تحقیقی

اثر عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* بر شاخص‌های مورفومتریک و هیستوپاتولوژیک اندام‌های لنفاوی موش سوری

دکتر جواد صادقی نژاد[۱]، دکتر فاطمه محمودی کردی*[۲]، دکتر حسین لیمویی[۳]، سعدی رستمی[٤]

۱- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران. ۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.
۳- دکتری تخصصی علوم تشریحی دامپزشکی. ٤- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

چکیده

زمینه و هدف : *اثر گیاه لیسیوم باربارم (Lycium barbarum L.) در افزایش قدرت ایمنی گزارش شده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (Lycium ruthenicum L.) بر شاخص‌های مورفومتریک و هیستوپاتولوژیک اندام‌های لنفاوی موش سوری انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی ۳٦ سر موش سوری از نژاد BALB/c به صورت تصادفی در شش گروه ٦ تایی کنترل و تیمار قرار گرفتند. عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم در دوزهای ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ٤۰۰ و ۸۰۰ mg/kg/bw طی ۲۱ روز برای گروه‌های تیمار گاواژ گردید. گروه کنترل ۱۰۰ mg/kg/bw سرم فیزیولوژی را به روش گاواژ دریافت نمودند. پس از مدت تیمار، افزایش نسبی وزن بدن، تغییرات مورفومتری، هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی تیموس، عقده لنفاوی و طحال بررسی شد.*

یافته ها : *تجویز این عصاره در دوزهای ۵۰ mg/kg/bw و ۱۰۰ اثری بر وزن موش‌ها نداشت؛ اما در دوزهای بالاتر سبب کاهش وزن بدن گردید (P<۰/۰۵). ایندکس تیموس در دوز ۸۰۰ mg/kg/bw نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج هیستومورفومتریک تیموس نشان داد ضخامت بخش مرکزی در دوزهای پایین به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما در دوزهای بالاتر تفاوتی با گروه کنترل مشاهده نگردید. ضخامت کپسول در عقده لنفاوی و طحال در دوز ۸۰۰ mg/kg/bw نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). با توجه به یافته‌های هیستوپاتولوژیکی، دوزهای ۵۰ mg/kg/bw ، ۱۰۰ و ۲۰۰ عصاره این گیاه بر اندام‌های لنفاوی باعث تحریک و ارتشاح سلول‌های ایمنی و افزایش خونسازی شد؛ اما در دوزهای ۸۰۰ mg/kg/bw و ٤۰۰ سبب فیبروز کپسول، دژنراسیون فولیکول‌ها و آپوپتوز در سلول‌های داربست سلولی و نیز آسیب در اندام‌های لنفاوی این گروه‌ها گردید.*

نتیجه‌گیری : *دوزهای ٤۰۰ mg/kg/bw و ۸۰۰ از عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک اندام‌های لنفاوی موش آزمایشگاهی می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *لیسیوم روسنیکوم ، هیستومورفومتری ، هیستوپاتولوژی ، تیموس، عقده لنفاوی ، طحال*

* نویسنده مسؤول : دکتر فاطمه محمودی کردی ، پست الکترونیکی ac.mahmoodi@azaruniv.ac.ir
نشانی : تبریز، ۳۵کیلومتری جاده تبریز – مراغه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، کدپستی ۵۳۷۵۱۷۱۳۷۹ ، تلفن ۳٤۳۲۷۵۰۰-۰٤۱، ۳٤۳۲۷۵٤۱
وصول مقاله : ۱۳۹۳/٤/۲٤ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۳/۱۰/٦ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

مقدمه

جنس لیسیوم از تیره سیب‌زمینی و طایفه لیسیه با بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی عمدتاً در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان (جنوب آفریقا، آمریکای جنوبی، نواحی معتدل اروپا و آسیا) پراکنش دارد (۱). این جنس در ایران ۵ گونه گیاه درختچه‌ای به‌نام‌های دیو خار مینایی، دیو خار ترکمنی، دیو خار بلوچستانی، دیو خار خراسانی و گرگ تیغ دارد (۲). ترکیبات مختلفی نظیر اسیدهگزادکانوئیک، اسید لینولئیک، بتا-المنس، اسید میرستیک و اتیل هگزادکانوآت در عصاره آبی میوه این جنس استخراج و شناسایی شده است (۳). گیاهان جنس لیسیوم به‌ویژه *لیسیوم باربارم* (*Lycium barbarum*) در طب سنتی بسیار شناخته شده‌اند و اثرات آن در افزایش قدرت ایمنی در مقالات مختلف گزارش شده است. افزایش تکثیر لنفوسیت‌های طحال، افزایش بیان mRNA اینترلوکین-۲ متعاقب تجویز کمپلکس پلی ساکاریدی-پروتئینی *لیسیوم باربارم* در مدل حیوانی گزارش شده است (۴). عصاره آبی و اتانولی میوه‌های *لیسیوم باربارم* فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت عصاره دارند (۵). این گیاه از طریق بهبود سیستم ایمنی، دارای اثر ضدتوموری است (۶). اثر ضدتوموری *لیسیوم باربارم* به

