مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۳۰، شماره ۲، خرداد و تیر (شماره پی در پی ۱۶۹)

تأثیر اسانس برگ شمعدانی عطری بر بیان پروستاگلاندین، نیتریت اکساید، اینترلوکین ۱ بتا و متالوپروتئینازها در آرتروز ناشی از کلاژناز در خرگوش

حسین مقصودی[۱*]، فرشته جولا[۲]، غلامرضا بخشی خانگی[۲]

[۱]گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور ، تهران، ایران، [۲] گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور ، تهران، ایران

تاریخ وصول:۱۴۰۳/۱۱/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/ ۰۴/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های مزمن از جمله استئوآرتریت به علت سیر پیشرونده‌ای که دارند، اغلب ناتوان کننده بوده و کیفیت زندگی سالمندان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در میان محصولات گیاهی، شمعدانی عطری به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در اسانس برگ آن می‌تواند به عنوان یک داروی طبیعی بالقوه در نظر گرفته شود، لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی عطری بر محافظت از غضروف در استئوآرتریت ناشی از کلاژناز در خرگوش نیوزلندی بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ انجام شد. تعداد ۴۰ سر خرگوش وارد مطالعه شدند و به طور تصادفی به هشت گروه تقسیم‌بندی شدند. لذا پس از تهیه اسانس گیاه، خرگوش‌ها به مدت ۱ ماه برای تطبیق با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. به زانوهای راست خرگوش‌ها کلاژناز به صورت داخل مفصلی تزریق شد. ۳۰ روز پس از ایجاد استئوآرتریت ناشی از کلاژناز، خرگوش‌ها به صورت خوراکی با آب مقطر(کنترل مثبت)، اسانس برگ شمعدانی عطری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سلکوکسیب(۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۴ درصد،) یک بار در روز به مدت ۳۰ روز تجویز شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، آزمون توکی و آزمون تی نمونه‌های وابسته تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد اسانس شمعدانی عطری به طور قابل توجهی منجر به کاهش سفتی و سختی غضروف مفصلی در خرگوش‌های مبتلا می‌شود($p<۰/۰۰۵$). بیان کلاژن نوع II، پروتئوگلیکان و آگریکان به طور قابل توجهی در مفاصل زانو خرگوش گروه تحت درمان با اسانس افزایش می‌یابد($p<۰/۰۰۵$). با این حال، سلکوکسیب هیچ تأثیری بر محافظت از غضروف نداشت. سطح بیان اگریگیناز-۱ و اگریگیناز-۲ ، متالوپروتئیناز ۱ و ۳ و۱۳در گروه درمان شده با اسانس وابسته به دوز کاهش یافت($p<۰/۰۰۵$). در مقابل، سطح متالوپروتئینازممانعت کننده بافتی وابسته به دوز افزایش یافت. سایتوکاین‌های پیش التهابی درگیر در تخریب غضروف، مانند اینترلوکین ۱-بتا($p<۰/۰۰۵$)، واسطه‌های التهابی حاوی پروستاگلاندین($p<۰/۰۰۵$) و نیریت اکساید($p<۰/۰۰۵$)، نیز در گروه تحت درمان با اسانس مهار شدند.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر اسانس برگ شمعدانی عطری در مقایسه با سلبرکس اثرات درمانی قابل توجهی بر محافظت از غضروف مبتلا، از طریق کاهش بیان واسطه‌های التهابی و آگرکانازها و متالوپروتئینازها انجام می‌شود.

واژه‌های‌کلیدی: استئوآرتریت، شمعدانی عطری، سلکوکسیب، پروتئوگلیکان، آگرکان

[*] **نویسنده مسئول: حسین مقصودی**، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه بیوتکنولوژی

Email: drhmaghssoudi@pnu.ac.ir hossein_m2002@yahoo.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می شوند."

مقدمه

آرتروز یک بیماری چند عاملی دژنراتیو مفصلی است که در آن ماتریکس غضروفی، از بین می‌رود. در مفصل نرمال، هموستاز غضروف با تعادل بین سنتز و تخریب غضروف مفصلی متشکل از پروتئوگلیکان‌ها و کلاژن نوع II که آگریکان فراوان ترین آن است، حفظ می‌شود(۱). با این حال، در آرتروز، تعادل به سمت کاتابولیسم تغییر می‌کند و منجر به تخریب غضروف می‌گردد. پیشرفت بیماری و تغییرات ساختاری نشان می‌دهد که انتشار کاتابولیت‌های آگریکان در مایع سینوویال و تولید بیش از حد سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد از سینوویوم ملتهب، رویدادهای پاتوفیزیولوژیک اصلی در آرتروز هستند. نشان داده شده است که سیر بیماری به تعدادی از مسیرها و مکانیسم‌های پیچیده مرتبط است که از جمله آنها می‌توان به تولید بیش از حد آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند آگریکانازها و ماتریکس متالوپروتئینازها اشاره کرد(۲). آگریکان به وسیله آگرکانازها و متالوپروتئینازها تجزیه می‌شود، در حالی که کلاژن نوع II به وسیله متالوپروتئینازها تجزیه می‌شود(۳). آگریکاناز عضوی از خانواده دی اینتگرین و متالوپروتئینازها با دومینِ ترومبوسپوندین (ADAMTS)[1] می‌باشد. تا به امروز، چندین آنزیم از جمله آگریکاناز۱(ADAMTS-4) و آگریکاناز۲ (ADAMTS-5) شناسایی شده‌اند که در تخریب غضروف در آرتروز نقش دارند و بیان ADAMTS-5 به طور مستمر در آرتروز انجام می‌شود، اما ADAMTS-4 به دنبال درمان اینترلوکین ـ۱ یا تومور نکروز دهنده ـ آلفا القا می‌شود(۴). متالوپروتئینازها گروه بزرگی از آنزیم‌ها هستند که به دلیل توانایی آنها در تخریب طیف گسترده‌ای از اجزای ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی در بازسازی بافت و هم‌چنین در تخریب غضروف و استخوان در مفصل آرتروز دارند(۵). تولید متالوپروتئینازها به شدت به وسیله سایتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین ـ۱ـ بتا تحریک می‌شود که تصور می‌شود نقش مهمی در ایجاد استئوآرتریت دارند(۶).[۱۰] متالوپروتئیناز۱ـ عمدتاً به وسیله سلول‌های غضروفی یا فیبروبلاست در بافت همبند سنتز می‌شود و فراوان‌ترین عضو خانواده متالوپروتئینازها است که نقش مهمی در شکستن غضروف کلاژن ایفا می‌کند(۷). متالوپروتئیناز۳ـ قادر به جدا کردن پروتئین هسته آگریکان و هم‌چنین کلاژن نوع II در غضروف است(۸). در میان متالوپروتئینازهای مختلف، متالوپروتئیناز۱۳ـ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا در اختلالات مفصلی افزایش یافته است و می‌تواند به طور مؤثری باعث از بین رفتن کلاژن نوع II، جزء اصلی ماتریکس غضروف شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در مفاصل آرتریتی، تخریب کلاژن نوع II به دلیل از بین رفتن به وسیله متالوپروتئینازها بیش از حد است(۹). فعالیت متالوپروتئینازها به وسیله مهارکننده بافتی کنترل می‌شود. عدم تعادل بین متالوپروتئیناز و

1- A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs (ADAMTS)

"متالوپروتئیناز ممانعت کننده بافتی" به خوبی شناخته شده است که در پیشرفت آرتروز اهمیت دارد(۱۰). عامل درمانی ایده‌آل برای آرتروزر، علاوه بر کاهش درد و التهاب، باید در برابر تخریب غضروف محافظت کند. درمان‌های فعلی استئوآرتریت شامل؛ تجویز ضد التهاب‌های غیر استروئیدی، گلوکورتیکوئید و هیالورونیک اسید می‌باشد و به طور کلی مبتنی بر کاهش درد و التهاب هستند، اما اثرات محدود و کوتاه مدتی در کنترل علایم و بهبود زندگی بیمار دارند. شایع‌ترین عارضه مصرفی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مانند؛ ایبوپروفن، عوارض گوارشی مانند سوء هاضمه، زخم پپتیک و خون‌ریزی می‌باشد(۱۱). با این حال، داروهای سرکوب کننده سیکلواکسیژناز-۲ مانند سلبرکس(سلکوکسیب) ممکن است برای اثرات نامطلوب بر غضروف مفید باشند. مشاهدات اخیر نشان داده است که سلبرکس(سلکوکسیب) نیز عوارض جانبی دارند و ممکن است خطر بیماری‌های قلبی ـ عروقی را افزایش دهند(۱۲). مداخلات در درمان‌های طبیعی به عنوان مکمل یا جایگزین برای داروسازی سنتی در سال‌های اخیر محبوبیت پیدا کرده است .اسانس‌ها به دلیل فواید دارویی مختلف و سابقه طولانی استفاده در سیستم‌های پزشکی سنتی، توجه بسیاری را در این میان به خود جلب کرده‌اند.

