

## بررسی تاثیر فرآورده دارویی MS14 بر وزن، اندیکس طحال و ساختار بافت‌های کلیه، کبد، طحال، ریه، گره لنفی و مغز استخوان موش

رضا صداقت<sup>۱</sup>، رویا یارائی<sup>۲\*</sup>، محسن ناصری<sup>۳</sup>، محمد مهدی نقی‌زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

<sup>۲</sup> گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد

<sup>۳</sup> گروه فارماکولوژی و گروه طب سنتی ایران، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

<sup>۴</sup> دانشگاه علوم پزشکی فسا

### چکیده

سابقه و هدف: اثر ترکیب گیاهی - دریایی MS14 در درمان بیماری اتوایمیون MS و اثرات ایمنومدولاتوری آن از جنبه‌های مختلف بررسی شده است. با توجه به احتمال کم‌عارضه بودن ترکیبات گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی، در مطالعه حاضر اثر فرآورده گیاهی MS14 بر وزن بدن، اندیکس طحال و برخی از بافت‌های بدن موش مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: تحقیق به روش تجربی روی موش Balb/c ماده با میانگین وزنی و گروه سنی مشابه (۸-۶ هفته) در دو گروه شاهد و دارو انجام گرفت. به گروه دارو، ۵ روز متوالی MS14 (با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و به گروه شاهد سرم فیزیولوژی خوراندند. در روز ششم موش‌ها وزن و پس از کشتن بدون درد حیوانات، طحال جدا و وزن گردید و به منظور مطالعات بافت‌شناختی، بافت‌های طحال، ریه، گره لنفی، کلیه، کبد و مغز استخوان در محلول فرمالین ده درصد جمع‌آوری شد. از بافت‌ها مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر بریده و با هماتوکسیلین - اتوزین رنگ‌آمیزی شدند و تاثیر دارو نسبت به گروه شاهد مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: فرآورده MS14 اثر معنی‌داری بر وزن بدن و اندیکس طحال موش‌ها نداشت. در گروه دارو، حداقل ۵۰ درصد از مقاطع ریزبینی طحال و ۹۰ درصد از مقاطع ریزبینی گره لنفی، هیپرپلازی بافت لنفاوی را نشان دادند، در حالی که در گروه شاهد هیچ‌گونه تغییر واکنشی مشاهده نشد. جدای از تغییرات هیپرپلاستیک، بافت‌های طحال و گره لنفی هیچ‌گونه تغییر هیستوپاتولوژیک قابل توجهی را نشان ندادند. ارزیابی بافت‌شناختی مقاطع ریزبینی بافت‌های ریه، کلیه، کبد و مغز استخوان در هر دو گروه، تغییر هیستوپاتولوژیک قابل توجهی را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که MS14 ممکن است موجب القاء تغییرات هیپرپلاستیک واکنشی در اندام‌های مهم سیستم ایمنی به ویژه در گره‌های لنفی شود و اثر سوء بر وزن بدن و اندیکس طحال حیوانات ندارد.

واژگان کلیدی: وزن بدن، اندیکس طحال، بافت شناسی، MS14، طحال، گره لنفی.

### مقدمه

که می‌توانند کاربردهای فراوانی داشته باشند، صورت گرفته است. ایمنومدولاتورها می‌توانند در درمان برخی بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های اتوایمیون، مفید باشند (۱، ۲). در این زمینه، ترکیبات گیاهی که نسبت به داروهای شیمیایی کم‌عارضه‌تر هستند، می‌توانند اولویت داشته باشند. MS14 یک فرآورده طبیعی با منشأ گیاهی - دریایی و برگرفته از تجارب دانشمندان ایرانی و طب سنتی ایران است که توسط گروه

در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوانی توسط محققین جهت یافتن مواد تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، یعنی ایمنومدولاتورها

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، گروه ایمنولوژی، رویا یارائی

(e-mail: ryaraee@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۵/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۱۱/۴

مقدار لازم در سرم فیزیولوژی حل گردید و طی ۵ روز متوالی به هر موش در گروه MS14، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از MS14 و به گروه شاهد همین مقدار سرم فیزیولوژی به وسیله لوله تغذیه کننده (فیدینگ تیوب) خوراندند شد.