www.SID.ir
Archive of SID

دلیل اثر آن بر افزایش سلول‌های T (+CD4 و +CD8) گزارش شده است (۷). پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از *لیسیوم باربارم*، عملکرد سلول‌های T، سلول‌های B، لنفوسیت‌های T کشنده، سلول‌های کشنده طبیعی، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها را تنظیم می‌کند و در مجموع عملکرد سیستم ایمنی را بهبود بخشیده و اثرات سمی ناشی از شیمی‌درمانی را می‌کاهد (۸). *لیسیوم باربارم* عوامل رونویسی NFAT و AP-1 را فعال کرده و باعث القای رونویسی از ژن‌های IFN-γ و IL-2 و ترشح این پروتئین‌ها می‌شود (۹). *لیسیوم باربارم* با تنظیم بیان مولکول‌های مرتبط با آپوپتوز، نقش معکوسی در مقاومت سلول‌های T مسن، به آپوپتوز دارد (۱۰). همچنین اثرات ضدمیکروبی و ضدقارچی (۱۱و۱۲) و ضددیابتی (۱۳و۱۴) آن گزارش شده است. با این وجود مکانیسم‌های دقیق فارماکولوژیکی و نیز سم‌شناسی این گیاه مشخص نبوده و مطالعات تکمیلی در این خصوص پیشنهاد شده است (۱۵).

با توجه به خواص درمانی و مصارف متعدد گیاهان این جنس و فقدان سابقه پژوهش درباره اثرات بیولوژیک گونه‌های موجود در کشورمان؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* بر شاخص های مورفومتریک و هیستوپاتولوژیک اندام‌های لنفاوی موش سوری انجام شد.

روش بررسی

جمع‌آوری گیاه *لیسیوم روسنیکوم* و عصاره‌گیری

گیاه *لیسیوم روسنیکوم* با شماره هرباریمی ۱۷۷۲ (FAR)، از شهرستان بوکان و در اطراف سیمینه رود جمع‌آوری شد. میوه‌های رسیده و سالم گیاه در محل برداشت شد و در محیط آزمایشگاه به دور از نور خورشید و در دمای معمولی آزمایشگاه خشک و با آسیاب برقی پودر گردید. برای تهیه عصاره آبی میوه *لیسیوم روسنیکوم*، میوه پودر شده در آب خیسانده شد و سپس تحت رفلاکس به مدت چهار ساعت جوشانده شد. محلول حاصله از کاغذ صافی عبور داده شد و عصاره آبی (قرمز رنگ) به‌دست آمد. برای حذف آب از سیستم تقطیر در خلاء چرخان از دستگاه روتاری متصل به پمپ خلاء در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد و ماده جامد قیری شکلی به‌دست آمد. برای حذف کامل آب از روش Freeze Drying به مدت ۴۸ ساعت استفاده گردید.

حیوانات و تجویز عصاره

این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش بالغ نر از نژاد BALB/c با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم خریداری شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام شد.

حیوانات در شرایط استاندارد با دمای مناسب، چرخه تاریکی – روشنایی ۱۲ ساعته، آب و غذای کافی نگهداری شدند و صورت تصادفی در شش گروه ۶ تایی کنترل و تیمار قرار گرفتند.

در مطالعه Li و همکاران در رابطه با تعیین اثر گیاه *لیسیوم باربارم* روی استرس اکسیداتیو از دوزهای ۲۰۰، ۳۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی ۳۰ روز تیمار استفاده شده است (۱۶). در مطالعه Gong و همکاران برای تعیین اثر *لیسیوم باربارم* در موش های مواجهه یافته با اشعه ایکس و شیمی درمانی، از دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده شده است (۱۷). لذا در مطالعه حاضر محدوده دوزهای بیشتری شامل ۵۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در نظر گرفته شد.

گروه کنترل ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سرم فیزیولوژی را طی ۲۱ روز به صورت گاواژ دریافت نمود. گروه های تجربی اول تا پنجم به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* حل شده در سرم فیزیولوژی را طی ۲۱ روز از طریق گاواژ دریافت نمودند.

نمونه‌گیری اندام‌های لنفاوی و مورفومتری

در پایان دوره آزمایش و توزین مجدد، حیوانات با کلروفرم بیهوش و طحال، تیموس و عقده لنفاوی آگزیلاری از بدن حیوانات خارج گردید. ابعاد اندام‌های طحال، تیموس و گره لنفی توسط کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس وزن اندام‌های طحال و تیموس با ترازوی دیجیتالی (دقت ۰/۰۱ گرم) محاسبه گردید. برای محاسبه میزان افزایش وزن، وزن ثانویه منهای وزن اولیه و تقسیم بر وزن اولیه شد. ایندکس اندام‌ها نیز با تقسیم وزن اندام بر وزن ثانویه تعیین گردید (۱۸و۱۹).

تهیه مقاطع بافتی و مطالعات هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی

اندام‌های لنفاوی حیوانات در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای ثبوت غوطه‌ور شدند. پس از مدت زمان کافی برای ثبوت، مراحل معمول به منظور رنگ‌آمیزی بافت‌ها به روش هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. سپس مقاطع بافتی توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه بافت‌شناسی قرار گرفت و تصاویر میکروسکوپی توسط دوربین متصل به میکروسکوپ اخذ شد.