شمعدانی(*Pelargonium graveolens L*، خانواده *Geraniaceae*) یک درختچه معطر مهم با منشاء آفریقای جنوبی، مصر و مراکش است. ترکیبات فرار اسانس برگ شمعدانی حاوی سیترونولول ، ژرانیول و ۱۰ـ گاما ـ اپی ـ اودسمول است(۱۳). شمعدانی عطری که در اسناد سنتی به عنوان شمعدانی، گل سرخ و "شمدانی عطری" نیز شناخته می شود. دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می باشد. اسانس گیاه تازه به دلیل داشتن رایحه مطلوب، در صنعت عطر بسیار مورد استفاده قرار می گیرد. دارای اثرات ضد عفونی کننده و متعادل کننده بر سیستم عصبی است و افسردگی و اضطراب را تسکین می‌دهد(۱۴). به طور سنتی از این گیاه برای درمان انواع علایم از جمله؛ زخم‌ها، تب، سرماخوردگی و گلودرد، التهاب، بواسیر، بیماری‌های دستگاه گوارش سرطان، هیپرگلیسمی، بی‌خوابی، بیماری های قلبی، آسم و تهوع استفاده می‌شود(۱۵). روغن شمعدانی با خواص ضدالتهابی خود، فعالیت میکروگلیال و مسیرهای سیگنالی کلیدی را تعدیل می‌کند و به طور بالقوه التهاب عصبی را در بیماری‌های عصبی کاهش می‌دهد(۱۶). پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) p38 یک جزء جدایی‌ناپذیر از آبشار MAPK است. این کیناز در پاسخ به استرس اکسیداتیو فعال می‌شود و نقش مهمی در تنظیم حالت ردوکس درون سلولی ایفا می‌کند(۱۷).

بر اساس شواهد ارایه شده در بالا، هدف این پژوهش، بررسی اثربخشی و مکانیسم عمل اسانس شمعدانی عطری را بر محافظت از غضروف در مدل استئوآرتریت ناشی از کلاژناز در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. اسانس گیاه مورد نظر از مرکز

ملی ذخایر ژنتیکی وزیستی ایران با غلظت ۱گرم در ۱۵ سی سی خریداری شد. کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در سلول‌های سینوویوسیت و THP-1 در شرایط *in-vitro* و *x-vivo* در پژوهش‌های قبلی این گروه به اثبات رسیده بود(۱۸). نتایج حاکی از اثر بخشی اسانس شمعدانی عطری در مدلی شبیه به استئوآرتریت می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی عطری بر محافظت از غضروف در استئوآرتریت ناشی از کلاژناز در خرگوش نیوزلندی بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰انجام شد. تعداد ۴۰ سر خرگوش سفید نیوزلندی نژاد البینو، شش ماهه به وزن تقریبی ۱/۵-۱ کیلو گرم از مؤسسه انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. دمای داخل حیوانخانه به وسیله دماسنج ۲۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. خرگوش‌ها در طول شبانه روز ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داشتند. روزانه مقدار ۳۰۰ گرم کنسانتره مخصوص خرگوش‌ها به ازای یک کیلوگرم وزن بدن خرگوش و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب برای خرگوش‌ها داده شد. کلیه گروه‌ها به مدت یک ماه برای تطابق با شرایط جدید نگه‌داری شدند. در شروع آزمایش(روز اوّل) پس از بیهوشی با تزریق عضلانی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید(۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و میدازولام هیدروکلراید(۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، هر دو زانوی حیوانات تراشیده و سپس با محلول کلرهگزیدینزین ضدعفونی شدند. همه خرگوش‌ها به غیر از گروه کنترل مثبت با ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلاژناز ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (کلستریدیوم هیستولیتیکوم، نوع II؛ فعالیت آنزیم ۴۲۵ واحد بر میلی‌گرم) و ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی(گروه کنترل مثبت) به صورت داخل مفصلی تزریق شد. همان روش تزریق کلاژناز یک بار دیگر در روز چهارم طبق روش منکین اعمال شد(۱۹). پس از تزریق اولیه کلاژناز(روز اوّل)، خرگوش‌ها به چهار گروه مساوی تقسیم شدند؛ کنترل مثبت به صورت خوراکی با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تیمار۱ و ۲ تحت درمان خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری(۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار ۳ با سلبرکس(سلکوکسیب)(۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۴ درصد)(۲۰)، به صورت روزانه به مدت ۳۰ روز با استفاده از آب خوراکی، مورد تیمار قرار گرفتند. کلیه مراحل این مطالعه حیوانی، بر اساس دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی وزارت علوم، فنون و تحقیقات فناوری کشور جمهوری اسلامی ایران انجام پذیرفت.[۰۱]

تمامی مراحل این تحقیق کاربردی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور واحد شهرری انجام شد. مواد شیمیایی، کیت‌ها، آنتی‌بادی‌های به ترتیب شامل: آنتی‌بادی اوّلیه مهارکننده متالوپروتئیناز-۱ خرگوشی جی-۶[(۱)] شماره

1- Rabbit TIMP-1 primary antibody (G-6)

سریال: sc-365905)، آنتی بادی اوّلیه متالوپروتئیناز-۱۳ خرگوشی[1] شماره سریال: sc-515284)، آنتی‌بادی اوّلیه متالوپروتئیناز-۳ خرگوشی[2] شماره سریال:-sc 21732)، آنتی بادی اوّلیه متالوپروتئیناز-۱ خرگوشی شماره سریال:sc-21731 -sc)کمپانی Santa Cruz Biotechnology (Shanghai)، کلستریدیوم هیستولیتیکوم از شرکت سیگما(هندوستان)، کتامین هیدروکلراید (شماره ثبت:۳-۹۷-۱۲۴۶۸۱۵) و میدازولام هیدروکلراید (شماره ثبت:۸-۹۶-۵۹۴۶۷) از کمپانی مرک(آلمان). Celebrex از کمپانی Pfizer(ایران)، دگزامتازون و ایبوپروفن (شرکت داروسازی اکسیر ایران). معرف تریزول، کلروفرم ایزومیل الکل و 2-Steps RT-PCR و تمامی پرایمرهای مورد استفاده از شرکت سیناژن(ایران) خریداری گردید. اسانس برگ گیاه شمعدانی عطری از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه و بر اساس پروتوکول‌های معمول و در دسترس تهیه شد.

