c</sup>  | 0,150 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>  | 4191 $\pm$ 214,6 <sup>c</sup>   |
|  | 200                    | 405,3 $\pm$ 69,46 <sup>c</sup>   | 0,576 $\pm$ 0,084 <sup>c</sup>  | 0,126 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>  | 4300 $\pm$ 1544 <sup>c</sup>  |
| Fracción de éter de petróleo<br>Petroleum ether fraction | 100                    | 256,0 $\pm$ 57,24 <sup>c</sup>   | 0,470 $\pm$ 0,050 <sup>c</sup>  | 0,151 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>  | 3483 $\pm$ 222,4 <sup>b</sup>   |
|  | 200                    | 298,7 $\pm$ 71,39 <sup>c</sup>   | 0,510 $\pm$ 0,037 <sup>c</sup>  | 0,167 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>  | 3625 $\pm$ 197,8 <sup>c</sup>   |
| Fracción de benceno<br>Benzene fraction                  | 100                    | 170,7 $\pm$ 75,12 <sup>d</sup>   | 0,275 $\pm$ 0,032 <sup>N.S.</sup>   | 0,125 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>  | 2650 $\pm$ 172,7 <sup>d</sup>   |
|  | 200                    | 138,7 $\pm$ 25,69 <sup>a</sup>   | 0,246 $\pm$ 0,062 <sup>N.S.</sup>   | 0,123 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>  | 3058 $\pm$ 157,3 <sup>a</sup>   |
| Fracción de cloroformo<br>Chloroform fraction            | 100                    | 277,3 $\pm$ 76,92 <sup>a</sup>   | 0,521 $\pm$ 0,022 <sup>c</sup>  | 0,123 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>  | 2868 $\pm$ 101,4 <sup>a</sup>   |
|  | 200                    | 160,0 $\pm$ 32,00 <sup>a</sup>   | 0,332 $\pm$ 0,059 <sup>N.S.</sup>   | 0,139 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>  | 3100 $\pm$ 96,61 <sup>a</sup>   |
| Fracción de metanol<br>Methanol fraction                 | 100                    | 341,3 $\pm$ 78,67 <sup>c</sup>   | 0,670 $\pm$ 0,050 <sup>c</sup>  | 0,165 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>  | 5275 $\pm$ 453,1 <sup>c</sup>   |
|  | 200                    | 426,7 $\pm$ 53,97 <sup>c</sup>   | 0,810 $\pm$ 0,037 <sup>c</sup>  | 0,162 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>  | 6083 $\pm$ 568,9 <sup>c</sup>   |

Los valores se expresan como la media  $\pm$  del análisis S.E.M. n=6; a =  $p < 0,05$ , b =  $p < 0,001$ , d = N.S. (No significativo).

Todos los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de control para el título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH y el índice fagocítico, y se compararon con el grupo de la ciclofosfamida en el caso de la mielosupresión inducida por la ciclofosfamida.

Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=6; a =  $p < 0,05$ , b =  $p < 0,001$ , d = N.S. (Non Significant).

All treated groups are compared with control for HA titre, DTH response and phagocytic index, whereas with cyclophosphamide group in case of cyclophosphamide induced myelosuppression.

*Mielosupresión inducida por ciclofosfamida*

La administración de ciclofosfamida provocó el descenso significativo de los niveles de leucocitos totales en sangre ( $2142 \pm 248,08$ ) en comparación con el grupo de control ( $5800 \pm 99,16$ ). El extracto de metanol y la fracción de metanol sobrante resultaron ser unos potentes protectores de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida como evidenció el aumento significativo de los niveles del recuento de leucocitos totales ( $p < 0,001$ ). Las fracciones de éter de petróleo y cloroformo también aumentaron los niveles de leucocitos pero no pudieron alcanzar los valores normales. La fracción de metanol sobrante del extracto de metanol fue la única fracción que aumentó el recuento de leucocitos totales hasta valores normales de una forma dosis-dependiente ( $5275 \pm 453,1$  y  $6083 \pm 568,9$  para 100 y 200 mg/kg respectivamente).