برای انجام مطالعات هیستومورفومتریک اندام‌های مورد مطالعه، از نرم‌افزار AxioVision (Carl Zeiss) استفاده شد. معیارهای هیستومورفومتریک مربوط به گره لنفاوی شامل اندازه‌گیری ضخامت کپسول، قطر فولیکول، قطر ناحیه زایگر و ضخامت مانتل بود. در رابطه با طحال ضخامت کپسول، قطر فولیکول‌های پولپ سفید، قطر ناحیه زایگر و ضخامت مانتل اندازه‌گیری شد. ضخامت بخش قشری و مرکزی لوبول‌های تیموس نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. از هر اندام لنفاوی ۸ مقطع و از هر مقطع ۵ میدان دید به‌طور تصادفی برای مطالعه معیارهای هیستومورفومتریک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

نتایج مورفومتریک مربوط به تغییرات نسبی وزن بدن، ایندکس

www.SID.ir

جدول ۱ : مقایسه میانگین و انحراف معیار افزایش نسبی وزن بدن، ایندکس طحال و ایندکس تیموس در موش‌های سوری گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم

گروه‌ها		افزایش نسبی وزن	ایندکس طحال	ایندکس تیموس
کنترل		۰/۱۳۹± ۰/۰۳۰c	۰/۰۰۵۷± ۰/۰۰۱۸a	۰/۰۰۱۰± ۰/۰۰۰۵a
دریافت کننده عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (mg/kg/bw)	۵۰	۰/۱۰۳± ۰/۰۱۲bc*	۰/۰۰۶۶± ۰/۰۰۲۰a	۰/۰۰۱۳± ۰/۰۰۰۴ab
	۱۰۰	۰/۰۷۸± ۰/۰۱۷abc	۰/۰۰۵۳± ۰/۰۰۱۶a	۰/۰۰۱۴± ۰/۰۰۰۶ab
	۲۰۰	۰/۰۶۵± ۰/۰۰۷ab	۰/۰۰۶۵± ۰/۰۰۲۲a	۰/۰۰۱۵± ۰/۰۰۰۶ab
	۴۰۰	۰/۰۴۷± ۰/۰۰۴ab	۰/۰۰۶۰± ۰/۰۰۱۸a	۰/۰۰۱۸± ۰/۰۰۰۴ab
	۸۰۰	۰/۰۴۸± ۰/۰۱۵a	۰/۰۰۶۸± ۰/۰۰۱۲a	۰/۰۰۲۳± ۰/۰۰۰۵b

تعداد موش‌های هر گروه : ۶ سر * حروف غیریکسان نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین داده‌های هم ستون است.

جدول ۲ : مقایسه میانگین و انحراف معیار داده‌های هیستومورفومتریک تیموس در موش‌های سوری گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم

گروه‌ها		ضخامت کپسول (µm)	ضخامت بخش قشری (µm)	قطر بخش مرکزی (µm)
کنترل		۲۱/۶± ۶/۷a	۳۵۲/۲± ۲۰/۲bc	۴۰۴/۳± ۳۲/۱a
دریافت کننده عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (mg/kg/bw)	۵۰	۱۴/۷± ۰/۴a *	۳۷۸/۹± ۱۵/۹c	۵۵۷/۹± ۲۲/۴b
	۱۰۰	۱۲/۱± ۰/۵a	۲۹۱/۵± ۲۲/۷ab	۵۳۰/۵± ۳۱/۸b
	۲۰۰	۱۱/۷± ۰/۶a	۳۴۶/۳±۸/۹abc	۵۲۱/۲± ۱۴/۹b
	۴۰۰	۱۵/۶± ۵/۴a	۲۸۰/۲± ۱۵/۳a	۳۹۹/۰± ۱۴/۹a
	۸۰۰	۱۷/۲± ۱/۱a	۴۷۶/۷± ۲۰/۸d	۴۱۰/۰±۸/۵a

تعداد موش‌های هر گروه : ۶ سر * حروف غیریکسان نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین داده‌های هم ستون است.

جدول ۳ : مقایسه میانگین و انحراف معیار داده‌های هیستومورفومتریک گره لنفی در موش‌های سوری گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم

گروه‌ها		ضخامت کپسول (µm)	قطر ناحیه زایگر (µm)	ضخامت مانتل (µm)	قطر فولیکول (µm)
کنترل		۹/۴± ۳/۲a	۲۴۴/۶± ۱۹/۳ab	۵۲/۲± ۱۳/۲a	۳۶۸/۱± ۱۷/۷ab
دریافت کننده عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (mg/kg/bw)	۵۰	۱۰/۳± ۲/۵a*	۲۱۱/۴± ۱۹/۶a	۴۶/۱± ۱۴/۲a	۳۳۴/۷± ۱۶/۲a
	۱۰۰	۷/۸± ۱/۱a	۲۳۲/۰± ۱۹/۰a	۴۷/۱± ۹/۴a	۳۵۹/۸± ۷/۰a
	۲۰۰	۲۲/۱± ۲/۳b	۲۹۹/۷± ۲۰/۳b	۴۸/۵± ۴/۱a	۴۰۴/۱± ۱۸/۹bc
	۴۰۰	۹/۶± ۰/۸a	۲۱۵/۰± ۱۴/۴a	۵۱/۵± ۸/۲a	۳۴۱/۴± ۷/۹a
	۸۰۰	۲۲/۹± ۳/۲b	۲۶۸/۳± ۳۵/۹ab	۵۸/۲± ۵/۷a	۴۱۱/۹± ۳۸/۸bc

تعداد موش‌های هر گروه : ۶ سر * حروف غیریکسان نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین داده‌های هم ستون است.