برای ارزیابی سمیت حاد اسانس برگ گیاه شمعدانی عطری پس از یک دوز خوراکی، ۱۰ سر خرگوش نر و ۱۰ سر خرگوش ماده نژاد به طور تصادفی در دو گروه تجربی قرار گرفتند و با گاواژ با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن(۲۱)، تحت درمان قرار گرفتند. مرگ و میر، علایم بالینی، تغییرات وزن بدن، و یافته‌های ناخالص در طول ۳۰ روز پس از درمان بررسی شد. بر اساس دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی وزارت علوم، فنون و تحقیقات فناوری کشور جمهوری اسلامی ایران انجام پذیرفت(۲۲). همه حیوانات تحت درمان زنده ماندند و هیچ عوارض جانبی ظاهری در طول مدت مطالعه سمیت حاد مشاهده نشد. نکته مهم، LD50 خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری بیشتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بود(۲۳). اسانس برگ شمعدانی علی‌رغم داشتن مزایای مختلف، هنوز هم از نظر سمیت یک تهدید است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده برای تحت نظر داشتن، سطح سمیت مواد مختلفی که در غذا یا دارو استفاده می‌شوند، فهرستی را ایجاد کرده است که به‌عنوان فهرست عمومی شناخته شده به عنوان ایمن یا به طور کل ایمن (GRAS)[3] شناخته می‌شود.[۱] این لیست روغن شمعدانی عطری را به عنوان GRAS بین ۱/۶ تا ۲۰۰ قسمت در میلیون می شناسد(۲۴).[۲] در مطالعه‌ای که توسط لالی و همکاران انجام شد، سمیت در شرایط آزمایشگاهی گونه‌های خاصی از شمعدانی عطری مورد بررسی قرار گرفت. لالی و همکاران سمیت را بر حسب مقدار غلظت ممانعت کننده ۵۰ درصد[4] بیان کرد. مقدار IC 50 به عنوان غلظتی تعریف شد که اسانس باید در آن باشد تا ۵۰ درصد رنگ‌زدایی ۲، ۲-دی‌فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل(DPPH) پایدار را ایجاد کند(۲۵).

وزن بدن خرگوش‌ها یک بار در هفته با استفاده از ترازوی الکترونیکی ثبت شد.

1-Rabbit MMP-13 primary antibody(C-3)
2-Rabbit MMP-3 primary antibody (1B4)
3-Generally Recognized as Safe(GRAS)
4-Inhibitory Concentration 50 % (IC50%)

شدت آرتریت روماتوئید در پنجه موش‌ها تحت نظارت روماتولوژیست با استفاده از سیستم امتیازدهی استاندارد دوسوکور ارزیابی شد که در آن ۰=بدون تغییر، ۱=تورم و اریتم انگشت، ۲=تورم خفیف و اریتم اندام، ۳ = تورم و اریتم شدید انگشت، ۴ = تغییر شکل و ناتوانی شدید. امتیاز آرتریت برای هر موش مجموع تمام نمرات پنجه است که بالاترین امتیاز در هر موش ۱۶ خواهد بود(۲۶).

درجه سفتی با میزان حرکت، تورم و قرمزی زانو ارزیابی شد. هر آیتم در مقایسه با خرگوش‌های کنترل به‌عنوان آسیب خفیف، متوسط یا شدید طبقه‌بندی شد. معاینه به وسیله دو ناظر مستقل انجام شد که از گروه‌های درمانی بی‌اطلاع نگه داشته شدند.

۱۲ روز پس از ایمن‌سازی با کلاژن نوعII، ارزیابی ایمنی سلولی با استفاده از روش افزایش حساسیت نوع تاخیری انجام شد. به طور خلاصه، ۵۰ میکروگرم کلاژن نوع II در بافر ۰/۱۵ مولار فسفات(pH ۷/۴) به صورت زیر جلدی به گوش راست خرگوش‌ها تزریق شد. همان حجم بافر فسفات به گوش چپ تزریق شد که به عنوان کنترل استفاده می‌شد. قبل از تزریق، ضخامت هر دو گوش با میکرومتر اندازه‌گیری شد و محل اندازه‌گیری به عنوان محل تزریق مشخص شد. ۲۴ ساعت پس از تزریق، ضخامت گوش دوباره اندازه‌گیری شد. تفاوت ضخامت گوش راست و چپ به عنوان شاخصی از شدت واکنش حساسیت نوع تأخیری استفاده می‌شود(۲۷).

خرگوش‌ها پس از ۴ هفته از تجویز دارو قربانی شدند. غضروف‌ها و بافت‌های سینوویال مفاصل زانو برای بررسی بیان آگرکان، کلاژن نوعII، متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲، ممانعت کننده -۱- متالوپروتئیناز و اینترلوکین ۱- بتا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند(جدول۱). برای لیز کردن سلول‌های مایع مفصلی و جدا سازی RNA، از معرف تریزول شرکت سیناژن و استخراج RNA با کلروفرم ایزومیل الکل انجام پذیرفت. پس از تحریک شدید و انکوباسیون ۳ دقیقه‌ای در دمای اتاق، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و یک فاز آبی حاوی RNA جمع‌آوری گردید.[۰۱] RNA با ایزوپروپیل الکل ته نشین شد و مجدداً در آب بدون RNase حل گردید و در نهایت برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در صورت وجود آلودگی DNA ، از آنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مرحله دوّم سنتز cDNA با استفاده از RNAهای جدا شده انجام شد. به طور خلاصه برای هر نمونه ۱ میکروگرم از RNA به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس -۲ مرحله‌ای در شرایط: دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به cDNA تبدیل گردید. با استفاده از پرایمرهایی اختصاصی (جدول ۱)، برای هر کدام از سایتوکاین‌های مورد مطالعه، ژن خانه دار[۱] انجام گردید و ژن GAPDH به

1-Housekeeping Gene

عنوان ژن رفرانس استفاده شد و فرآورده PCR در آگاروز ژل ۱/۵ درصد کنترل گردید.

PCR در زمان واقعی با استفاده از همان پرایمرهایی که برای PCR کیفی استفاده گردید، انجام شد و از evergreen به عنوان مسترمیکس استفاده شد. نتایج به دست آمده سی‌تی‌های(CTs)[۱] به وسیله دو روش منحنی استاندارد و روش پفافی با فرمول Pfaffi Method ($2^{-\Delta\Delta ct}$) استفاده شد.

مایع سینوویال از مفصل زانو برای اندازه‌گیری فعالیت متالوپروتئیناز-۱ ، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳ و عامل ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ در روز آخر آزمایش کشیده شد. سطوح متالوپروتئینازها و عامل ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱با کیت‌های ELISA طبق پروتکل سازنده اندازه‌گیری شد.

تولید پروستاگلاندین(PGE2) و اکسیدنیتریک(NO) در مایع سینوویال با استفاده از کیت‌های سنجش تعیین شد. سنجش پروستاگلاندین-ای-۲ طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. همچنین نیتریت اکساید به شکل نیتریت با استفاده از معرف Griess طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه، توکی و تی نمونه‌های وابسته تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی نوکلئوتید پرایمرهای مورد استفاده[۱]

نام ژن	پرایمررفت	پرایمربرگشت
آگریکان	5'-TGAGGAGGGCTGGAACAAGT ACC-3'	5'-GGAGGTGGTAATTG CAGGGAACA-3'
کلاژن نوع ۲	5'- AACACTGCCAACGTCCAGAT-3'	5'-CTGACGCACGGTATAGGTGA-3'
اگریگیناز-۱	5'-GTCTGTGTCCAGGGCCGATGC-3'	5'-GCCGCCGAAGGATCTCCA GAA-3'
اگریگیناز-۲	5'-GCGGATGTG TGCAAGCTGACC-3'	5'-AGTAGC CCATGCCATGCAGGA-3'
متالوپروتئیناز-۱	5'- TCAGTTCGTCCTCACTCCAG-3'	5'-TTGGTCCACCTGTCATCTTC-3'
متالوپروتئیناز-۳	5'-ATGGACC TTCTTCAGCAA-3'	5'-TCATTATGTCAGCCTCTC-3'
متالوپروتئیناز-۱۳	5'-AGGAGCATGGCGACTTCTAC-3'	5'-TAAAAACAGCTCCGCATCAA3'
عامل ممانعت کننده متاوپروتئیناز نوع ۱	5'-GCAACTCCGACCTTG TCATC-3'	5'-AGCGTAGGTCTTG GTGAAGC-3'
اینترلوکین ۱ -بتا	5'-TGTAGACCCCAACCGTTACC -3'	5'- AGGAAGACGGGCATGTACTC-3'
گلیسرآلدیئد فسفودی ئیدروژناز	5'-GCT CTCCAGAACATCATCCCTGCC-3'	5'-CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3'

1-Threshold Cycle(CTs)

یافته‌ها

برای ارزیابی سمیت خوراکی حاد اسانس برگ شمعدانی عطری، سمیت دو دوز آن را در هر دو جنس خرگوش با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدن تعیین کردیم. این دوزها هیچ تأثیری بر مرگ و میر، تغییرات وزن بدن، یافته‌های ناخالص و علایم بالینی با تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی در هر دو جنس نداشت.

