

## Dose Effect Relationship of Methylsulfonylmethane on Carrageenan Induced Rat Paw Edema

Amirshahrokhi K, Bohlooli S\*, Yousefi M

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\* *Corresponding author.* Tel/Fax: +984533522197, E-mail: Shahab.Bohlooli@arums.ac.ir, S.bohlooli@pharmacy.arums.ac.ir

Received: May 20, 2018 Accepted: Sep 21, 2018

### ABSTRACT

**Background & objectives:** The purpose of this study was to show the dose response relationship of anti-inflammatory effect of methylsulfonylmethane (MSM) on carrageenan induced rat paw edema as an acute model of inflammation.

**Methods:** A total of 54 male, Sprague-Dawley rats, weighing 180-190 g, were used. One hundred, 200, 400, 800 and 1200 mg/kg of MSM were administered intraperitoneally to the rats 30 minutes before induction of paw edema with injection of 0.1% carrageenan. Diclofenac was used as a control drug. Rats were divided into three groups: MSM, diclofenac and normal saline, and their paw tissue were collected for the study of inflammatory and oxidative markers (MDA, GSH, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ). The relationship between the different concentrations of MSM and decrease in rat paw edema was calculated using a simple Emax model.

**Results:** the ED<sub>50</sub> value for effect of MSM on carrageenan induced rat paw edema was 193±9.7 mg/kg. A significant reduction in paw edema following administration of MSM at 200, 400, 800 and 1200 mg/kg was observed, but statistical analysis did not reveal any significant reduction in paw edema after administration of 100 mg/kg. MSM did not show statistically significant difference from control group in tissue level of GSH, but it was able to decrease MDA level significantly. MSM was able to significantly alleviate IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  tissue levels.

**Conclusion:** The recommended anti-inflammatory dosing range of MSM is 200-800 mg/kg for pharmacological studies in rats and the average appropriate dose is 400 mg/kg. Also, it seems that anti-inflammatory effect of MSM is more profound than its anti-oxidant effects.

**Keywords:** Methylsulfonylmethane; Inflammation; Oxidative Stress; Carrageenan; Diclofenac

## ارتباط دوز پاسخ متیل سولفونیل متان بر ادم ناشی از کاراجینان در پای رت

کیوان امیرشاهرخی، شهاب بهلولی\*، محمد یوسفی

گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۱۹۷ - پست الکترونیک: Shahab.Bohlooli@arums.ac.ir و S.bohlooli@pharmacy.arums.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از این مطالعه نشان دادن ارتباط بین دوزهای مختلف و اثر ضد التهابی متیل سولفونیل متان (MSM) بر ادم ناشی از کاراجینان در پای رت بعنوان یک مدل التهابی حاد بود.

**روش کار:** در این مطالعه از ۵۴ عدد رت نر با وزن ۱۸۰ تا ۱۹۰ گرم استفاده شد. متیل سولفونیل متان در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg بصورت تزریق داخل صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کاراجینان (۱/۱٪) استفاده شد. در این مطالعه از دیکلوفناک بعنوان داروی کنترل استفاده گردید. موش‌ها به سه گروه MSM، دیکلوفناک و نرمال سالین تقسیم شده و بافت پنجه آنها برای بررسی فاکتورهای التهابی و اکسیداتیو جمع آوری شد (IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$ ، GSH، MDA). همچنین ارتباط مابین غلظت های مختلف MSM و میزان کاهش ادم پای موش‌ها با استفاده از مدل ساده Emax محاسبه گردید.

**یافته ها:** میزان ED<sub>50</sub> برای اثر MSM بر روی ادم پای ناشی از کاراجینان ۱۹۳±۹/۷ mg/kg بود. پس از استفاده از MSM در دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg کاهش معناداری در ادم پا مشاهده گردید، اما این کاهش در دوز ۱۰۰ mg/kg MSM از نظر آماری معنادار نبود. MSM توانست سطح مالون دی آلدهید بافتی را بطور بارزی کاهش دهد اما تفاوت معناداری در میزان گلوکوتاتیون احیاشده نسبت به گروه کنترل نتوانست ایجاد نماید. همچنین MSM بطور معناداری سطوح بافتی سایتوکاین‌های IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** محدوده دوز ضد التهابی توصیه شده MSM برای مطالعات فارماکولوژیک در رت حدود ۲۰۰ تا ۸۰۰ mg/kg می‌باشد و دوز متوسط آن نیز ۴۰۰ mg/kg است. همچنین به نظر می‌رسد اثر ضد التهابی MSM بارزتر از اثر آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

**واژه های کلیدی:** متیل سولفونیل متان، التهاب، استرس اکسیداتیو، کاراجینان، دیکلوفناک

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

## مقدمه

سولفور بدن عمل می‌نماید. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که MSM اثرات آپوپتوتیک [۳]، ضدالتهابی [۴-۸]، آنتی متاستاتیک [۹-۱۲] و آنتی‌اکسیدانی [۱۳-۱۶] از خود نشان می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که MSM یکی از ترکیبات با سمیت بسیار پایین می‌باشد [۱۷، ۱۸] بطوری‌که سمیت آن قابل مقایسه با پلاسبو است [۱۹]. اثرات حفاظت از کبد MSM در مقابل سمیت استامینوفن [۴]، کربن