جدول ۴ : مقایسه میانگین و انحراف معیار داده‌های هیستومورفومتریک طحال در موش‌های سوری گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم

گروه‌ها		ضخامت کپسول (µm)	قطر ناحیه زایگر (µm)	ضخامت مانتل (µm)	قطر فولیکول (µm)
کنترل		۹/۰± ۱/۰a	۳۰۵/۲± ۲۰/۹d	۹۱/۶۸± ۱۴/۹a	۴۸۲/۸± ۳/۲ab
دریافت کننده عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (mg/kg/bw)	۵۰	۸/۱± ۲/۲a *	۱۷۳/۸± ۷/۷a	۱۱۰/۱± ۱۱/۹a	۴۱۴/۱± ۱۱/۶ab
	۱۰۰	۱۱/۵± ۱/۰ab	۲۳۸/۲± ۶/۷c	۱۵۴/۴± ۱۳/۴a	۵۱۴/۳± ۱۵/۶ab
	۲۰۰	۸/۶± ۱/۶a	۱۶۹/۱± ۱۸/۵ab	۹۸/۲± ۱۳/۸a	۳۵۶/۹± ۲۲/۰a
	۴۰۰	۱۳/۲± ۱/۸ab	۲۰۴/۰± ۱۷/۶abc	۱۸۱/۴± ۱۹/۵a	۵۷۲/۸± ۱۳/۴b
	۸۰۰	۱۵/۹± ۳/۸b	۲۳۱/۴± ۱۲/۱bc	۱۱۴/۰± ۱۴/۸a	۴۸۱/۵± ۲۱/۵ab

تعداد موش‌های هر گروه : ۶ سر * حروف غیریکسان نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین داده‌های هم ستون است.

طحال و ایندکس تیموس و نیز نتایج هیستومورفومتریک مربوط به اندام‌های طحال، گره لنفی و تیموس با استفاده از نرم‌افزار SPSS-18 و بر اساس روش‌های آماری آزمون انحراف معیار و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

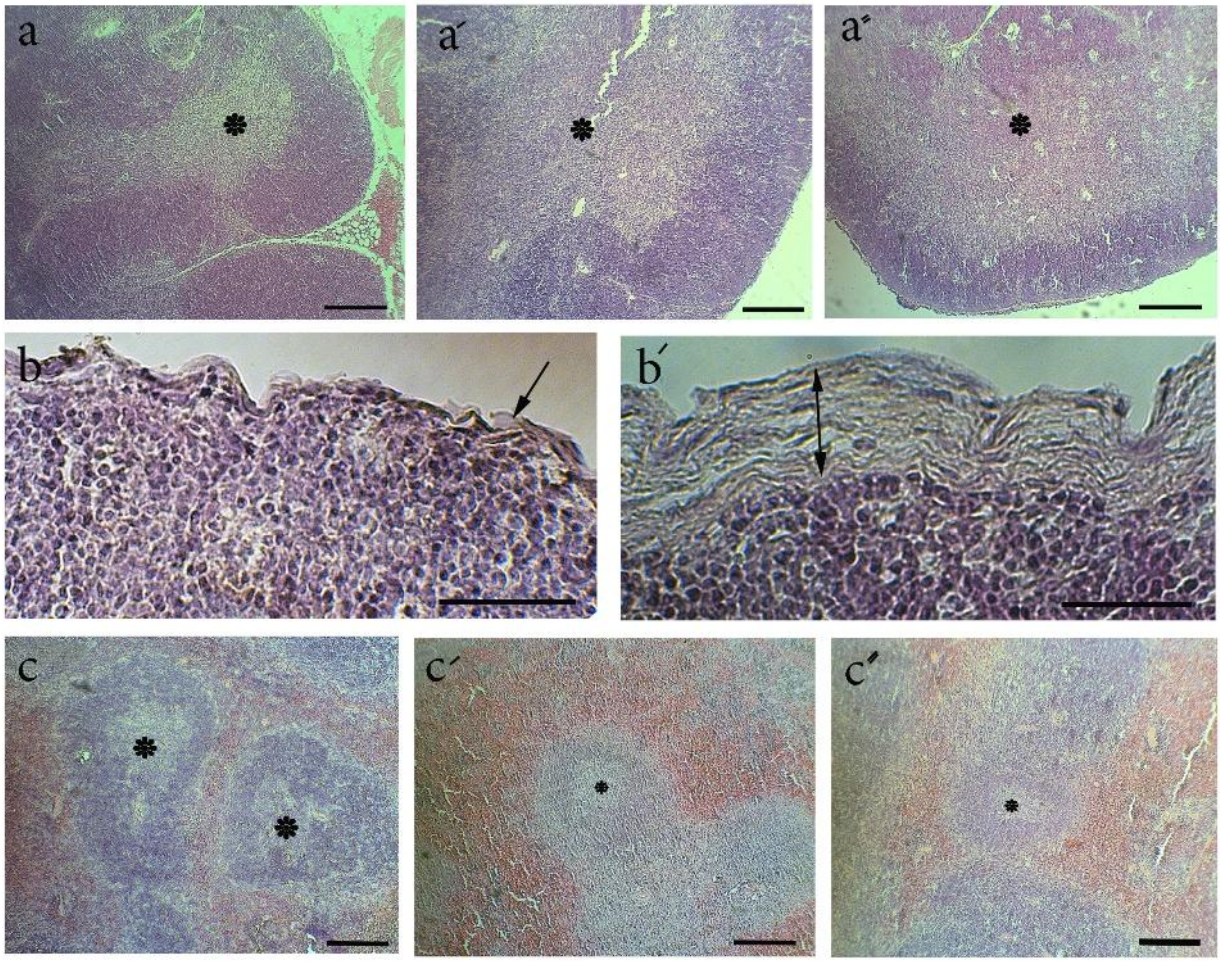
افزایش نسبی وزن موش‌ها، ایندکس طحال و ایندکس تیموس گروه‌های مورد مطالعه در جدول یک آمده است.