ابتدا اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر سفتی را با درجه‌بندی تحرک مفاصل سفت خرگوش بررسی شد. خرگوش‌هایی که کلاژناز تزریق کردند و تحت درمان با دارونما به عنوان گروه کنترل قرار گرفتند، تورم، قرمزی و شدیدترین مشکل حرکتی را در یک هفته نشان دادند، که نشان‌دهنده التهاب شدید و واکنش‌های آنزیمی مستقیم در بافت سینوویال و غضروف بود. هنگامی که خرگوش‌ها با اسانس برگ شمعدانی عطری به مدت سی روز تحت درمان قرار گرفتند، سفتی زانو وابسته به دوز بود و به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. اسانس برگ شمعدانی عطری در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در کاهش سفتی مؤثرتر از دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود($p<0/005$)(شکل ۱).

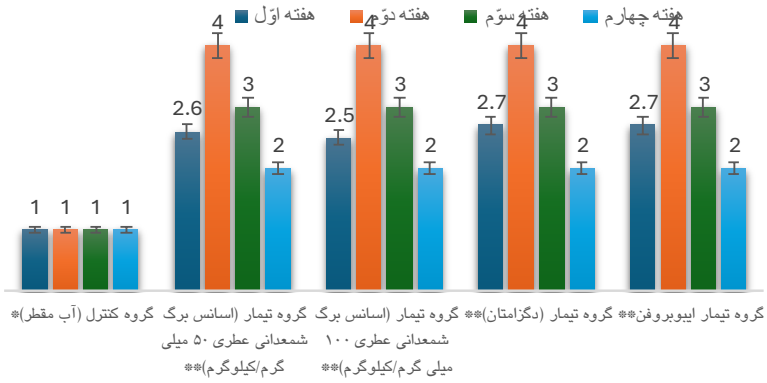
شروع و شدت علایم در خرگوش‌ها همان‌طور که قبلاً در بخش روش‌ها ذکر شد رتبه‌بندی شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت، در تمام خرگوش‌هایی که کلاژن تزریق شده بودند. خرگوش‌های تزریق شده با کلاژناز به عنوان گروه شاهد، تورم، قرمزی و شدیدترین مشکل حرکتی را در یک هفته نشان دادند که نشان دهنده التهاب شدید و واکنش‌های آنزیمی مستقیم در بافت سینوویال و غضروف بود هنگامی که خرگوش‌ها با اسانس شمعدانی عطری(۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سلبرکس به مدت سی روز تحت درمان قرار گرفتند، سفتی زانو به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت($p<0/005$). جالب توجه است که اسانس شمعدانی عطری به اندازه سلبرکس(سلکوکسیب) در به تأخیر انداختن شروع علایم آرتروز مؤثر است(شکل۲).

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش حساسیت تأخیری نشان داد که ضخامت گوش در خرگوش‌های مبتلا به آرتروز ناشی از کلاژن از ۰/۵±۰/۰۵ میلی‌متر در خرگوش‌های سالم به ۰/۹۸ ±۰/۰۳ میلی‌متر در گروه کنترل مثبت افزایش یافت($p<0/005$). با این حال، در حیوانات تحت درمان در مقایسه با کنترل مثبت، ضخامت به طور قابل توجهی کمتر بود($p<0/005$) با گروه مثبت+سلبرکس دارای کمترین مقدار(۰/۶۱±۰/۰۲میلی‌متر) و در گروه تیمار با اسانس شمعدانی عطری ۰/۶۸±۰/۰۳ بود. تفاوت معنی‌داری در ضخامت گوش بین حیوانات تیمار شده با سلبرکس(سلکوکسیب) و اسانس شمعدانی عطری با گروه کنترل سالم وجود نداشت($p<0/005$).

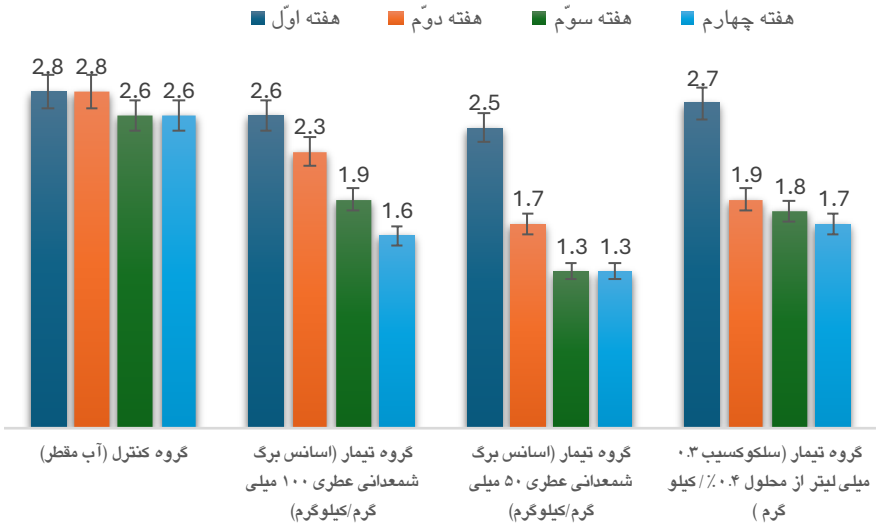
در مفاصل زانو بیان متالوپروتئیناز_۱، متالوپروتئیناز_۳، متالوپروتئیناز_۱۳، اگریگیناز_۱، اگریگیناز_۲ در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه

کنترل منفی به طور قابل توجهی افزایش یافت. در مورد سلول‌های فعال شده، تیمار با اسانس شمعدانی عطری، بیان متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲ به طور قابل توجهی کاهش یافت($p<0/005$)، در حالی که بیان عامل ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ به طور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه کنترل منفی، افزایش یافت($p<0/005$). برعکس، سلبرکس(سلکوکسیب) قادر به تأثیرگذاری بر سطح عامل ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ در مفاصل زانو گروه کنترل مثبت نبود(شکل ۳). برای تأیید، بیان پروتئین متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲ را در غضروف مفصلی یا مایع سینوویال با استفاده از کیت الایزا تعیین کردیم. اسانس شمعدانی عطری بیان متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲را کاهش داد($p<0/005$)، در حالی که تولید عامل ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ به روشی وابسته به دوز در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش پیدا کرده بود($p<0/005$)(شکل ۴).