*Título de anticuerpos humorales y la respuesta de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)*

La respuesta humoral ante los eritrocitos de cordero se comprobó mediante el título de anticuerpos de la hemaglutinación. El valor del título de anticuerpos humorales del grupo de control fue  $64,00 \pm 14,31$ . La administración del extracto de metanol y sus fracciones produjo un aumento del título de anticuerpos humorales como evidenció la hemaglutinación en esta dilución. Se obtuvieron niveles estadísticamente significativos con el extracto de metanol y sus fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol sobrante en ambas dosis. El aumento dosis-dependiente sólo se estableció con la fracción de éter de petróleo ( $256 \pm 57,24$  y  $298,7 \pm 71,39$ ) y la fracción de metanol ( $341,3 \pm 78,67$  y  $426,7 \pm 53,97$ ). El extracto de metanol ( $682,7 \pm 107,9$  y  $405,3 \pm 69,46$ ) y la fracción de cloroformo ( $277,3 \pm 76,92$  y  $160 \pm 32$ ) mostraron un descenso de los niveles a dosis más altas.

La respuesta DTH se comprobó por el aumento del grosor de la pata mediante el calibrador digital Vernier. La administración del extracto de metanol y sus fracciones produjo un aumento del grosor de la pata de los ratones, hecho que se tomó como medida de la respuesta DTH. Se obtuvo un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) de la respuesta DTH en

*Cyclophosphamide induced myelosuppression*

Administration of cyclophosphamide has significantly lowered the levels of total WBC ( $2142 \pm 248.08$ ) as compared to control group ( $5800 \pm 99.16$ ) in blood. Methanol extract and remaining methanol fraction were found potent in protecting cyclophosphamide-induced myelosuppression as evidenced by increasing the levels of total WBC count significantly ( $p < 0.001$ ). Petroleum ether and chloroform fraction also raised WBC levels but could not reach up to the normal values. Remaining methanol fraction of methanol extract was the only fraction that increased the total WBC count up to the normal values in a dose dependent manner ( $5275 \pm 453.1$  and  $6083 \pm 568.9$  at 100 and 200 mg/kg respectively).

*Humoral antibody (HA) titre and delayed type hypersensitivity (DTH) response*

Humoral response to SRBCs was checked by haemagglutination antibody titre. The humoral antibody titre value in control was found to be  $64.00 \pm 14.31$ . Administration of methanol extract and its fractions produced increase in humoral antibody titre as evident by haemagglutination at that dilution. Statistically significant levels were obtained with methanol extract and its petroleum ether, chloroform and remaining methanol fraction at both the dose level. The dose dependent increase was established only with petroleum ether ( $256 \pm 57.24$  and  $298.7 \pm 71.39$ ) and methanol fraction ( $341.3 \pm 78.67$  and  $426.7 \pm 53.97$ ). Methanol extract ( $682.7 \pm 107.9$  and  $405.3 \pm 69.46$ ) and chloroform fraction ( $277.3 \pm 76.92$  and  $160 \pm 32$ ) showed decrease in levels at higher dose.

DTH response was checked by increased footpad thickness using digital vernier calipers. Administration of methanol extract and its fractions produced increase in thickness of footpad of mice as a measure of DTH response. Statistically significant ( $p < 0.001$ ) increase in DTH response in dose dependent manner by remaining methanol fraction ( $0.670 \pm 0.050$  and  $0.810 \pm 0.037$ ) and petroleum ether fraction ( $0.470 \pm 0.050$  and  $0.510 \pm 0.037$ ) obtained. Benzene fraction slightly reduced the DTH response by reducing thickness of footpad compared to control group. Methanol extract and chloroform fraction also

la forma dosis-dependiente con la fracción de metanol sobrante ( $0,670 \pm 0,050$  y  $0,810 \pm 0,037$ ) y la fracción de éter de petróleo ( $0,470 \pm 0,050$  y  $0,510 \pm 0,037$ ). La fracción de benceno redujo levemente la respuesta DTH al reducir el grosor de la pata en comparación con el grupo de control. El extracto de metanol y la fracción de cloroformo también mostraron un aumento de la respuesta DTH en comparación con el grupo de control.

## DISCUSIÓN

Se estudió la actividad inmunomoduladora de *S.indicus* mediante la evaluación de su efecto en el título de anticuerpos, la respuesta DTH, la función fagocítica y la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. La administración del extracto de metanol y sus fracciones mostró actividad inmunoestimuladora. Se obtuvo una estimulación significativa con respecto a estos parámetros con el extracto de metanol, la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante, mientras que las fracciones de cloroformo y benceno mostraron cambios poco significativos. El aumento en el índice de depuración del carbón reflejó la mejora de la función fagocítica de macrófagos mononucleares y de la inmunidad no específica. La fagocitosis de los macrófagos es importante frente a los parásitos de menor tamaño y su efectividad mejora notablemente gracias a la opsonización de los parásitos mediante los anticuerpos y el complemento C3b que es el encargado de una depuración más rápida de los parásitos de la sangre<sup>11</sup>. La producción de anticuerpos frente a los eritrocitos de cordero (SRBC, antígeno T-dependiente) requiere la cooperación de los macrófagos y los linfocitos B<sup>12</sup>. Los resultados obtenidos durante la presente investigación mostraron un aumento en la producción de anticuerpos en respuesta a los eritrocitos de cordero.