یافته‌های بیومتری نشان داد تجویز عصاره *لیسیوم روسنیکوم* در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اثری بر وزن موش‌های مورد مطالعه نداشت؛ اما در سایر دوزها منجر به کاهش وزن گردید ($P<0/05$). در ایندکس طحال گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد. ایندکس تیموس گروه دریافت کننده ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری داشت ($P<0/05$).

با توجه به نتایج هیستومورفومتریک تیموس موش های مورد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ : تصاویر اندام‌های لنفاوی موش‌های گروه کنترل و تیمار شده با ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم

(a-a') : مقاطع بافتی تیموس (اندازه بارها : ۲۰۰ میکرومتر، رنگ‌آمیزی H&E). ضخامت بخش مرکزی تیموس مشخص شده با علامت ستاره در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (a'-að) نسبت به گروه کنترل (a) افزایش یافت. (b-b') : مقاطع بافتی گره لنفاوی (اندازه بارها : ۵۰ میکرومتر، رنگ‌آمیزی H&E). ضخامت کپسول گره‌های لنفاوی گروه دریافت کننده ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (b') نسبت به گروه کنترل (b) افزایش یافت. (c-c') : مقاطع بافتی طحال (اندازه بارها : ۲۰۰ میکرومتر، رنگ‌آمیزی H&E). قطر ناحیه زایگر در پولپ سفید گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی میوه گیاه لیسیوم روسنیکوم (c'-cð) نسبت به گروه کنترل (c) کاهش یافت.

مطالعه (جدول ۲)، ضخامت کپسول در گروه‌های تجربی تفاوت آماری معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد؛ اما ضخامت بخش قشری در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

ضخامت بخش مرکزی گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (شکل a-a′-۱).

با توجه به مطالعه هیستوپاتولوژی تیموس در گروه‌های دریافت کننده ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هیچگونه تغییر بافتی و پاتولوژیکی مشاهده نشد؛ اما در گروه‌های دریافت کننده ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره تغییر بافتی به صورت فیبروز در کپسول تیموس مشاهده شد. همچنین در گروه تیمار با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن آپوپتوز در سلول‌های اپی‌رتیکولر بخش مرکزی (مدولا) مشاهده گردید.

با توجه به مطالعه هیستومورفومتریک عقده لنفاوی (جدول ۳) ضخامت کپسول در گروه دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)؛ اما در سایر پارامترهای هیستومورفومتریک تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های تجربی

www.SID.ir

با گروه کنترل مشاهده نشد (شکل b-b″-۱).

در مطالعه میکروسکوپی عقده لنفاوی در بعضی از نمونه‌های گروه‌های دریافت کننده ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره بر اثر تورم فولیکول‌های اولیه، فولیکول‌های ثانویه (دارای بخش زایگر در مرکز و بخش تیره‌ای از سلول‌های غیرفعال در حاشیه) شکل گرفتند. این درحالی است که در گروه‌های با دوزهای بالاتر در فولیکول‌های لنفی بخش کورتکس فاصله بین فولیکول‌ها بیشتر از حد طبیعی بود و فولیکول‌های ثانویه بسیار زیادی تشکیل گردید و بعضی از فولیکول‌ها نیز دژنره شدند. در قسمت حاشیه‌ای و نیز در قسمت مرکزی آسیب سلولی مشاهده شد. در طناب‌های لنفاوی مرکزی نیز درجات مختلفی از آپوپتوز دیده شد. این سلول‌ها به‌صورت انفرادی در میدان‌های دید میکروسکوپی مورد مطالعه مشاهده شدند که مشخصه اصلی آنها هسته پیگنوزه و سیتوپلاسم ائوزینوفیلی شدید بود.

با توجه به مطالعه هیستومورفومتری طحال در گروه‌های مختلف (جدول ۴) ضخامت کپسول در گروه ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). قطر ناحیه زایگر در پولپ سفید نیز در تمامی گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)؛ اما قطر فولیکول‌ها و ضخامت مانتل در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (شکل c-c′-۱).