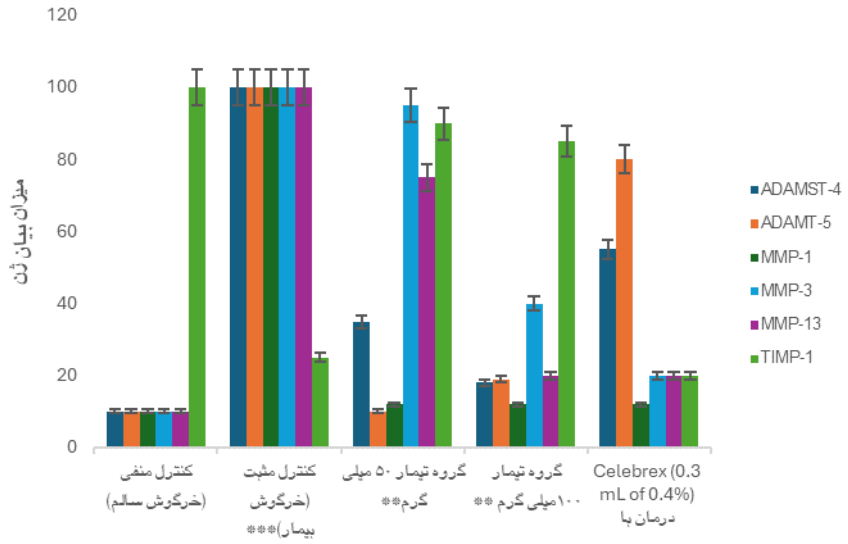
سطوح اینترلوکین ۱- بتاو پروستاگلاندین - ای -۲ هر کدام به طور قابل توجهی به وسیله اسانس برگ شمعدانی عطری به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت($p<0/005$). سلبرکس همچنین تولید اینترلوکین ۱- بتاو پروستاگلاندین - ای -۲ را مهار می‌کند(شکل ۶ و۵). کاهش بیان اینترلوکین ۱- بتاو پروستاگلاندین - ای -۲ در مایع مفصلی به وسیله اسانس برگ شمعدانی عطری، تقریباً مشابع تأثیر سلبرکس(سلکوکسیب) گزارش شد($p<0/005$). میزان تولید نیتریت اکساید در مایع مفصلی در صورت تیمار با اسانس برگ شمعدانی تقریباً ۶۰ درصد کاهش پیدا کرد($p<0/005$) و این کاهش تقریباً قابل مقایسه با تیمار به وسیله سلبرکس(سلکوکسیب) می‌باشد. با این حال، سلبرکس(سلکوکسیب) بر سطح نیتریت اکساید در خرگوش‌های گروه کنترل مثبت تأثیر نداشت($p<0/005$)(شکل ۷).



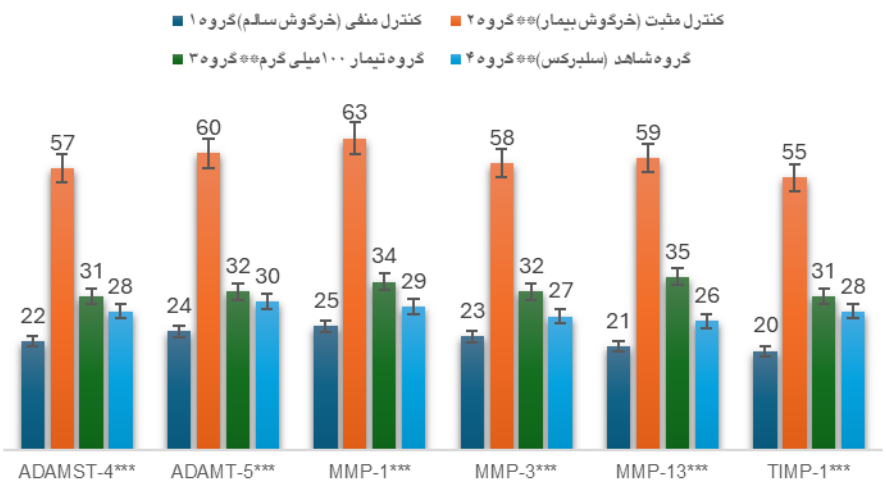
شکل ۱: اثرات اسانس برگ شمعدانی و سلبرکس بر پیشرفت بیماری در آرتروز ناشی از کلاژناز. سفتی با تعیین تحرک مفاصل زانو ارزیابی شد و در مقیاس نسبی ۰ تا ۳ همان طور که در مواد و روش ها توضیح داده شد، درجه بندی شد. مقادیر هر یک نشان دهنده میانگین ± S.E.M. $p<0/05$ و در مقایسه با گروه کنترل مثبت در دو آزمایش مستقل نتایج مشابهی به دست آمد.



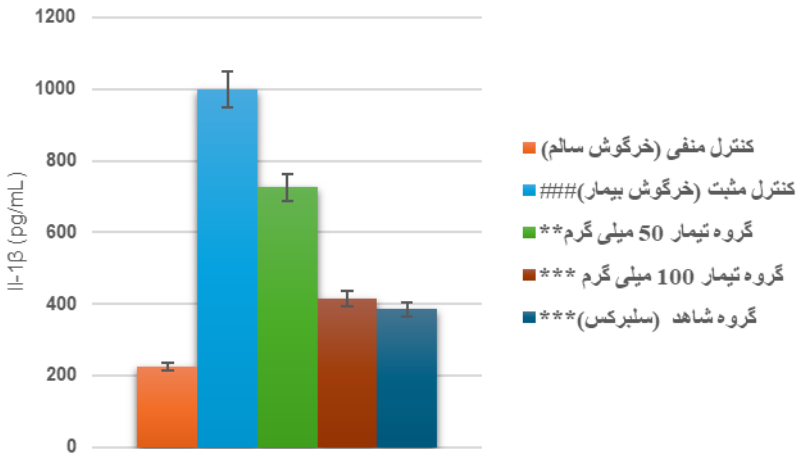
شکل ۲: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری در درمان آرتریت ناشی از کلاژناز. به زانوی راست خرگوش ها در روزهای ۱ و ۴ کلاژناز به صورت داخل مفصلی تزریق شد. خرگوش ها به صورت خوراکی همراه با آب مقطر به عنوان شاهد، اسانس برگ شمعدانی عطری (۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) یا سلکوکسیب (۰/۳ میلی لیتر از محلول ۰/۴ درصد) برای سی روز مورد تیمار قرار گرفتند. سفتی با تعیین تحرک مفاصل زانو ارزیابی شد ودر مقیاس ۳ – ۰ همانطور که در مواد و روش ها شرح داده شد، درجه بندی شد. مقایسه نتایج بین گروه کنترل با سایر گروها اختلاف سطح معنی دار مشخص کرد($p<۰/۰۰۵$). نتایج با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مشابه در دو آزمایش مستقل به دست آمد.



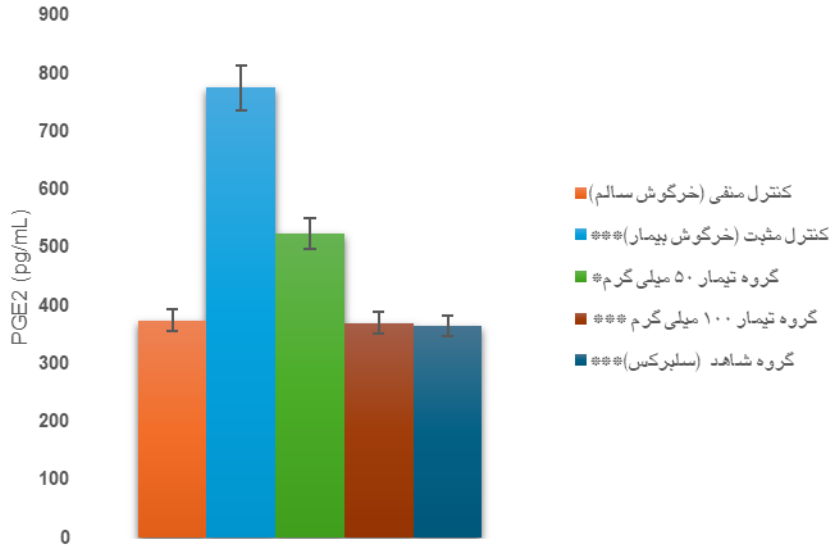
شکل۳: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر سطوح پروتئینازهای ماتریکس در آرتریت ناشی از کلاژناز بیان mRNA ADAMTS-4، ADAMTS 5، MMP-1، MMP-3، MMP-13، و TIMP-1 با روش RT-PCR غضروف خرگوش پس از ۴ هفته تجویز اندازه گیری شد. بیان کمی mRNA ژن ها های مورد نظردر مقایسه با گروه کنترل منفی (خرگوش سالم) و به عنوان درصد بیان ژن GAPDH بیان می شود. هر مقدار گزارش شده میانگین S.E.M ± است. مقایسه نتایج بین گروه کنترل با سایر گروه ها اختلاف سطح معنی دار مشخص کرد ($p<۰/۰۰۵$).. نتایج با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مشابه در دو آزمایش مستقل به دست آمد. نتایج مشابه در دو آزمایش مستقل به دست آمده بود.