متیل سولفونیل متان (MSM)<sup>۱</sup> یک ترکیب ارگانوسولفور طبیعی با وزن مولکولی ۱۰۰ دالتون می‌باشد [۱]. این ماده بطور وسیعی در انواع گونه‌های حیوانی و گیاهی و نیز محصولات آنها یافت می‌شود [۲]. تصور می‌شود که MSM بعنوان یک تامین کننده

<sup>۱</sup> Methylsulfonylmethane

تتراکلراید [۲۰] و پاراکوات [۵] در مدل‌های تجربی ثابت شده است.

کاراجینان<sup>۱</sup> یک پلی گالاکتان سولفاته با ۱۵ تا ۴۰ درصد محتوای استر- سولفات و وزن مولکولی متوسط بالای ۱۰۰ کیلو دالتون می‌باشد که بطور وسیع برای القای التهاب موضعی در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی مثل ادم پای رت بکار می‌رود [۲۱]. تزریق داخل کف پای کاراجینان باعث ایجاد ادم و التهاب می‌گردد [۲۲]. بر اساس مطالعات قبلی که در مدل‌های تجربی موش صورت گرفته است بهترین اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی MSM در دوزهای ۵۰۰-۴۰۰ mg/kg دیده می‌شود. اما در بررسی متون هیچ مطالعه مناسبی که دوز ایده‌آل MSM را در مدل‌های تجربی مشخص نماید وجود ندارد. بنابراین مطالعه حاضر برای مشخص نمودن ارتباط دوز- پاسخ اثر ضدالتهابی MSM در ادم پای ناشی از کاراجینان (بعنوان یک مدل حاد التهاب) انجام گرفت. دیکلوفناک که یک داروی ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAID) می‌باشد بعنوان یک ترکیب رفرانس در نظر گرفته شد.

## روش کار

در مجموع ۵۴ عدد رت نر از نژاد Sprague-Dawley با وزن ۱۸۰-۱۹۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید. رت‌ها بطور رندوم در گروه‌های زیر قرار گرفتند؛ گروه A: بعنوان گروه کنترل (n=۶) دریافت کننده کاراجینان ۰/۱٪ (۰/۱ mL) برای هر حیوان، تزریق داخل کف پا) به اضافه نرمال سالین (i.p.). گروه B: یک دسته (n=۶) دریافت کننده فقط نرمال سالین (تزریق داخل کف پا) به عنوان کنترل منفی و دسته دیگر (n=۶) دریافت کننده نرمال سالین با اضافه MSM (۴۰۰ mg/kg، i.p.). گروه‌های C، D، E، F و G دریافت کننده کاراجینان (۰/۱ mL) (n=۶) (تزریق داخل کف پا) به اضافه MSM (i.p.) در

<sup>۱</sup> Carrageenan

دوزهای به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg: گروه H: دریافت کننده کاراجینان (۰/۱ mL) (n=۶). تزریق داخل کف پا) با اضافه دیکلوفناک (۰/۱ mL) (۲۵ mg/kg، i.p.) بعنوان داروی رفرانس.

## روش القای ادم در پای موش

برای القای ادم پا از متد کاراجینان استفاده گردید [۲۳]. دوزهای مختلف MSM (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ mg/kg) (۱۲۰۰ و ۸۰۰) بصورت تزریق داخل صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کاراجینان (۰/۱٪) استفاده شد. قطر کف پای نرمال تمام موش‌ها بوسیله یک کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شده و سپس حدود ۰/۱ میلی لیتر کاراجینان ۰/۱٪ در کف پای عقب هر موش تزریق گردید. قطر کف پای موش‌ها در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق کاراجینان (بصورت سه بار تکرار) اندازه‌گیری شد. قدرت ضدالتهابی MSM با مقایسه این نتایج با نتایج بدست آمده از گروه‌های دریافت کننده دیکلوفناک و سالین (کنترل) محاسبه گردید.

## بررسی بیوشیمیایی

با توجه به اینکه حداکثر قطر کف پا در زمان ۴ ساعت پس از تزریق کاراجینان اتفاق افتاد، لذا آزمایش یک بار دیگر تکرار شده و تمام موش‌ها ۴ ساعت پس از تزریق کاراجینان کشته شده و بافت کف پای آنها برای بررسی‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری شد. حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت کف پای هر موش در ۱ میلی لیتر بافر PBS (با pH=7.4) هموژن شد. بافت‌های هموژن شده بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (16,000×g، 4°C) گردید و سوپرناتانت‌ها در دمای 80°C- برای آنالیز نگهداری شد. میزان مالون دی آلدئید بافتی<sup>۲</sup> (MDA) و گلوتاتیون احیاشده<sup>۳</sup> (GSH) به روش HPLC اندازه‌گیری شد [۱۵]. میزان سایتوکاین‌های IL-1β و TNF-α با استفاده از