La respuesta DTH es específica del antígeno y causa eritema e inducción en el lugar de la inyección del antígeno en animales inmunizados. La histología de la hipersensibilidad retardada (DTH) puede variar según la especie, pero una característica general es la llegada de células del sistema inmune al lugar donde se realiza la inyección, macrófagos y basófilos en el caso de los ratones en los que la inducción resulta

showed increased DTH response compared to control group.

## DISCUSSION

Immunomodulatory activity of *S.indicus* was explored, by evaluating its effect on antibody titre, DTH response, phagocytic function and cyclophosphamide induced myelosuppression in mice. Administration of methanol extract and its fractions showed immunostimulating activity. Significant stimulation with respect to these parameters was obtained with methanol extract, its petroleum ether and remaining methanol fraction while benzene, chloroform fractions showed insignificant changes. The increase in carbon clearance index reflects the enhancement of phagocytic function of mononuclear macrophage and non-specific immunity. Phagocytosis by macrophages is important against the smaller parasites and its effectiveness is markedly enhanced by opsonisation of parasite with antibodies and complement C3b leading to more rapid clearance of parasite from blood<sup>11</sup>. The antibody production to T-dependent antigen SRBCs requires the cooperation of T and B-lymphocytes and macrophages<sup>12</sup>. Results obtained during present investigation showed increased antibody production in response to SRBCs.

DTH is antigen specific and causes erythema and induction at the site of antigen infection in immunized animals. The histology of DTH can be different for different species, but the general characteristics are an influx of immune cells at the site of injection, macrophages and Basophils in mice and induction becomes apparent within 24-72 hours. T-cells are required to initiate the reaction<sup>13, 14</sup>.

Increase in the DTH response indicates that drug has a stimulatory effect on lymphocytes and necessary cell types required for the expression reaction. DTH response, which is direct co-relation of cell-mediated immunity, was significantly increased as compared to untreated control<sup>15</sup>.

Statistically significant rise in HA titre, DTH response and phagocytic activity of petroleum ether and remaining methanol fraction suggest that active principles of flower heads which are responsible for stimulation of antibody response, cell mediated response and phagocytic function can be extracted with both polar and non



evidente a las 24-72 horas. Las células T son necesarias para iniciar la reacción<sup>13, 14</sup>.

El aumento de la respuesta DTH indica que el fármaco produce un efecto estimulador sobre los linfocitos y los tipos de células necesarias para la expresión de la reacción. La respuesta DTH, que es el correlato directo de la inmunidad celular, aumentó significativamente en comparación con el grupo de control no tratado<sup>15</sup>.

El aumento estadísticamente significativo del título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH y la actividad fagocítica de la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante sugirió que los principios activos de las cabezas florales, responsables de la estimulación de la respuesta de anticuerpos, la respuesta celular y la función fagocítica, se pueden extraer con disolventes polares y no polares.

En el caso de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida, la fracción de metanol sobrante del extracto de metanol consiguió devolver el nivel de leucocitos a su nivel normal, mientras que el resto de fracciones no dieron resultado, lo que sugirió que los componentes polares son los responsables de la protección frente a la mielosupresión por ciclofosfamida. El efecto protector de la fracción de metanol sobrante del extracto de metanol frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida es comparable a los efectos obtenidos con *Asparagus racemosus*<sup>16</sup> y *W. somnifera*<sup>17</sup>.

Ciertos fitoconstituyentes de la planta ya se han aislado; tres nuevos eudesmanólidos junto con dos sesquiterpenoides, criptomeridiol y 4-epi-criptomeridiol<sup>18</sup>, tres nuevas hidroxilactonas estrechamente relacionadas se han aislado del extracto de cloroformo de las cabezas florales de *S.indicus*<sup>19</sup>. Aislamiento de los alcaloides de las flores<sup>20</sup> y aislamiento de 7-hidroxi-3', 4'.5, 6-tetrametoxiflavona 7-O-β-D-(1→4)-diglucósido: También se identificó un nuevo glicósido de flavonol en el pecíolo de *S.indicus*<sup>21</sup>. Un principio antimicrobiano aislado del extracto de éter de petróleo se identificó como lactona sesquiterpénica bicíclica<sup>22</sup>. Un glicósido sesquiterpénico aislado del extracto de metanol de *S.indicus* fue el responsable del aumento de la producción de anticuerpos<sup>23</sup>.