شکل ۴: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر سطوح پروتئینازهای ماتریکس در آرتریت ناشی از کلاژناز. بیانmRNA ADAMTS-4، ADAMTS 5، MMP-1، MMP-3، MMP-13، و TIMP-1 با روش ELIZA، ۴ هفته بعد از تجویز اندازه گیری شد. هر مقدار گزارش شده میانگین S.E.M ± میباشد. اختلاف معنی داری بین گروه گنترل با سایر گروه ها در سطح معنی‌دار p<۰/۰۰۰۱ با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مشابه در دو آزمایش مستقل به دست آمد.
Inter-assay % CVs >15 are, Intra-assay % CVs >than 10

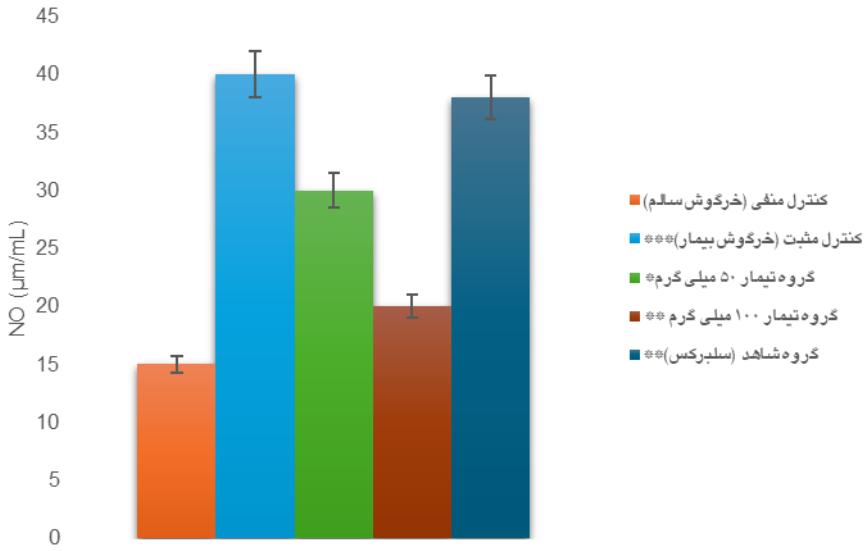


شکل ۵ : اثرات اسانس برگ شمعدانی بر سطوح واسطه های التهابی. سطوح IL-1βفعالیت از مایع سینوویال پس از سی روز به روش ELISA از تجویز قرار گرفت. مقادیر هر کدام به صورت میانگین S.E.M ± نشان داده می شوند، اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با سایر گروه ها در سطح معنی‌دار p<۰/۰۰۰۱ با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.
Inter-assay % CVs >15
Intra-assay % CVs > 10



شکل۶ : اثرات اسانس برگ شمعدانی بر سطوح واسطه های التهابی. سطوح تولید PGE2 از مایع سینوویال سی روز پس از تجویزبه روش ELISA مورد اندازه گیری قرار گرفت. مقادیر هر کدام به صورت میانگین ± S.E.M نشان داده می‌شوند اختلاف معنی‌داری بین گروه های کنترل با سایر گروه ها در سطح معنی‌دار p<۰/۰۵ با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

Inter-assay % CVs >15
Intra-assay % CVs > 10



شکل۷ : اثرات اسانس برگ شمعدانی بر سطوح واسطه های التهابی. سطوح تولید NO از مایع سینوویال سی روز پس از تجویزبه روش grease مورد اندازه گیری قرار گرفت. مقادیر هر کدام به صورت میانگین ± S.E.M نشان داده می شوند اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با سایر گروه ها در سطح معنی‌دار p<۰/۰۵ با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

Inter-assay % CVs >15
Intra-assay % CVs > 10

بحث

استئوآرتریت یکی از علل اصلی ناتوانی در جمعیت مسن و دلیل اصلی جراحی‌های تعویض مفصل ران و زانو در سراسر جهان است. برآوردهای قبلی نشان داده است که به ترتیب حدود ۱۰ و ۱۸ درصد از مردان و زنان بالای ۶۰ سال در سراسر جهان از استئوآرتریت رنج می‌برند که نه تنها باعث درد شدید و ناتوانی جسمی می‌شود، بلکه بار اقتصادی ـ اجتماعی عظیمی را نیز به همراه دارد. درمان‌های فعلی برای بیماران استئوآرتریت شامل؛ درمان‌های محافظه‌کارانه مانند کاهش وزن، فیزیوتراپی و تمرینات عضلانی، درمان‌های دارویی مانند داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، استروئیدها و تزریق هیالورونات سدیم و درمان‌های جراحی مانند: میکروفراکچر، استئوتومی و آرتروپلاستی است. با این حال، تا به امروز، این درمان‌ها نتایج کلی نامطلوبی را در بیماران مبتلا به آرتروز نشان داده‌اند، که عمدتاً به دلیل این واقعیت است که متوقف کردن پیشرفت دژنراسیون غضروف دشوار است. به عنوان مثال، تزریق داخل مفصلی پلاسمای غنی از پلاکت در پیگیری شش ماهه، عملکرد حرکتی و حرکات در مفاصل بیماران مبتلا به آرتروز را به طور مؤثر بهبود نبخشید. علاوه بر این، چندین روش درمانی نوظهور، مانند: کاشت کندروسیت اتولوگ، کاشت کندروسیت اتولوگ مبتنی بر ماتریکس و پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی ، نتایج اولیه امیدوارکننده‌ای را نشان داده‌اند. با این حال، کاربرد بالینی بیشتر آنها به دلیل ناهمگونی فردی و منبع کندروسیت‌های اتولوگ محدود شده است. علاوه بر این، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داده است که شواهد مربوط به درمان مبتنی بر مالتیپل اسکلروزیس برای آرتروز قابل بحث است(۲۸). لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی عطری بر محافظت از غضروف در استئوآرتریت ناشی از کلاژناز در خرگوش نیوزلندی بود.

در این مطالعه، اثربخشی قابل توجه تجویز خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری را در مدل آرتروز ایجاد شده در خرگوش در برابر تخریب مفصل نشان دادیم. به نظر می‌رسد این اثر محافظتی اسانس برگ شمعدانی عطری از کنترل اجزای کلیدی در پاتوژنز آرتروز، از جمله کاهش آگرکانازها و متالوپروتئینازها و افزایش ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ ناشی می‌شود. تجویز خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری منجر به تغییرات قابل شگرفی در درجه سختی مفصل شد. در استئوآرتریت، افزایش بیان آگرکانازها و متالوپروتئینازها نقش مهمی در تخریب ماتریکس خارج سلولی دارند(۲۹). بنابراین، کاهش آگرکانازها و متالوپروتئینازها و افزایش تنظیم ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ اهداف درمانی معقولی برای درمان مجدد آرتریت خواهند بود. اسانس برگ شمعدانی عطری به طور قابل توجهی سطح متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲ را کاهش داد و سطح ممانعت کننده متالوپروتئیناز-۱ را

در گروه کنترل مثبت افزایش داد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اسانس برگ شمعدانی عطری دارای تأثیر بسیار شگرفی در محافظت از غضروف از طریق آگرکانازها، متالوپروتئینازها و ممانعت کننده متالوپروتئیتناز-۱ می‌باشند. که منجر به مهار تخریب غضروف در مقایسه با سسلبرکس می‌شود. چندین مطالعه آزمایشگاهی اخیر نشان داد که سسلبرکس قادر به بهبود و حتی بازیابی اختلالات عملکرد غضروف، هم در شرایط التهابی و هم در شرایط بیماری استئوآرتریت می‌باشد و برای جلوگیری از اثرات نامطلوب داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی سنتی توصیه میشوند (۳۰).