<sup>۲</sup> Malondialdehyde

<sup>۳</sup> Reduced Glutathione

## یافته‌ها

## ادم پای ناشی از کاراجینان

تزریق داخل کف پای کاراجینان منجر به افزایش قطر کف پای رت‌ها بصورت وابسته به زمان گردید (جدول ۱). حداکثر قطر کف پا در زمان ۴ ساعت پس از تزریق کاراجینان اتفاق افتاد. متعاقب استفاده از MSM در دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg معناداری در ادم پا در ساعات ۲، ۴، ۸ و ۲۴ پس از تزریق کاراجینان مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). بررسی آماری، کاهش معناداری در ادم پا در دوز ۱۰۰ mg/kg MSM نشان نداد. استفاده از دیکلوفناک بعنوان داروی رفرانس بطور بارزی ادم پا را در تمام زمان‌ها پس از تزریق کاراجینان کاهش داد. اثر ضدالتهابی MSM در سه دوز ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ تفاوت بارزی با هم نداشتند. همچنین دوز ۲۰۰ mg/kg MSM در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ اثربخشی کمتری نسبت به دوزهای ۸۰۰ mg/kg و ۱۲۰۰ mg/kg داشت. در زمان ۴ ساعت پس از القای ادم، دوز ۲۰۰ mg/kg MSM اثربخشی کمتری نسبت به دوز ۴۰۰ mg/kg داشت اما از دوز ۱۰۰ mg/kg موثرتر بود ( $p < 0.05$ ). MSM در تمام دوزها و در زمان‌های ۴ و ۶ برای کاهش ادم پا ضعیف‌تر از دیکلوفناک بود ( $p < 0.01$ ). داده‌های دوز- پاسخ بطور کاملاً مناسب در مدل ساده Emax با  $R^2 = 0.999$  متناسب شد (شکل ۱). مقدار  $ED_{50}$  برای اثر MSM بر ادم کف پای ناشی از کاراجینان در حدود ۱۹۳±۹/۷ بدست آمد. دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ mg/kg در حد بالای منحنی دوز پاسخ قرار گرفته اند و تفاوت‌های کلی پاسخ‌ها از ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ mg/kg فقط ۱/۷ درصد (۱۰٪ از کل پاسخ) است. دوز ۱۰۰ mg/kg در پایین‌ترین حد منحنی قرار دارد. دوز ۲۰۰ mg/kg تقریباً معادل  $MSM ED_{50}$  در مدل التهاب کف پای رت می‌باشد.

جدول ۲ نشان‌دهنده محدوده دوزهای توصیه شده MSM برای مصرف در حیوانات مختلف می‌باشد.

کیت‌های اختصاصی طبق پروتکل مربوطه و به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

## آنالیز فارماکودینامیک

برای بررسی ارتباط مابین دوزهای مختلف MSM و میزان کاهش در ادم پای رت از فرمول زیر (مدل Emax ساده) استفاده شد.

$$E = \frac{E_{max} \times D}{ED_{50} + D}$$

E: اثر فارماکودینامیک یا میزان کاهش در ادم پای رت  
D: دوز دارو

$ED_{50}$ : دوزی که نصف حداکثر اثر را ایجاد می‌کند.  
 $E_{max}$ : حداکثر اثر

پارامتر فارماکودینامیک با آنالیز غیرخطی و بوسیله نرم افزار Sigma Plot محاسبه گردید. داده‌های دوز پاسخ MSM مربوط به ساعت ۴ بعد از تزریق کاراجینان در فرمول قرار گرفت.

## مدل تبدیل دوز مساحت سطح بدن (BSA)

تبدیل دوز MSM برای انسان و یا سایر حیوانات با استفاده از مدل BSA بر اساس فرمول زیر انجام گرفت [۲۴].

$$ED = Dose \times \frac{Km}{Km}$$

ED: دوز استخراج شده برای حیوان مورد نظر  
Dose: دوز موثر ضدالتهابی که در این مطالعه مربوط به رت می‌باشد

Km: فاکتور وزن بدن تقسیم بر BSA مربوط به رت

Km: فاکتور Km مربوط به حیوان مورد نظر

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند. آنالیز آماری با استفاده از روش ANOVA یکطرفه و روش Fisher LSD انجام شد. مقدار  $p < 0.05$  بعنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