بعد از پنج روز، ۲۴ ساعت بعد از آخرین تجویز، موش‌ها دوباره وزن شدند و سپس با توجه به قوانین کار با حیوان مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، موش‌ها به وسیله دی‌اتیل‌اتر در حجم زیاد ابتدا بیهوش و سپس کشته شدند. برای محاسبه درصد افزایش وزن از فرمول زیر استفاده شد:

درصد افزایش وزن = [(وزن ثانویه منهای وزن اولیه) ضربدر ۱۰۰] تقسیم بر وزن اولیه

بعد از باز کردن صفاق، طحال موش جدا و وزن شد. برای محاسبه ایندکس طحال از فرمول زیر استفاده گردید:

ایندکس طحال = وزن طحال تقسیم بر وزن ثانویه (۸، ۹)

به منظور مطالعات بافت‌شناختی بافت‌های مختلف شامل طحال، ریه، گره لنفی، کلیه، مغز استخوان و کبد جدا گردید و بطور جداگانه در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت و یکبار هم چهار روز بعد، محلول فیکس کننده تعویض گردید. این بافت‌ها به وسیله روش استاندارد پارافین آماده شدند و از آنها مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و به وسیله رنگ همتاکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. در نهایت، نمونه‌ها در اختیار پاتولوژیست قرار داده شد تا با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گیرند. نتایج حاصل از وزن بدن و ایندکس طحال توسط آزمون آماری t-test ارزیابی گردید و اختلافات مشاهده شده بین بافت‌های گروه‌های MS14 و شاهد ارزش‌گذاری و به وسیله آزمون دقیق فیشر مقایسه شدند.  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

تغییر وزنی حیوان و درصد افزایش آن بر حسب گروه‌ها در **Error! Reference source not found.** ارائه شده است و نشان می‌دهد که فرآورده MS14 در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و پنج روز تجویز تاثیر معنی‌داری بر وزن موش‌های دریافت کننده ندارد.

فارماکولوژی دانشکده پزشکی شاهد تهیه شده است. این فرآورده، حاوی ۹۰ درصد شاه میگو (King prawn) (از خانواده سخت پوستان)، ۵ درصد کرفس وحشی (Apium graveolens) و ۵ درصد هوفاریقون یا علف چای (Hypericum perforatum) می‌باشد (۳). نتایج مطالعات اولیه نشان می‌دهد که این فرآورده حتی در دوزهای بالا اثر توکسیکی ندارد و جزء مواد غیرسمی و خوراکی طبقه‌بندی می‌شود (۴). در مطالعات اولیه، این فرآورده نسبت به دو داروی شیمیایی متداول (متیل پردنیزولون و سدیم سالیسیلات) اثر ضد التهابی بهتری داشته است، البته نتایج آن هنوز چاپ نشده است. با این همه در کنار این کاهش التهاب و تعدیل ایمنی در برابر عفونت سیستمیک مانند سپسیس کاندیدیایی اثر محافظت‌کنندگی دارد (۵).

مطالعات نشان داده است که داروهای گیاهی نیز ممکن است مانند داروهای شیمیایی اثرات جانبی ناخواسته‌ای داشته باشند و به بافت‌های بدن صدمات جبران‌ناپذیری وارد نمایند. هرچند این عوارض در استفاده بیش از حد، بیشتر بروز می‌نمایند، ولی ارزیابی این اثرات جانبی بر روی مدل‌های حیوانی ضروری است و به شناسایی اثرات مخرب احتمالی آن در انسان کمک بزرگی می‌کند. به ویژه در مورد ایمونومدولاتورها، بررسی اثر آنها بر بافت‌های ایمنی ضروری است (۶). از رایج‌ترین روش‌های مطالعه بافت‌ها، آماده‌سازی برش‌های بافت‌شناسی به نحوی است که قابل مطالعه با میکروسکوپ نوری باشند (۷). به همین دلیل، در مطالعه حاضر با استفاده از مشاهدات میکروسکوپ نوری به بررسی اثر مصرف خوراکی فرآورده MS14 بر وزن بدن و اندیکس طحال و ساختار بافت‌هایی مانند طحال، گره لنفی، مغز استخوان (از اعضاء اصلی سیستم ایمنی) و ریه، کبد و کلیه در شرایط *invivo* در موش Balb/c پرداخته شد.

### مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. موش Balb/c ماده در گروه سنی ۶-۸ هفته از آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهیه گردید. موش‌ها به دقت وزن شدند و به طور تصادفی در دو گروه MS14 و شاهد (در هر گروه حداقل ۷ راس) تقسیم شدند. این موش‌ها تحت شرایط استاندارد آب و غذا و دما نگهداری می‌شدند.

پودر فرآورده MS14 با توجه به دوز مورد نظر که در این تست ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است، بر حسب وزن موش‌ها و به

شواهدی از تغییرات میکروسکوپی معرف مرگ سلولی (مثل هسته‌های پیکنوتیک و کاربورتیک) در گروه MS14 مشاهده شد؛ بدین ترتیب که از ۱۰ راس موش، ۸ موش دارای تغییرات میکروسکوپی معرف مرگ سلولی در گره لنفی خود بودند. در گروه شاهد، از ۷ راس موش بررسی شده، در گره لنفی هیچ موشی اثری از مرگ سلولی مشاهده نشد ( $p < 0/001$ ).

### بحث

تحقیق حاضر نشان داد که فرآورده MS14 در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر قابل مشاهده‌ای بر وزن و ایندکس طحال موش‌ها ندارد. در خصوص اثر MS14 بر بافت‌ها، بطور کلی فرآورده MS14 تأثیری بر بافت‌شناسی نرمال اندام‌های کلیه، کبد، ریه و مغز استخوان ندارد و در طحال و بویژه گره لنفی به غیر از هیپرپلازی واضح بافت‌های لنفاوی، این فرآورده بر ساختار کلی بافت تأثیری ندارد.

در روند معرفی یک ترکیب به عنوان یک دارو آزمایشات متعددی صورت می‌گیرد. از پارامترهای فیزیولوژیک مهم، وزن بدن است که چنانچه داروی مورد نظر بر وزن اثر نامطلوب داشته باشد، درباره مفید بودن دارو باید با تامل اظهار نظر نمود. از این رو، در بیشتر موارد در مراحل آزمایشگاهی تأثیر دارو بر وزن حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

در مطالعه‌ای Tian و همکارانش اثر گیاه Feiji Formula را بر سرطان ریه بررسی کرده و نشان دادند که این گیاه با وجود اثر ضد سرطانی بر خلاف داروی شیمیایی هم اثر خود بر وزن بدن موش اثری ندارد که نشان دهنده مزیت استفاده از داروهای گیاهی در درمان برخی بیماری‌هاست (۱۰). همچنین در مطالعه دیگری، Liang و همکارانش اثر چهار گیاه مختلف موجود در ترکیب Si-Wu-Tang بر پارامترهای مختلفی چون وزن بدن موش، ایندکس وزنی طحال و هماتوپوئز بررسی کردند و بیان نمودند که با تغییر اجزاء یک ترکیب گیاهی (حذف یک گیاه از بین چهار گیاه ترکیب فوق) می‌توان به نتایج متفاوتی رسید. این پژوهشگران پیشنهاد کردند که این اثرات متفاوت اجزاء تشکیل دهنده یک ترکیب گیاهی نکته مثبتی برای استفاده از آن است، زیرا می‌توان با تغییر ترکیب اجزاء، اثر نامطلوب پیش آمده را از بین برد (۱۱).

مطالعه حاج هاشمی و همکارانش بر روی این فرآورده نشان داد که تجویز روزانه MS14 به مدت ۲۸ روز با دوزهای ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث مرگ و میر حیوانات نمی‌شود و تأثیری بر وزن حیوانات ندارد که این امر

جدول ۲ نشان می‌دهد که وزن موش‌ها، وزن طحال و ایندکس آن در دو گروه مشابه بوده و اختلاف کم آنها به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ( $p < 0/3$ ).