با توجه به مطالعه بافت‌شناسی طحال در گروه‌های دریافت کننده دوزهای پایین از عصاره *لیسیوم روسنیکوم*، پولپ سفید و پولپ قرمز طحال حاوی تعدادی سلول های غول‌پیکر مشاهده شد؛ اما تغییرات پاتولوژیک در بافت‌ها مشاهده نگردید. در دوزهای بالا به‌تدریج تعداد سلول‌های غول‌پیکر قابل کاهش و آسیب بافتی وارد شده به طحال ظاهر گردید. به‌طوری که در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره در بزرگ‌نمایی کمتر نیز قابل مشاهده بود و از هم‌گسیختگی بافتی وجود داشت. در مطالعه با بزرگ‌نمایی بالاتر، آپوپتوز در سلول‌های قسمت داربست سلولی مشاهده شد. هسته‌های پیکنوتیک در مورد سلول‌های لنفوئیدی دیده شد که مرگ خودبه‌خودی این سلول‌ها را نشان داد. در مورد کپسول طحالی تغییر بافتی به‌صورت ضخیم‌شدگی بافت همبندی کپسول طحالی بر اثر فیبروز بافتی مشاهده شد. همچنین هموراژی و فیبروز به‌صورت محدود در بعضی از قسمت‌های بافت طحال وجود داشت.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تجویز عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* در دوزهای پایین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تغییر آماری معنی‌داری در وزن بدن موش های سوری ایجاد نمی‌کند؛ اما می‌تواند به‌طور معنی‌داری مانع از افزایش نسبی وزن بدن در گروه‌های تیمار با دوزهای بالا در مقایسه با گروه کنترل شود که با مطالعه Zhang و همکاران در ارتباط با کاهش وزن موش‌های شیرخوار در اثر تجویز *لیسیوم باربارروم* همخوانی دارد (۲۰). Zhang و همکاران وجود ۶ مونوساکارید مختلف در این گیاه را که منجر به افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی و افزایش محتوی روی و آهن در بدن می‌شود را علت اصلی در این رابطه دانستند (۲۰). از طرفی مطالعاتی کاهش وزن بدن را یکی از اثرات سمی داروها (۲۱) و نیز گیاهان سمی (۲۲) ذکر کرده‌اند که علت اصلی آن را کم‌اشتهایی و عدم استفاده کافی از مواد غذایی توسط حیوان ذکر کرده‌اند.

در مطالعه حاضر، عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* موجب افزایش وزن تیموس در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل گردید. با توجه به این که تیموس محل تمایز و بلوغ لنفوسیت‌های T است؛ این تغییرات نشان‌دهنده تحریک شدن ماکروسکوپیکی این اندام است. در بررسی هیستوپاتولوژیک تیموس، گروه‌های دریافت کننده ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره نه تنها هیچ نوع عارضه پاتولوژیکی نداشتند؛ بلکه افزایش اندازه بخش مرکزی در بررسی هیستوموفومتری تیموس نشانگر افزایش فعالیت این اندام تحت تاثیر عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* است که با مطالعات ضدویروسی و ضدسرطانی انجام شده روی گیاه *لیسیوم باربارروم* (۵و۸و۹و۲۳) همراستا است. این در حالی است که در بررسی میکروسکوپیک تیموس در دوزهای سمی (گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) فیبروز کپسول تیموس و نیز مواردی از آپوپتوز در بخش مرکزی فولیکول‌های لنفاوی این اندام تشخیص داده شد.

در مورد گره لنفاوی با توجه به این نکته که گره لنفی موش سوری بسیار کوچک و ظریف بوده و عملاً بررسی مورفومتریک این اندام با توجه به وزن ناچیز آن با خطا مواجه می‌شود؛ مطالعه به‌صورت میکروسکوپیک و هیستومتریک انجام شد. مطالعه هیستوپاتولوژیک گره لنفی نشان داد که درجات مختلفی از فیبروز کپسول، آپوپتوز سلول‌های داربست و نیز تشکیل فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های تیمار دیده می‌شود؛ ولی تشکیل فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در حد تحریک مثبت این اندام تلقی شد و این دوز از عصاره توانست به خوبی این اندام لنفاوی را تحریک نماید. دوزهای بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث ایجاد اثرات دژنراتیو و پاتولوژیک در این اندام گردید. چنانچه در مطالعات

Archive of SID
www.SID.ir

هیستومورفومتریک ضخامت کپسول گره لنفی در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. گره‌های لنفاوی محل تجمع لنفوسیت‌های T و B هستند و نقش حیاتی این اندام در دفاع اختصاصی بدن بیش از پیش مشخص می گردد؛ همچنین در مسیر متاستاز بافت‌های سرطانی و نئوپلاستیک هستند. لذا مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* تحریک مناسبی را در گره‌های لنفی ایجاد نمود و توانست در مبارزه با سلول‌های سرطانی و عوامل میکروبی موثر باشد که با مطالعات انجام شده در زمینه گیاه *لیسیوم باربارروم* و دیگر واریته‌های چینی آن همخوانی داشت (۷و۱۱و۲۴).

بررسی اثر عصاره آبی گیاه *لیسیوم روسنیکوم* روی طحال از لحاظ مورفومتریک و ایندکس طحالی، اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل نشان نداد. البته به احتمال زیاد این اختلاف غیرمعنی‌دار به خاطر اندازه و وزن متغیر طحال در اکثر پستانداران است که در بین موجودات یک گونه نیز می‌تواند متغیر باشد. Silva و همکاران تغییر در وزن طحال را به دلیل تغییر در تراکم سلول‌ها دانسته‌اند (۲۵). در مطالعه هیستولوژیک و هیستوپاتولوژیک طحال، در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره هیچ عارضه پاتولوژیکی مشاهده نشد. همچنین تشکیل فولیکول ثانویه و افزایش میزان خونسازی که با افزایش مگاکاریوسیت‌ها تایید گردید؛ حاکی از اثر تحریک کننده عصاره آبی این گیاه در این دوزها در طحال موش سوری بود که با مطالعه انجام شده روی *لیسیوم باربارروم* در یک راستا قرار دارد (۹). در بررسی‌های هیستومورفومتریک قطر مرکز زایشی پولپ سفید در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری داشت. در مطالعه Inouye و همکاران کاهش در اندازه مرکز زایشی فولیکول‌ها در اثر مصرف برخی مواد ناشی از بازدارندگی تکثیر سلول‌ها گزارش شد. همچنین مشخص شد که آپوپتوزی در این ناحیه انجام نگرفته و این بازدارندگی در اثر پاسخ ایمنی اولیه و پاسخ به همان آنتی‌ژن در طولانی مدت بوده است (۲۶). با این وجود ارزیابی قطر فولیکول‌ها در مطالعه هیستومورفومتریک طحال در مطالعه حاضر نشان داد که اندازه فولیکول‌ها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری ندارد. این در حالی است که تغییر در اندازه و تعداد فولیکول‌های لنفاوی طحال جزء اثرات پاتولوژیک مواد مختلف سمی اشاره شده است (۲۷و۲۸). مقادیر بیش از ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره این گیاه اثرات پاتولوژیک را به‌صورت فیبروز کپسول، آسیب بافتی به‌صورت نکروز و هسته‌های پیکنوتیک و نیز افزایش شدید آپوپتوز را در طحال نشان داد که به ترتیب دوزهای بالاتر عوارض پاتولوژیکی شدیدتری را نشان دادند.