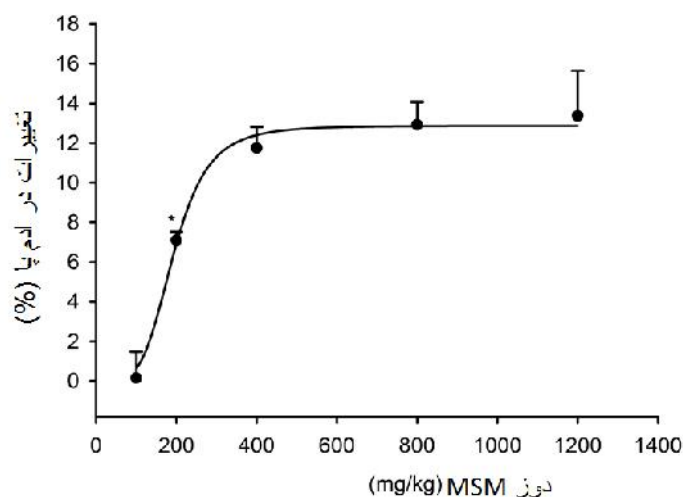
می‌دهد که سطح MDA در بافت کف پای رت‌ها بطور قابل توجهی پس از تزریق کاراجینان افزایش یافت. اما MSM توانست مقدار MDA را کاملاً کاهش دهد ( $p < 0.001$ ) با این وجود اثر کاهندگی MSM کمتر از دیکلوفناک بود ( $p < 0.001$ ). بررسی سطوح بافتی IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  نشان‌دهنده افزایش معنادار آنها در گروه کنترل کاراجینان می‌باشد ( $p < 0.001$ ). همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، MSM قادر است بطور بارزی سطوح بافتی IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  را پایین آورد ( $p < 0.001$ ). در مورد IL-1 $\beta$ ، دیکلوفناک نسبت به MSM از نظر آماری دارای برتری می‌باشد.

مقادیر محاسبه شده براساس اطلاعات بدست آمده از منحنی دوز پاسخ MSM بر ادم پای رت ناشی از کاراجینان می‌باشد. مقدار ED<sub>50</sub> بعنوان کمترین دوز انتخاب شده که می‌تواند پاسخ معنی‌داری ایجاد نماید در نظر گرفته شد. جدول ۳ نشان‌دهنده اثر MSM بر روی سطوح GSH و MDA بافت پای رت پس از تزریق کاراجینان می‌باشد. همانطور که در این جدول دیده می‌شود، گروه‌های کنترل MSM و دیکلوفناک بالاترین سطوح GSH را نسبت به گروه کنترل کاراجینان نشان دادند ( $p < 0.05$ ). رت‌هایی که MSM را متعاقب کاراجینان دریافت کردند هیچ تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشتند. جدول ۳ نشان

جدول ۱. اثر دوزهای مختلف MSM بر روی ادم پای ناشی از کاراجینان در زمان‌های مختلف بر حسب ساعت (h)

دوز (mg/kg)	ادم پا (میلی‌متر)						
	پایه	h۲	h۴	h۶	h۸	h۲۴	
Control	۴/۷۷۵ ± ۰/۱	۶/۵۷ ± ۰/۳۸	۶/۸۵۱ ± ۰/۳۴	۶/۶۴ ± ۰/۵	۶/۴۲ ± ۰/۴۲	۵/۶۵ ± ۰/۲۷	
Diclofenac ۲۵	۴/۴۶ ± ۰/۲۴	۵/۱۹ ± ۰/۲۴*	۵/۱۰ ± ۰/۱۸ *	۵/۲۵ ± ۰/۳۹ *	۵/۱۲ ± ۰/۶۷ *	۴/۵۶ ± ۰/۰۷ *	
MSM	۱۰۰	۴/۶۵ ± ۰/۰۴	۶/۵۴ ± ۰/۳۰	۶/۸۰ ± ۰/۲۲	۶/۵۱ ± ۰/۱۲	۶/۱۹ ± ۰/۱۷	۵/۵۸ ± ۰/۰۸
	۲۰۰	۴/۵۳ ± ۰/۰۴	۵/۸۱ ± ۰/۰۴*	۶/۳۳ ± ۰/۰۷* <sup>+</sup>	۶/۳۹ ± ۰/۱	۵/۸۲ ± ۰/۲ *	۴/۸۷ ± ۰/۱۲ *
	۴۰۰	۴/۵۳ ± ۰/۱۱	۵/۶۱ ± ۰/۱۷*	۶/۰۶ ± ۰/۰۶ *	۶/۳۱ ± ۰/۲۶	۵/۴۷ ± ۰/۳۵ *	۴/۸۳ ± ۰/۱۳ *
	۸۰۰	۴/۵۳ ± ۰/۱۰	۵/۳۷ ± ۰/۱۰ *	۵/۹۳ ± ۰/۱۹ *	۵/۹۵ ± ۰/۲۱ *	۵/۳۴ ± ۰/۲ *	۴/۷۳ ± ۰/۱۵ *
	۱۲۰۰	۴/۷۸ ± ۰/۱۱	۵/۵۹ ± ۰/۲۷ *	۵/۹۰ ± ۰/۳۸ *	۵/۹۶ ± ۰/۴۱ *	۵/۹۵ ± ۰/۳۶* <sup>+</sup>	۵/۱۵ ± ۰/۲۲* <sup>+</sup>

نتایج بر اساس mean  $\pm$  S.D. بیان شده است. ( $N = 6$ ).  $p < 0.05$  \* نسبت به گروه کنترل (سالین) در زمان مورد نظر.  $p < 0.05$  + نسبت به گروه mg/kg MSM در 400 در زمان مورد نظر



شکل ۱. منحنی دوز پاسخ MSM در گروه‌های مختلف، متعاقب تزریق کاراجینان در کف پای رت‌ها. داده‌های مربوط به ۴ ساعت پس از تزریق کاراجینان که در فرمول سه پارامتری (مدل ساده Emax) متناسب شده است.  $p < 0.05$  \* تفاوت معنی دار نسبت به دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg. مقدار  $R^2 = 0.999$  می‌باشد.