Las lactonas sesquiterpénicas son importantes fitoconstituyentes de probada eficacia con variadas actividades farmacológicas como, por ejemplo, actividades antibacterianas (especialmente

polar solvents.

In the case of cyclophosphamide induced myelosuppression, remaining methanol fraction of methanol extract was able to bring back the levels of WBC to the normal while other fractions were ineffective suggesting that polar components responsible for protection against cyclophosphamide myelosuppression. The protective effect of remaining methanol fraction of methanol extract against myelosuppression induced by cyclophosphamide is comparable with those obtained for *Asparagus racemosus*<sup>16</sup> and *W. somnifera*<sup>17</sup>.

A few phytoconstituents from the plant have already been isolated; three new eudesmanolides along with two sesquiterpenoids, cryptomeridiol and 4-epicryptomeridiol<sup>18</sup>, three closely related new hydroxy lactone have been isolated from chloroform extract of flower heads *S.indicus*<sup>19</sup>. Isolation of alkaloids from flowers<sup>20</sup> and isolation of 7-hydroxy-3', 4'.5, 6-tetramethoxy-flavone 7-O-β-D-(1→4)-diglucoside: a new flavone glycoside from the stem of *S.indicus*<sup>21</sup> also reported. An antimicrobial principle isolated from petrol ether extract was identified as bicyclic sesquiterpene lactone<sup>22</sup>. One Sesquiterpene glycoside isolated from methanol extract of *S.indicus* was responsible for increased antibody production<sup>23</sup>.

Sesquiterpene lactones are proven as important phytoconstituents with different pharmacological activities such as antibacterial (especially against gram positive bacteria), antifungal and anthelmintic activity. Some act as anti-parasitic agent- artemisinin an antimalarial of proven efficacy in humans<sup>24</sup>. Recently three new Sesquiterpene glycosides isolated from *Dendrobium nobile* were reported for their immunomodulatory potential<sup>25</sup>. During the present study Sesquiterpene lactones were found in non-polar fractions while remaining methanol fraction was devoid of these constituents. The activity of petroleum ether, benzene and chloroform fractions may therefore be attributed to the presence of such non-polar type of compounds. However, protection against cyclophosphamide myelosuppression was observed by only remaining methanol fraction, suggests the content of constituents other than sesquiterpenoids which were also responsible for increased humoral and cellular response.

The present investigation therefore reveals that flower heads of *S.indicus* certainly possess im-

frente a la bacteria Gram positiva), antifungales y antihelmínticas. Algunas lactonas, como el artesunato, actúan como agentes antiparasitarios, con una probada eficacia antimalaria en humanos. Recientemente, se ha demostrado el potencial inmunomodulador en tres nuevos glicósidos sesquiterpénicos aislados de *Dendrobium nobile*. Durante el presente estudio las lactonas sesquiterpénicas se encontraron en las fracciones no polares, mientras que la fracción de metanol sobrante carecía de estos constituyentes. Por tanto, es posible atribuir la actividad de las fracciones de éter de petróleo, benceno y cloroformo a la presencia de este tipo de compuestos no polares.

Sin embargo, la protección frente a la mielosupresión por ciclofosfamida se observó sólo en la fracción de metanol sobrante, lo que sugiere un contenido de constituyentes distintos de los sesquiterpenoides, que son los responsables del aumento de la respuesta celular y humoral. Por tanto, la presente investigación revela que las cabezas florales de *S.indicus* posee con certeza propiedades inmunomoduladoras. El mecanismo exacto de actuación, sin embargo, sólo se pudo desarrollar después de la caracterización detallada de la parte activa de las distintas fracciones. Se han tenido en cuenta los estudios en esta línea y se continuarán teniendo en cuenta en futuras investigaciones.

## AGRADECIMIENTOS

A.R.Bafna desea dar las gracias a CSIR, New Delhi, India por su ayuda financiera (SRF) para el desarrollo de este trabajo.

munomodulatory properties. The exact mechanism of action, however, could only be unfolded after detailed characterization of active moieties from different fractions. Studies on these lines have already been taken up and shall follow in our future communications.