برای بررسی دقیق‌تر اثرات عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* بر اندام‌های لنفاوی، مطالعات هیستوپاتولوژیکی با رنگ آمیزی‌های اختصاصی و ایمنوهیستوشیمی و نیز میکروسکوپ الکترونی پیشنهاد می گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره آبی میوه گیاه *لیسیوم روسنیکوم* در موش های سوری نژاد BALB/c در دوزهای مختلف باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک، هیستولوژیک و پاتولوژیک در اندام‌های لنفاوی می گردد. مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده از اندام‌های لنفاوی اثر مثبت دوزهای پایین عصاره این گیاه بر اندام‌های لنفاوی را به صورت تحریک و ارتشاح سلول‌های ایمنی و افزایش خونسازی نشان داد. این درحالی است که دو مورد تلفات در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره و نیز با در نظرگرفتن شاخص‌های مورفومتریک و هیستومورفومتریک در سایر موش‌های این گروه‌ها، این مقدار از عصاره را به عنوان یک ماده سمی مطرح نمود و از نظر پاتولوژیکی نیز بیشترین آسیب در اندام‌های لنفاوی این گروه‌ها ملاحظه شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای سعدی رستمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بود و با حمایت مالی معاونت پژوهشی آن دانشگاه به انجام رسید. بدین‌وسیله به‌خاطر تامین بودجه تحقیق، از آن معاونت محترم تشکر می‌نماییم.

References

1. Azadi Chegini N, Nazeri V, Shoushtari AH, Kazempour Osaloo Sh. Biogeography of Lycium L. (Solanaceae) and phylogeny of old world Taxa based on Sequences of nrDNA (ITS) and cpDNA (trnL-F). Iran biol J. 2011; 24(1): 43-53.

2. Mozaffarian V. [Dictionary of Iranian plants names]. Tehran: Farhange-Moaser Press. 1996; p: 331. [Persian]

3. Altintas A, Kosar M, Kirimer N, Baser KHC, Demirci B. Composition of the essential oils ofLycium barbarum and L. ruthenicumfruits. chemistry of natural compounds. 2006; 42(1):24-25. doi:10.1186/s12870-014-0269-4.

4. Gan L, Zhangb SH, Yanga XL, Xuc HB. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide–protein complex from Lycium barbarum. Int Immunopharmacol. 2004; 4(4):563-9.

5. Wu SJ, Ng LT, Lin CC. Antioxidant activities of some common ingredients of traditional chinese medicine, Angelica sinensis, Lycium barbarum and Poria cocos. Phytother Res. 2004; 18(12):

www.SID.ir

1008-12.

6. Wu H, Guo H, Zhao R. Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. Yakugaku Zasshi. 2006 May; 126(5):365-71.

7. He YL, Ying Y, Xu YL, Su JF, Luo H, Wang HF. [Effects of Lycium barbarum polysaccharide on tumor microenvironment T-lymphocyte subsets and dendritic cells in H22-bearing mice]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2005 Sep; 3(5):374-7. [Article in Chinese]

8. Zhu J, Zhao LH, Zhao XP, Chen Z. Lycium barbarum polysaccharides regulate phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. Cell Biol Int. 2007 Jun; 31(6):615-9.

9. Du G, Liu L, Fang J. Experimental study on the enhancement of murine splenic lymphocyte proliferation by Lycium barbarumglycopeptide. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2004; 24(5):518-20, 527.

10. Chen Z, Kwong Huat Tan B, Chan SH. Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum L. Int Immunopharmacol. 2008 Dec 10;8(12):1663-71. doi: 10.1016/j.intimp.2008.07.019.

11. Lee DG, Jung HJ, Woo ER. Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3alpha-O-beta-D-glucopyranoside isolated from the root bark of Lyciumchinense Miller against human pathogenic microorganisms. Arch Pharm Res. 2005 Sep;28(9):1031-6.

12. Lee DG, Park Y, Kim MR, Jung HJ, Seu YB, Hahm KS, et al. Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of Lycium chinense. Biotechnol Lett. 2004 Jul;26(14):1125-30.

13. Li XM. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. Int J Biol Macromol. 2007 Apr; 40(5):461-5.

14. Luo Q, Cai Y, Yan J, Sun M, Corke H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from Lycium barbarum. Life Sci. 2004 Nov; 76(2):137-49.

15. Tang WM, Chan E, Kwok CY, Lee YK, Wu JH, Wan CW, et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of Lycium barbarum fruit. Inflammopharmacology. 2012 Dec; 20(6):307-14. doi: 10.1007/s10787-011-0107-3.