جدول ۲. تبدیل دوز موثر MSM از رت به گونه‌های حیوانی دیگر

گونه	Km	محدوده دوز MSM (mg/kg)
انسان (بزرگسال)	۳۷	۱۳۰-۳۳
سگ	۲۰	۲۴۰-۶۰
خرگوش	۱۲	۴۰۰-۱۰۰
خوکچه هندی	۸	۶۰۰-۱۵۰
رت (موش صحرایی)	۶	۸۰۰-۲۰۰
موش سوری	۳	۱۶۰۰-۴۰۰

Km: حاصل تقسیم وزن به مساحت سطح بدن

جدول ۳. اثر MSM بر روی سطوح GSH و MDA بافت پای رت پس از تزریق کاراجینان

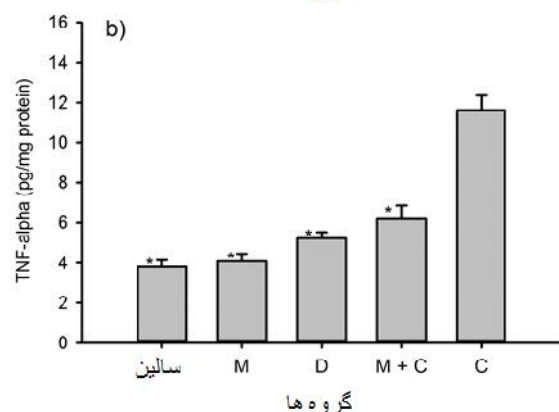
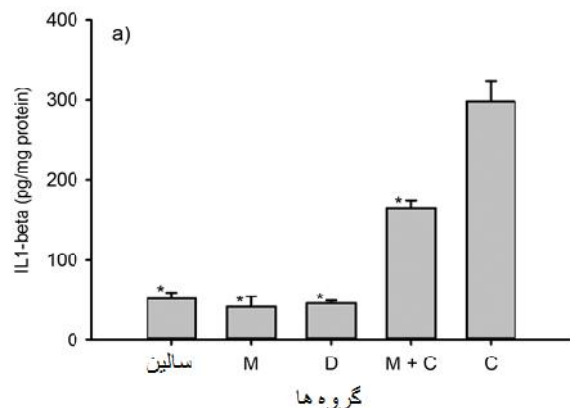
	کاراجینان (کنترل)	MSM (400mg/kg)	سالین	دیکلوفناک (25mg/kg)	MSM (400 mg/kg) + کاراجینان
MDA (nmol/mg tissue)	۱/۹۸ ± ۰/۱۲	۰/۵۹ ± ۰/۱۶ **	۰/۶۳ ± ۰/۰۲ **	۰/۶۵ ± ۰/۱۸ **	۱/۱۱ ± ۰/۲۹ **
GSH (nmol/mg tissue)	۱/۸۲ ± ۰/۲۵	۳/۳۱ ± ۰/۹۴ *	۲/۷۵ ± ۰/۷۷ *	۲/۷۹ ± ۰/۲۱ *	۲/۱ ± ۰/۷۹

MSM: methylsulfonylmethane; MDA: malonaldehyde; GSH: reduced glutathione. mean ± S.D. بیان شده است (N = 6). \*p < 0.05 و \*\*p < 0.001 نسبت به گروه کاراجینان (کنترل).

### بحث

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط دوز- پاسخ MSM و اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آن بر روی ادم پای ناشی از کاراجینان بعنوان یک مدل حاد التهاب می‌باشد. التهاب ناشی از کاراجینان یکی از روش‌هایی است که بطور معمول برای بررسی اثرات ضدالتهابی ترکیبات مورد آزمایش بکار می‌رود. این روش به آسانی قابل انجام بوده و نتایج آن نیز قابل اعتماد می‌باشد. برخی مطالعات مدعی شده اند که توانایی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) در کاهش ادم پا، با اثرات ضدالتهابی آنها در بیماری‌های التهابی انسان بخوبی ارتباط دارد [۲۵]. علاوه بر این، هر ترکیب مورد آزمایش که بتواند ادم پا را در این مدل کاهش دهد می‌تواند بطور بالقوه دارای اثر بر روی فاز حاد التهاب باشد [۲۶].