## ACKNOWLEDGEMENT

A.R.Bafna wishes to thank to The CSIR, New Delhi, India for providing financial assistance (SRF) for carrying out this work.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Wagner H and Proksh A. Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants. In: Wagner H (editor) Economic and medicinal plant research. 1985; Vol.I. Academic Press. London – New York. 113.
2. Atal CK, Sharma ML, Kaul A, Khajuria A. Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary Screening. J. Ethnopharmacol. 1986; 18: 133-141.
3. Sharma ML, Rao CS, Duda PL. Immunostimulator activity of *Picrorhiza* leaf extract. J. Ethnopharmacol. 1994; 41: 185-192.
4. Agrawal SS, Singh VK. Immunomodulators: A review of studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides. Part-I: Medicinal Plants. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. 1999; B (65): 179-204.
5. Thatte UM, Dahanukar SA. Rasayana concept: clues from immunomodulatory therapy In: Upadhyay SN (editor) Immunomodulation. 1997 Narosa Publishing House, New Delhi, 141.
6. Nadkarni KM. In: Indian Materia Medica. 1976; 3<sup>rd</sup> Edition. Popular Prakashan Vol.3, 1163.
7. Kokate CK. In: Practical Pharmacognosy. 1996; 1<sup>st</sup> Edition. Vallabh Prakashan: p. 110.
8. Gonda R, Tomoda M, Shimizu N, Kanari M. Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES. Planta Medica. 1990; 56: 73-76.

9. Manjarekar PN, Jolly CI, Narayanan S. Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. *Fitoterapia*. 2000; 71: 254-257.
10. Puri A, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant activity of *Nyctanthes arbortristis* L. *J. Ethnopharmacol.* 1994; 42: 31-37.
11. Roitt I, Brostoff J, Male D. In: *Immunology*. 1993; 3rd Edition. London. 1: 7.
12. Benacerraf B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and Borrower lymphocytes. *J. Immunol.* 1978; 120: 1809-1832.
13. Waksman BH. Cellular hypersensitivity and immunity: Conceptual changes in the last decade. *Cell Immunol.* 1979; 42:155-169.
14. Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G and Panayi G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol.* 1982; 74:358-69.
15. Mitra SK, Gupta M, Sarma DNK. Immunomodulatory effect of IM-133 Phytother. *Res.* 1999; 13:341-343.
16. Thatte UM, Dahanukar SA. Comparative study of immunomodulating activity of Indian medicinal plants, Lithium carbonate and Glucan. *Ind. Expt. Clin. Pharmacol.* 1988; 10:639-644.
17. Davis L, Kuttan G. Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. *J. Ethnopharmacol.* 1998; Oct; 62(3): 209-214.
18. Supada R, Rojatkar Bhimsen A and Nagsampagi. 7-hydroxylated eudesmanolides from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Phytochem.* 1992; 31(9): 3270-3271.
19. Gogte MG, Ananthasubramanian L, Nargund KS and Bhattacharya SC. Some interesting sesquiterpenoids from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Indian J. Chem.* 1986; March, Vol. 25B: 233-238.
20. Chughtai MID, Khokhar I, Ahmad A. Isolation, purification and structural determination of alkaloids from the flowers of *Sphaeranthus indicus*. *Sci.Int. (Lahore)*. 1992; 4(2): 151-154.
21. Yadava RN, Kumar S. 7- Hydroxy- 3',4',5,6- tetramethoxy -flavone 7-O-β-D-(1→4)-diglucoside: a new flavone glycoside from the stem of *Sphaeranthus indicus* Linn. *J. Inst. Chemists (India)*. 1998; 70(5): 164-166.
22. Singh SK, Tripathi SV, Singh AK and Singh RH. An antimicrobial principle from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Int. J. Crude Drug Res.* 1988; 26(4): 235-239.
23. Shekhani MS, Shah PM, Yasmin A, Siddiqui R, Parvin S, Khan KM, Kazmi SU and Atta-Ur-Rahman. An immunostimulant sesquiterpene glycoside from *Sphaeranthus indicus*. *Phytochem.* 1990; 29(8): 2573-2576.
24. Bruneton J. In: *Pharmacognosy: Phytochemistry: Medicinal plants 2<sup>nd</sup> edition*. Lavoisier Publishing, France. 1999; 621.
25. Ye Q, Qin G, Zhao W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile*. *Phytochem.* 2002; Dec; 61(8): 885-890.