16. Li XM, Ma YL, Liu XJ. Effect of the Lycium barbarum polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice. J Ethnopharmacol. 2007 May; 111(3):504-11.

17. Gong H, Shen P, Jin L, Xing C, Tang F. Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice. Cancer Biother Radiopharm. 2005 Apr;20(2):155-62.

18. Liu H, Zhu Y. [Effect of alcohol extract of Zingben officinale rose on immunologic function of mice with tumor]. Wei Sheng Yan Jiu. 2002 Jun; 31(3): 208-9. [Article in Chinese]

19. Bruce-Chwatt LJ. Biometric study of spleen- and liver-weights in Africans and Europeans, with special reference to endemic malaria. Bull World Health Organ. 1956; 15(3-5): 513-48.

20. Zhang M, Wang J, Zhang S. Study on the composition of Lycium barbarum polysaccharides and its effects on the growth of weanling mice. Wei Sheng Yan Jiu. 2002; 31(2):118-9.

21. Risch SC, Horner MD, McGurk SR, Palecko S, Markowitz JS, Nahas Z, De Vane CL. Donepezil effects on mood in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. Int J Neuropsychopharmacol. 2006; 9(5):603-5.

22. Teo SK, Stirling DI, Thomas SD, Evans MG, Khetani VD. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in beagle dogs. Int J Toxicol. 2003 May-Jun; 22(3):215-26.

23. Borek C. Dietary antioxidants and human cancer. Integr Cancer Ther. 2004 Dec; 3(4): 333-41.

24. Luo Q, Li Z, Yan J, Zhu F, Xu RJ, Cai YZ. Lycium barbarum polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancergrowth in a xenograft mouse model of human prostate cancer. J Med Food. 2009; 12(4):695-703. doi: 10.1089/jmf.2008.1232.

25. Silva TC, Gorniak SL, Oloris SC, Raspantini PC, Haraguchi M, Dagli ML. Effects of Senna occidentalis on chick bursa of Fabricius. Avian Pathol. 2003; 32(6):633-7.

26. Inouye K, Ito T, Fujimaki H, Takahashi Y, Takemori T, Pan X, et al. Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response inC57BL/6 mice. Toxicol Sci. 2003; 74(2):315-24.

27. Budec M, Milićević Z, Koko V. Stereological study of rat spleen following acute ethanol treatment. Indian J Exp Biol. 2000 May; 38(5):462-6.

28. Gomes MG, Silva CM, Ribeiro AF, Ocarino NM, Moro L, Vasconcelos AC, et al. [Apoptosis, proliferation and spleen histomorphometry of adult female rats with thyroid and ovarian hypofunction]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008 Aug; 52(6):1031-8. [Article in Portuguese]

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Effect of *Lycium ruthenicum L.* aqueous extract on morphometric and histopathologic indices in mice lymphatic organs

Sadeghinezhad J (Ph.D)[1], Mahmoudi Kordi F (Ph.D)*[2]
Limoei H (DVM, Ph.D)[3], Rostami S (M.Sc)[4]

[1]Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
[3]Veterinary Anatomist. [4]M.Sc in Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Several studies reported the immunological activity of *Lycium barbarum*. This study carried out to determine the effect of aqueous extract of fruits of *Lycium ruthenicum L.* on morphometric and histomorphometric indices in mice lymphatic organs.

Methods: In this experimental study, 36 adult mice were randomly allocated into six experimental and control groups. The experimental groups were received *Lycium ruthenicum L.* fruit aqueous extract in the doses of 50, 100, 200, 400 and 800 mg/kg/bw, daily by feeding tube for 21 days. In the control group animals were recived 100 mg/kg/bw of saline using feeding tube. After the treatment, the relative increase in the body weight, morphometric, histomorphometric and histopathologic indices in thymus, lymph node and spleen were measured.

Results: The administration of extract in doses of 50 and 100 mg/kg/bw did not effect on body weight of mice but in the doses of 200, 400 and 800 mg/kg/bw significantly reduced the body weight ($P<0.05$).Thymus index in 800 mg/kg/bw of extract significantly reduced in comparison with controls ($P<0.05$). Thickness of thymus medulla in low doses significantly increased while it was not visible in higher doses ($P<0.05$). Thickness of capsule in lymph node and spleen in dose of 800 mg/kg/bw significantly increased in comparison with control group ($P<0.05$). Low doses of the *Lycium barbarum* extract increased stimulation and infiltration of the immune cells and hematopoiesis in the lymphoid organs while in doses of 400 and 800 mg/kg/bw caused pathological changes including fibrosis in capsule, degeneration in follicles and stromal cell apoptosis.

Conclusion: Aqueous extract of fruits of *Lycium ruthenicum L.* in doses of 400 and 800 mg/kg/bw causes histopathological alterations in the lymphoid organs.

Keywords: *Lycium ruthenicum L.*, Histomorphometry, Histopathology, Thymus, Lymph node, Spleen

*** Corresponding Author: Mahmoudi Kordi F (Ph.D), E-mail: ac.mahmoodi@azaruniv.ac.ir**

Received 15 Jul 2014 **Revised** 27 Dec 2014 **Accepted** 10 Jan 2015

Cite this article as: Sadeghinezhad J, Mahmoudi Kordi F, Limoei H, Rostami S. [Effect of *Lycium ruthenicum L.* aqueous extract on morphometric and histopathologic indices in mice lymphatic organs]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(3): 24-31. [Article in Persian]

Archive of SID
www.SID.ir