در مطالعه حاضر اثر ضدالتهابی MSM تایید می‌شود چرا که این ترکیب می‌تواند ادم پای رت را بصورت وابسته به دوز کاهش دهد. همچنین اثر ضدالتهابی MSM در مدل‌های دیگر التهاب و استرس اکسیداتیو مثل کولیت [۷] و آسیب ریوی و کبدی [۲] خاطر نشان



شکل ۲. سطوح بافتی (a) IL-1 $\beta$  و (b) TNF- $\alpha$  در گروه‌های مختلف، متعاقب تزریق کاراجینان در کف پای رت‌ها

\*p < 0.001 تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل کاراجینان. نتایج بر اساس mean ± S.D. بیان شده است. (N=6). C: کاراجینان، M: methylsulfonylmethane (MSM)، D: دیکلوفناک

شده است، اما اثر MSM بر روی التهاب ناشی از کاراجینان و نیز ارتباط دوز پاسخ آن در مطالعه حاضر جدید می‌باشد.

بر اساس مدل فارماکودینامیک (شکل ۱)، دوز  $mg/kg$  ۴۰۰ MSM تقریباً در انتهای قسمت خطی منحنی دوز- پاسخ قرار دارد. بنابراین بنظر می‌رسد دوزهای بالاتر از  $mg/kg$  ۴۰۰ دیگر نمی‌توانند باعث افزایش قابل توجه پاسخ شوند، اما دوزهای پایین‌تر دارای پاسخ‌های بسیار کمتری خواهند بود. بنابراین دوزهای نزدیک  $mg/kg$  ۴۰۰ MSM باید مناسب‌ترین دوز برای مطالعات حیوانی در رت باشند. البته اگر محدوده دوز را در نظر بگیریم، مقدار  $ED_{50}$  برای پایین‌ترین حد پیشنهاد می‌گردد و برای بالاترین حد، دوز به فاکتورهای مختلفی مثل اثربخشی، امکان مصرف و سمیت ترکیب بستگی خواهد داشت. در مطالعه ای، هوروات و همکاران نشان داده‌اند که MSM در دوزهای  $g/kg$  ۲ هیچگونه علامت سمیت در رت نشان نداده است [۱۸]. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که دوزهای بالاتر از  $mg/kg$  ۸۰۰ باعث افزایش اثربخشی نخواهد شد، بنابراین محدوده دوز  $mg/kg$  ۲۰۰ تا  $mg/kg$  ۸۰۰ برای مطالعات فارماکولوژیک در رت توصیه می‌شود. بر اساس مدل BSA تبدیل دوز، محدوده دوز توصیه شده برای انسان و سایر حیوانات تخمین زده شده است (جدول ۲). BSA یک مدل معتبر و تایید شده برای تبدیل دوز در میان گونه‌های مختلف پستانداران می‌باشد. این مدل پارامترهای بیولوژی پستانداران را باهم ارتباط داده و باعث می‌شود که BSA بعنوان یک مقیاس منطقی و آلومتریک برای دوزهای یک دارو بین گونه‌های مختلف حیوانات بکار رود [۲۴]. با توجه به این مدل محدوده دوز پیشنهادی برای MSM در انسان  $mg/kg$  ۳۲ تا ۱۳۰ خواهد بود. این نتایج برای تخمین دوز مناسب MSM در مردان جوان سالم که در یک مطالعه دیگر توسط محققین مطالعه حاضر به چاپ رسیده است استفاده گردیده است [۱۵].

نتایج مطالعه حاضر در مورد MDA و GSH نشان داد که اثر آنتی‌اکسیدانی MSM در استفاده حاد بصورت تک دوز بارز نیست (جدول ۳). بنابراین MSM در مصرف حاد ممکن است یک آنتی‌اکسیدان ضعیف باشد. احتمالاً MSM اثر آنتی‌اکسیدانی خود را از دو طریق ایجاد می‌کند. اول اینکه MSM رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را جاروب می‌نماید [۲۷]، دوم اینکه MSM می‌تواند بعنوان منبع سولفور برای ساخت GSH بکار رفته [۲۲] و سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول را بطور غیرمستقیم تقویت نماید. در مطالعه قبلی، محققین مطالعه حاضر مشاهده کردند که MSM بصورت تک دوز در حفظ سطح GSH پلاسما در مردان سالم و ورزشکار ناتوان است [۱۶]، اما در مصرف مزمن، MSM قادر است سطوح GSH بافت یا پلاسما را در حد نرمال (حتی با وجود استرس اکسیداتیو) حفظ نماید [۱۵]. بنظر می‌رسد که در دوزهای حاد، MSM نمی‌تواند از طریق تحریک ساخت باعث افزایش سطح GSH گردد و ممکن است اثر آنتی‌اکسیدانی آن عمدتاً از طریق جاروب کردن مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد. از میان سایتوکاین‌های پیش التهابی،  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  مهمترین مدیاتورهای فرایند التهاب و بیماری‌های خودایمنی هستند. این سایتوکاین‌ها توسط ماکروفاژها در پاسخ به ترکیباتی مثل کاراجینان و مواد مترشحه باکتری‌ها تولید می‌شوند [۲۸]. نتایج این مطالعه ثابت می‌کند که التهاب ناشی از کاراجینان باعث افزایش بارز سطوح بافتی سایتوکاین‌های پیش التهابی  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  می‌شود (شکل ۲). داروی دیکلوفناک و MSM اثر کاهندگی بر روی ایندوسایتوکاین داشتند که نشان‌دهنده فعالیت ضدالتهابی قوی آنها است. مطالعه حاضر و مطالعات قبلی محققین این مطالعه بر روی اثرات MSM در مدل‌های کولیت ناشی از استیک‌اسید [۱۰] و آسیب ریوی و کبدی ناشی از پاراکوات [۱۷] این نظریه را که MSM دارای فعالیت

ضدالتهابی قوی و نیز اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد را حمایت می‌کند.