در این مطالعه اسانس برگ شمعدانی عطری به طور قابل توجهی منجر به کاهش سطح بیان متالوپروتئیناز-۱، متالوپروتئیناز-۳، متالوپروتئیناز-۱۳، اگریگیناز-۱، اگریگیناز-۲ و افزایش سطح بیان ممانعت کننده متالوپروتئیتناز-۱ می‌شود. با این حال، بیان اگریگیناز-۲، متالوپروتئیناز-۳ و ممانعت کننده متالوپروتئیتناز-۱ مفصل در گروه تحت درمان با سلبرکس در گروه شاهد مثبت تغییری نداشته است. در مطالعه دیگر در آرتروز ایجاد شده در خرگوش‌ها، با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم از اسانس برگ شمعدانی عطری، مشخص گردید تیمار با دوز کمتر جلوگیری از کاهش بیان و تولید اگریکان و کلاژن تیپ ـ۲ می‌کند و در عین حال باعث افرایش بیان این دو نیز می‌گردد. البته تغییر اگریکان و کلاژن تیپ ـ۲ در گروه درمان با سلبرکس مشاهده نگردید. این نتایج نشان می‌دهد اسانس برگ شمعدانی عطری از تخریب غضروف در آرترز ایجاد شده در خرگوش‌ها جلوگیری می‌کند. چندین مطالعه آزمایشگاهی نقش سلبرکس را در بهبود و ترمیم غضروف‌های آسیب دیده در التهاب و آرتروز به طور کاملاً واضحی بیان نموده‌اند(۳۱ و ۳۰). نتایج حاضر نشان می‌دهد که اسانس برگ شعدانی عطری در مقایسه با سلبرکس دارای نقش محافظت از غضروف از طریق آگرکانازها، متالوپروتئینازها و ممانعت کننده متالوپروتئیتناز-۱می‌باشد که منجر به مهار تخریب غضروف می‌شود.

متالوپروتئینازها، اگریگیناز-۱ و اگریگیناز-۲ اندوپپتیدازهای وابسته به روی هستند که نقش مهمی در تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در اشکال مختلف آرتریت و سایر بیماری‌ها دارند. و اگریگیناز-۲ آنزیم اصلی مسئول تخریب آگرکان غضروف مفصلی در غضروف موش است، مدل آرتروز ایجاد شده در موش، هدف مناسبی برای توسعه داروهای جدید باشد (۳۱). حذف دوگانه اگریگیناز-۱ و اگریگیناز-۲ در موش منجر به محافظت قابل توجهی در برابر تخریب پروتئوگلیکان می‌شود که با حذف و اگریگیناز-۲ به تنهایی قابل مقایسه است و از شدت بیماری آرتروز در موش جلوگیری می‌کند و و اگریگیناز-۲ در بررسی‌هایی در شرایط *in vivo, in vitro* و *ex vivo* به عنوان یک هدف در آرتروز تأیید کرده است(۳۲). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که آزاد شدن کلاژن و پروتئوگلیکان از غضروف صدمه دیده در آرتروز، با استفاده از یک مهارکننده می‌تواند

از رونویسی متالوپروتئیناز جلوگیری کند(۳۳). همچنین گزارش شده است که افزایش سطح متالوپروتئیناز۳ با مرگ سلولی و شکستگی غضروف(پروتئوگلیکان و کلاژن) در مدل‌های آرتروز همراه است(۳۴). اعتقاد بر این است که واسطه‌های التهابی مانند سایتوکین‌های التهابی پروستاگلاندین ای-۲ و نیتریت اکساید نقش کلیدی در پیشرفت تخریب غضروف در آرتروز دارند(۳۵)، به ویژه، اینترلوکین ۱-بتا نه تنها پروستاگلاندین ای-۲ و نیتریت اکسایتولید می‌کند، بلکه بیان متالوپروتئینازها را نیز تحریک می‌کند(۳۶). پروستاگلاندین ای-۲ یک واسطه پاتولوژیک مسئول بازسازی غضروف و استخوان است (۳۷). نیتریت اکساید یک مولکول پیام رسان رادیکال آزاد چند منظوره است که در فرآیند کاتابولیک آرتروز نقش دارد، نیتریت اکساید سنتز پروتئوگلیکان و کلاژن را مهار می‌کند و در نتیجه باعث تخریب غضروف می‌شود (۳۸). اسانس برگ شمعدانی عطری سطح واسطه‌های التهابی از جمله پروستاگلاندین ای-۲ و نیتریت اکسایتولید و همچنین سیتوکین پیش‌التهابی اینترلوکین ۱-بتا را کاهش می‌دهد که همگی به عنوان القا کننده متالوپروتئیتازها و آگرکانازها شناخته می‌شوند. این نتایج نشان می‌دهد که تجویز خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری از مولکول‌های التهابی پاتولوژیک در تخریب غضروف آرتروز جلوگیری می‌کند. به خوبی شناخته شده است که میلیون‌ها بیمار مبتلا به استئوآرتریت در نتیجه مصرف داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی ، تسکین درد مفاصل و بهبود تحرک را تجربه کرده‌اند. علی‌رغم اثربخشی و استفاده جهانی آنها در درمان استئوآرتریت، نقش داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی ها در مدیریت استئوآرتریت به دلیل اثرات منفی داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی ها بر غضروف و فراوانی و شدت احتمالی عوارض جانبی مورد بحث است.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و این که تأثیر اسانس برس شمعدانی عطری تقریباً شبیه سلبرکس می‌باشد، برای بررسی و ارزیابی لیگان‌های شیمیایی و گیاهی از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشرفته مانند داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی مولکولی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجویز خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری در مقایسه با سلبرکس اثرات درمانی قابل توجهی بر روی آرتروز ایجاد شده در خرگوش دارد واین تأثیر از طریق کنترل سطوح آگرکاناز، متالوپروتئینازها/ ممانعت کننده متالوپروتئیتناز-۱ و واسطه‌های التهابی ایجاد می‌گردد و عوارض جانبی ندارد، بنابراین، با توجه به تأثیر مناسب در کاهش التهاب و ترمیم غضروف به عنوان یک داروی پیشنهادی عالی برای توسعه بیشتر به عنوان یک درمان جایگزین برای آرتروز پیشنهاد می شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مطالعه از زحمات تمامی دانشجویان نامبرده که در تمامی مراحل پروژه های خود(به خصوص در تعطیلات آخر هفته و عید نوروز) صمیمانه شرکت کرده بودند، بسیار سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافعی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

حمایت مالی

تمامی هزینه‌های این پروژه به وسیله فرشته جولا، مائده عمادی و الهام خاکزاد، احسان علیجانی، امیر اکبرنژاد اشکلکی، علی محب و حسین مقصودی تأمین گردید.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه مقطع تحصیلی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک با کد اخلاق IR.PNU.ERC.1398.158 می‌باشد

مشارکت نویسندگان

طراحی ایده و روش کار حسین مقصودی، غلامرضا بخشی خانگی، جمع‌آوری داده‌ها به وسیله فرشته جولا، تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله حسین مقصودی، نظارت به وسیله حسین مقصودی و فرشته جولا، دیریت پروژه تحت نظر حسین مقصودی، نگارش(پیش‌نویس): فرشته جولا نگارش(بررسی و ویرایش): حسین مقصودی انجام پذیرفت.