**جدول ۱-** میزان افزایش وزن در دو گروه دریافت‌کننده MS14 و شاهد\*

گروه	میزان افزایش	درصد افزایش	p-value داخل گروه
شاهد	۰/۳۸۶	۱/۸	۰/۷
MS14	۰/۲۳۳	۰/۵	۰/۸

\* اختلاف بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ( $p = 0/9$ )

**جدول ۲-** وزن و ایندکس طحال موش در دو گروه دریافت‌کننده MS14 و شاهد

گروه شاهد	گروه MS14	p-value
وزن موش	۳۰/۵±۲/۸*	۰/۷
وزن طحال	۰/۱۵۶±۰/۰۳	۰/۳
ایندکس طحال	۰/۰۰۵±۰/۰۰۰۶	۰/۲

\* میانگین ± انحراف معیار

بررسی ریزبینی مقاطع تهیه شده از بافت کلیه موش‌های گروه شاهد و MS14 نشان داد که همگی دارای هیستولوژی طبیعی بوده و تفاوتی بین دو گروه مشاهده نشد. بافت کبد تمام موش‌های گروه شاهد و MS14 نیز دارای هیستولوژی طبیعی بود و تفاوتی بین دو گروه مشاهده نشد. بررسی ریزبینی مقاطع تهیه شده از بافت ریه و مغز استخوان موش‌های گروه شاهد و MS14 نشان داد که همگی دارای هیستولوژی طبیعی بودند. دو مورد تغییرات هیپرپلاستیک در بافت پوششی برونش‌ها در گروه MS14 مشاهده گردید.

بافت طحال تمام موش‌های گروه شاهد و MS14 در مجموع دارای هیستولوژی طبیعی بود، ولی حداقل در ۵۰ درصد موارد از لام‌های گروه MS14، هیپرپلازی بافت لنفاوی مشاهده شد، در حالی که در گروه شاهد در هیچ موردی این پدیده مشاهده نگردید ( $p < 0/05$ ). خونسازی خارج مغز استخوان در هر دو گروه مشاهده شد و از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

بررسی ریزبینی مقاطع تهیه شده از گره لنفی موش‌های گروه شاهد و MS14 نشان داد که همگی دارای هیستولوژی طبیعی بودند، ولی در ۹۰ درصد موارد از لام‌های گروه MS14 هیپرپلازی بافت‌های لنفاوی به وضوح قابل مشاهده بود ( $p < 0/001$ ). در کل، در گروه شاهد تراکم بافت‌های لنفاوی کم بود.

نتایج اثر MS14 بر بافت‌ها نشان می‌دهد که این فرآورده بر اغلب بافت‌ها مانند کبد، ریه، مغز استخوان و کلیه اثری ندارد و ساختار این بافت‌ها شکل طبیعی و سالم خود را دارند، ولی موجب هیپرپلازی در بافت‌های طحال و گره لنفی می‌شود. همان طور که می‌دانیم تکثیر سلول‌ها در بافت‌های ایمنی پدیده‌ای ناشی از افزایش فعالیت سیستم ایمنی به خصوص لنفوسیت‌هاست و این مشاهده می‌تواند حاکی از این افزایش فعالیت باشد. با توجه به مطالعه‌ای که به موازات این تحقیق صورت گرفته و در آن اثر فرآورده MS14 بر تولید سایتوکاین‌های IL-5, IL-10 لنفوسیت‌های طحال بررسی گردید و مشاهده شد که این فرآورده در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش این دو سایتوکاین می‌گردد و از آنجایی که این سایتوکاین‌ها توسط لنفوسیت‌های T تولید می‌شوند، می‌توان افزایش این دو را ناشی از افزایش تکثیر لنفوسیت‌های طحال دانست (۱۳) که با نتایج هیپرپلازی طحال هم‌خوانی دارد. از طرفی مشاهدات میکروسکوپی نشان دهنده تغییرات میکروسکوپی معرف مرگ سلولی (مثل هسته‌های پیکنوتیک و کارپورکتیک) در بافت گره لنفی است. پس با توجه به وجود هیپر پلازی در این بافت می‌توان گفت که MS14 با وجودی که باعث افزایش تعداد و تکثیر سلول‌ها در گره لنفی و طحال می‌شود، احتمالاً با کمک پدیده آپوپتوز از رشد کنترل نشده سلول‌ها نیز جلوگیری می‌کند.