مکانیسم MSM در کاهش التهاب بطور کامل شناخته نشده است اما مشخص شده است MSM می‌تواند باعث تنظیم کاهش<sup>۱</sup> مسیر سیگنالینگ STAT<sup>۲</sup> سلولی در سرطان پستان [۹] و رده سلولی سرطان ممانه گردد [۲۹]. یک مطالعه نشان داده است که MSM می‌تواند مسیر سیگنالینگ STAT مرتبط به هورمون رشد را افزایش دهد [۳۰]. بنابراین بنظر می‌آید که MSM یک عامل تنظیم کننده مسیر سیگنالینگ STAT باشد تا اینکه یک مهارکننده یا القاکننده آن. از طرف دیگر نقش مسیر سیگنالینگ STAT در التهاب کاملاً شناخته شده می‌باشد [۳۲،۳۱]. از این رو فرض می‌شود که MSM اثر ضدالتهابی خود را از طریق تنظیم مسیر STAT نشان می‌دهد. با این حال ثابت شده است که MSM با کاهش بیان ژن B-NF<sup>۳</sup> نیز می‌تواند التهاب را کاهش دهد [۳۵،۸]. با توجه به اینکه فعالیت مسیر سیگنالینگ STAT و نیز NF-B نقش

اصلی در تولید سایتوکاین‌های التهابی دارند [۳۳-۳۵]. بنابراین از نظر مکانیسم مولکولی تصور بر این است که در مطالعه حاضر MSM از این دو طریق باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  شده است.

### نتیجه گیری

محدوده دوز توصیه شده MSM برای مطالعات فارماکولوژیک در رت حدود ۲۰۰ mg/kg تا ۸۰۰ mg/kg می‌باشد و دوز متوسط آن نیز ۴۰۰ mg/kg است. یافته‌های این مطالعه و مطالعات قبلی نشان می‌دهد که MSM یک ترکیب ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بوده و اثر ضدالتهابی آن غالب می‌باشد. بررسی‌های بیشتری لازم است تا مکانیسم‌های احتمالی MSM را در پاسخ‌های التهابی روشن سازد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گرفته است.

<sup>1</sup> Down Regulation

<sup>2</sup> Signal Transducers and Activators of Transcription

<sup>3</sup> Nuclear Factor Kappa B

### References

- 1- Richmond VL. Incorporation of methylsulfonylmethane sulfur into guinea pig serum proteins. Life Sci. 1986 Jul;39(3):263-8.
- 2- Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Altern Med Rev. 2002 Feb; 7(1): 22-44.
- 3- Jafari N, Bohlooli S, Mohammadi S, Mazani M. Cytotoxicity of methylsulfonylmethane on gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. J Gastrointest Cancer. 2012 Sep;43(3):420-5.
- 4- Bohlooli S, Mohammadi S, Amirshahrokhi K, Mirzanejad-asl H, Yosefi M, Mohammadi-Nei A, et al. Effect of methylsulfonylmethane pretreatment on aceta-minophen induced hepatotoxicity in rats. Iran J Basic Med Sci. 2013 Aug;16(8):896.
- 5- Amirshahrokhi K, Bohlooli S. Effect of methylsulfonylmethane on paraquat-induced acute lung and liver injury in mice. Inflammation. 2013 Oct; 36(5): 1111-21.
- 6- Mohammadi S, Najafi M, Hamzei H, Maleki-Dizaji N, Pezeshkian M, Sadeghi-Bazargani H, et al. Protective effects of methylsulfonylmethane on hemodynamics and oxidative stress in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. Adv Pharmacol Sci. 2012 Sep; 2012: 5072-78.
- 7- Amirshahrokhi K, Bohlooli S, Chinifroush MM. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 2011 Jun; 253(3):197-202.



- 8- Kim YH, Kim DH, Lim H, Baek DY, Shin HK, Kim JK. The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2009 Apr; 32(4): 651-6.
- 9- Lim EJ, Hong DY, Park JH, Joung YH, Darvin P, Kim SY, et al. Methylsulfonylmethane suppresses breast cancer growth by down-regulating STAT3 and STAT5b pathways. *PLoS One.* 2012; 7(4): e33361.
- 10- Caron JM, Monteagudo L, Sanders M, Bannon M, Deckers PJ. Methyl sulfone manifests anticancer activity in a metastatic murine breast cancer cell line and in human breast cancer tissue--part 2: human breast cancer tissue. *Chemotherapy.* 2013; 59(1): 24-34.
- 11- Caron JM, Bannon M, Rosshirt L, O'donovan L. Methyl sulfone manifests anticancer activity in a metastatic murine breast cancer cell line and in human breast cancer tissue--part I: murine 4T1 (66cl-4) cell line. *Chemotherapy.* 2013; 59(1): 14-23.
- 12- Caron JM, Bannon M, Rosshirt L, Luis J, Monteagudo L, Caron JM, et al. Methyl sulfone induces loss of metastatic properties and reemergence of normal phenotypes in a metastatic cloudman S-91 (M3) murine melanoma cell line. *PLoS One.* 2010 Aug; 5(8): e11788.
- 13- Kalman DS, Feldman S, Scheinberg AR, Krieger DR, Bloomer RJ. Influence of methylsulfonylmethane on markers of exercise recovery and performance in healthy men: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012 Sep; 9(1): 46.
- 14- Barmaki S, Bohlooli S, Khoshkharesh F, Nakhostin-Roohi B. Effect of methylsulfonylmethane supplementation on exercise - Induced muscle damage and total antioxidant capacity. *J Sports Med Phys Fitness.* 2012 Apr; 52(2): 170-4.
- 15- Nakhostin-Roohi B, Barmaki S, Khoshkharesh F, Bohlooli S. Effect of chronic supplementation with methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exercise in untrained healthy men. *J Pharm Pharmacol.* 2011 Oct; 63(10):1290-4.
- 16- Nakhostin-Roohi B, Niknam Z, Vaezi N, Mohammadi S, Bohlooli S. Effect of single dose administration of methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exhaustive exercise. *Iran J Pharm Res.* 2013 Autumn; 12(4): 845-853.
- 17- Magnuson BA, Appleton J, Ryan B, Matulka RA. Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jun;45(6):977-84.
- 18- Horvath K, Noker PE, Somfai-Relle S, Glavits R, Financsek I, Schauss AG. Toxicity of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol.* 2002 Oct ;40(10):1459-62.
- 19- Kim LS, Axelrod LJ, Howard P, Buratovich N, Waters RF. Efficacy of methylsulfonylmethane (MSM) in osteoarthritis pain of the knee: a pilot clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Mar;14(3):286-94.
- 20- Kamel R, El Morsy EM. Hepatoprotective effect of methylsulfonylmethane against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Arch Pharm Res.* 2013 Sep;36(9):1140-8.
- 21- Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Veterinari Medicina.* 2013 Apr;58(4):187-205.
- 22- Tamaddonfard E, Farshid AA, Eghdami K, Samadi F, Erfanparast A. Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. *Pharmacol Rep.* 2013 Sep;65(5):1272-80.
- 23- Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003;225:115-21.
- 24- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008 Mar; 22(3): 659-61.
- 25- Sakat SS, Mani K, Demidchenko YO, Gorbunov EA, Tarasov SA, Mathur A, et al. Release-active dilutions of diclofenac enhance anti-inflammatory effect of diclofenac in carrageenan-induced rat paw edema model. *Inflammation.* 2014 Feb; 37(1): 1-9.
- 26- Di Rosa ML, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 1971 May; 104(1): 15-29.
- 27- Beilke MA, Collins-Lech C, Sohnle PG. Effects of dimethyl sulfoxide on the oxidative function of human neutrophils. *J Lab Clin Med.* 1987 Jul; 110(1): 91-6.

- 28- Min SW, Kim NJ, Baek NI, Kim DH. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *J Ethnopharmacol.* 2009 Sep; 125(3):497-500.
- 29- Joung YH, Na YM, Yoo YB, Darvin P, Sp N, Kang DY, et al. Combination of AG490, a Jak2 inhibitor, and methylsulfonylmethane synergistically suppresses bladder tumor growth via the Jak2/STAT3 pathway. *Int J Oncol.* 2014 Mar; 44(3): 883-95.
- 30- Joung YH, Lim EJ, Darvin P, Chung SC, Jang JW, Do Park K, et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PLoS One.* 2012 Oct; 7(10): e47477.
- 31- Meares GP, Liu Y, Rajbhandari R, Qin H, Nozell SE, Mobley JA, et al. PERK-Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Inflammation. *Mol Cell Biol.* 2014 Aug; 34(20): 3911-25.
- 32- Recio C, Oguiza A, Lazaro I, Mallavia B, Egidio J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived Peptide inhibits janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Sep; 34(9): 1953-60.
- 33- Samavati L, Rastogi R, Du W, Hüttemann M, Fite A, Franchi L. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Mol Immunol.* 2009 May; 46(8-9): 1867-77.
- 34- De Jong PR, Schadenberg AW, Van Den Broek T, Beekman JM, Van Wijk F, Coffey PJ, et al. STAT3 regulates monocyte TNF-alpha production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *PLoS One.* 2012 Apr; 7(4): e35070.
- 35- Amirshahrokhi K, Khalili AR. Methylsulfonylmethane is effective against gastric mucosal injury. *Eur J Pharmacol.* 2017 Sep ;811:240-248.