نشان می‌دهد فرآورده MS14 باعث تغییر اشتها یا تغییر جدی در فرآیندهای گوارشی نمی‌شود (۴). به منظور تایید سمی نبودن این فرآورده در انسان، مطالعه سم‌شناسی بالینی فرآورده طبیعی MS14 در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس توسط ناصری و همکاران انجام گرفت. آنها مشاهده کردند که فرآورده طبیعی MS14 هیچ‌گونه تغییر سویی در علائم حیاتی، فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی و نشانه‌های عملکردی کبدی و کلیوی ایجاد نمی‌کند و در مجموع یافته‌های سم‌شناسی بالینی در انسان، در تأیید مطالعات سم‌شناسی حیوانی می‌باشد (۱۲). جهت اطمینان از اینکه نتایج بدست آمده محدود به دوز بکار رفته و تعداد روز تجویز است یا خیر، اثر این فرآورده در دوزهای مختلف (۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به مدت ۳، ۶ و ۱۰ روز) بر وزن و ایندکس طحال در موش بررسی گردید که نتایج کاملاً مشابهی بدست آمد. با توجه به نتایج فوق می‌توان به جرات بیان کرد که فرآورده MS14 هیچ‌گونه اثری بر وزن و ایندکس طحال موش‌ها ندارد. پارامتر وزن نسبتاً عمومی بوده و هم از نظر سلامت کلی حیوان و هم از نظر سیستم ایمنی مهم است. ایندکس وزنی طحال می‌تواند نشانه‌ای از فعالیت فوق‌العاده لنفوسیت‌ها و تکثیر آنها یا سایر فعالیت‌های مربوط به طحال باشد که معمولاً در شرایط تغییرات شدید و بخصوص افزایش فعالیت چشمگیر، قابل توجه خواهد بود. بنابراین بی‌اثر بودن این فرآورده بر وزن و ایندکس طحال مزیت قابل توجهی برای استفاده از آن در موارد انسانی محسوب می‌شود.

## REFERENCES

- Butter S, Heaken B, Herrlinges-Qariuia K. Arginin supplementation enhances mitogen-induced splenocytes proliferation but does not effect in vivo indicators of antigen-specific immunity in mice. *Nutr Immunol* 2007; 85: 1146-50.
- Leemol D, Girgia K. Immunomodulatory activity of withania sominifera. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 193-200.
- Tafreshi A.P, Ahmadi A, Ghaffarpur M, Mostsfavi H, Rezaeizadeh H, Minaie B, et al. An Iranian herbal-marine medicine, MS14, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis. *Phytother Res* 2008;22: 1-14.
- Hajhashemi V, Ghafghazi T, Ahmadi A. Investigation of subacute toxicity of MS14 natural drug in rat. *Daneshvar* 2004; 11: 11-14. [In Persian]
- Eghtedardoost M, Yaraee R, Ghazanfari T, Naseri M. The effect of MS14 on candidial sepsis in Balb/c mice. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2009; 14: 1-6. [In Persian]
- Mohajeri D, Mesgari Abbasi M, Delazar A, Doustar Y, Mousavi Gh, Amouoghli Tabrizi B. Histopathological study of subacute toxicity of Grocus L. (saffron) stigma total extract on liver and kidney tissues in the rat. *Pharmaceut Sci* 2009; 15: 115-24. [In Persian]
- Junqueira LC. Basic histology. Translator: Montazeri M. Tehran: Arjmand Publisher; 2003. p.20-25. [In Persian]
- Tao C, Dan L, Ya-ling F, Wei H. Screening of QHF formula for effective ingredients from Chinese herbs and its anti-hepatic cell cancer effect in combination with chemotherapy. *Chinese Med J* 2008; 121: 363-68. [In Persian]
- Donovan J, Brown P. In vivo assays for mouse lymphocyte function. In: Coligan JE, Bierer B, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, Coico R, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York, N.Y: John Wiley and Sons; 2001.

10. Tian JH, Shi ZM, Zhou ZY, Huang YS, Wang L. Effects of Feiji Formula on lung cancer metastasis in mice. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2008; 6: 827-29.
11. Liang QD, Gao Y, Tan HL, Guo P, Li YF, Zhou Z, et al. Effects of four Si-Wu-Tang's constituents and their combination on irradiated mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1378-82.
12. Naseri M, Ahmadi A, Ghareghozli K, Nabavi M, Faghieh-zade S, Ashtarian N. Clinical and toxicological evaluation of MS14 natural product in patients with multiple sclerosis. *Daneshvar* 2007; 68: 59-64. [In Persian]
13. Yaraee R, Ghazanfari T, Naseri M, Jamali D. The effect of MS14 on TNF $\alpha$ , IL-5, INF $\gamma$  cytokines in balb/c. 9<sup>th</sup> International Congress of Asthma, Allergy and Immunology. Tehran, Iran: Tehran Medical University; 2008.