REFERENCES

1.Yunus MH, Nordin A, Kamal H. Pathophysiological perspective of osteoarthritis. Medicina 2020; 56(11): 614.
2.Nakamura H, Vo P, Kanakis I, Liu K, Bou-Gharios G. Aggrecanase-selective tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) protects articular cartilage in a surgical mouse model of osteoarthritis. Scientific reports 2020; 10(1): 1-9.
3.Siebuhr AS, Werkmann D, Bay-Jensen AC, Thudium CS, Karsdal MA, Serruys B, et al. The anti-adamts-5 nanobody M6495 protects cartilage degradation ex vivo. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21(17): 5992.
4.Cilek MZ, de Vega S, Shiozawa J, Yoshinaga C, Miyamae Y, Chijiiwa M, et al. Synergistic upregulation of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by cytokines and its suppression in knee osteoarthritic synovial fibroblasts. Laboratory Investigation 2022;102(1): 102-11.
5.Wojdas M, Dąbkowska K, Winsz-Szczotka K. Alterations of extracellular matrix components in the course of juvenile idiopathic arthritis. Metabolites 2021; 11(3): 132.
6.Wang B, Shao Z, Gu M, Ni L, Shi Y, Yan Y, et al. Hydrogen sulfide protects against IL-1β-induced inflammation and mitochondrial dysfunction-related apoptosis in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis. Journal of Cellular Physiology 2021; 236(6): 4369-86.
7.Mehana ES, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. Life Sciences 2019; 234: 116786.
8.Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. Cells 2020; 9(5): 1076.
9.Chen H, Qin Z, Zhao J, He Y, Ren E, Zhu Y, et al. Cartilage-targeting and dual MMP-13/pH responsive theranostic nanoprobes for osteoarthritis imaging and precision therapy. Biomaterials 2019; 225: 119520.
10.Cassuto J, Folestad A, Göthlin J, Malchau H, Kärrholm J. Concerted actions by MMPs, ADAMTS and serine proteases during remodeling of the cartilage callus into bone during osseointegration of hip implants. Bone Reports 2020; 13: 100715.
11.Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options. Medical Clinics 2020; 104(2): 293-311.
12.Arora M, Choudhary S, Singh PK, Sapra B, Silakari O. Structural investigation on the selective COX-2 inhibitors mediated cardiotoxicity: A review. Life Sciences 2020; 251: 117631.
13.Boukhris M, Simmonds MS, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, Pelargonium graveolens. Phytotherapy Research 2013; 27(8): 1206-13.
14.Lavasanijou MR, Sohrabi HR, Karimi M, Ashjazade MA, Salajeghe M, Farzineejadizadeh H, et al. Wound healing effects of quercus brantii and Pelargonium graveolens extracts in male wistar rats. Wounds 2016; 28(10): 369-75.
15. Verma RK, Yadav A, Verma RS, Rahman LU, Khan K. Intercropping of aromatic crop Pelargonium graveolens with Solanum tuberosum for better productivity and soil health. Journal of Environmental Biology 2014; 35(6): 1165.
16.Stojanović NM, Ranđelović PJ, Simonović M, Radić M, Todorović S, Corrigan M, et al. Essential Oil Constituents as Anti-Inflammatory and Neuroprotective Agents: An Insight through Microglia Modulation. International Journal of Molecular Sciences 2024; 25(10): 5168.
17.Gong X, Ivanov VN, Hei TK. 2, 3, 5, 6-Tetramethylpyrazine(TMP) down-regulated arsenic-induced heme oxygenase-1 and ARS2 expression by inhibiting Nrf2, NF-κB, AP-1 and MAPK pathways in human proximal tubular cells. Archives of Toxicology 2016; 90: 2187-200.
18.Sheikhi F, Maghsoudi H. Comparative study of anti-inflammatory effects of pelargonium graveolens leaf essential oil with steroids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and piascledine via pro- inflammatory cytokine gene expression. Thesis, Payame Nour Unversity Tehran Iran
19.Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. Osteoarthritis Cartilage 1998; 6: 177–186.
20. Jiang D, Zou J, Huang L, Shi Q, Zhu X, Wang G, et al. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis. International Journal of Molecular Sciences 2010; 11(10): 4106-13.
21.Oukhatem MN, Kameli A, Ferhat MA, Saidi F, Mekarnia M. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. Libyan Journal of Medicine 2013; 8(1): 25431.

22.Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh Ardakani E, Sadighi J, Aldavood SJ, Farajli Abbasi M, Farzad-Mohajeri S, et al. Guideline for the care and use of laboratory animals in Iran. Lab Animal 2021; 50(11): 303-5.
23.Boukhatem MN, Kameli A, Ferhat MA, Saidi F, Mekarnia M. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. Libyan Journal of Medicine 2013; 8(1): 22520.
24.Schlosser KK. The Herb Society of America's Essential Guide to Growing and Cooking with Herbs. LSU Press; 2007.
25.Lalli JY, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Viljoen AM. In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species. South African Journal of Botany 2008; 74(1): 153-7.
26.Khalifeh MS, Hananeh W, Al-Rukibat R, Okour O, Boumezrag A. Clinical and histopathological evaluation of MDP/collagen induced arthritis rat model (MCIA) after treatment with Urtica dioica, Plantago major and Hypericum perforatum L herbal mixture. Experimental Animals 2008; 57(2): 101-10.
27.Mehling R, Schwenck J, Lemberg C, Trautwein C, Zizmare L, Kramer D, Müller A, et al. Immunomodulatory role of reactive oxygen species and nitrogen species during T cell-driven neutrophil-enriched acute and chronic cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions. Theranostics 2021; 11(2): 470.
28.Richard MJ, Driban JB, McAlindon TE. Pharmaceutical treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2023; 31(4): 458-66.
29.Verma P, Dalal K. Adamts-4 and Adamts-5: key enzymes in osteoarthritis. Journal of Cellular Biochemistry 2011; 112(12): 3507-14.
30.Cheleschi S, Calamia V, Fernandez-Moreno M, Biava M, Giordani A, Fioravanti AE. In vitro comprehensive analysis of VA692 a new chemical entity for the treatment of osteoarthritis. International Immunopharmacology 2018; 64: 86-100.
31.Malemud CJ. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. Biochemical Pharmacology 2019; 165: 33-40.
32.Santamaria S. ADAMTS-5: A difficult teenager turning 20. International Journal of Experimental Pathology 2020; 101(1-2): 4-20.
33.Young DA, Barter MJ, Wilkinson DJ. Recent advances in understanding the regulation of metalloproteinases. F1000Research 2019: 8; 195.
34.Neogi T, Krasnokutsky S, Pillinger MH. Urate and osteoarthritis: evidence for a reciprocal relationship. Joint Bone Spine 2019; 86(5): 576-82.
35.Yunus MH, Nordin A, Kamal H. Pathophysiological perspective of osteoarthritis. Medicina 2020; 56(11): 614.
36.Jin H, Wang Q, Wu J, Han X, Qian T, Zhang Z, et al. Baicalein inhibits the IL-1β-induced inflammatory response in nucleus pulposus cells and attenuates disc degeneration in vivo. Inflammation 2019; 42(3): 1032-44.
37.Cheng H, Huang H, Guo Z, Chang Y, Li Z. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. Theranostics 2021; 11(18): 8836.
38.Omnia S, Hadeer SS, Gaafar NK, El SE, Noeman M. The Effect of Ethyl Pyruvate on High Mobility Group Box I and Oxidative Stress in Induced Rheumatoid Arthritis in Rats. The Medical Journal of Cairo University 2019; 87: 2547-54.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal(YUMSJ)

Original Article

The Effect of Geranium Leaf Essential oil *Pelargonium graveolens* on the Expression of MMPs, IL-1β, NO, and PGE2 in Collagenase-induced Arthritis in Rabbits

Maghsoudi H[1*], Jola F[2], Bakhshi Khanegi GH[2]

[1]Department of Biotechnology, Payam Noor University, Tehran, Iran, [2]Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran.

Received Date: 25 Jan 2025 Accepted Date: 24 Jun 2025

Abstract

Background & aim: Chronic diseases, including osteoarthritis, are often debilitating due to their progressive course and affect the quality of life of the elderly. Among herbal products, Geranium aromaticum can be considered as a potential natural medicine due to the antioxidant properties in its leaf essential oil. Therefore, the aim of the present study was to determine the effect of Geranium aromaticum leaf essential oil on cartilage protection in collagenase-induced osteoarthritis in New Zealand rabbits.

Methods: The present experimental study was conducted in 2020. Forty rabbits were enrolled in the study and randomly divided into eight groups. Therefore, after preparing the plant essential oil, the rabbits were kept for 1 month to adapt to the laboratory conditions. Collagenase was injected intra-articularly into the right knees of the rabbits. Thirty days after the development of collagenase-induced osteoarthritis, the rabbits were orally administered distilled water (positive control), 50 and 100 mg/kg of geranium essential oil, and celecoxib (0.3 ml of a 0.4% solution) once a day for 30 days. The collected data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey's test, and dependent sample t-test.

Results: The results of the present study indicated that Geranium essential oil significantly reduced the stiffness and hardness of articular cartilage in affected rabbits ($p<0.005$). The expression of type II collagen, proteoglycan, and aggrecan was significantly increased in the knee joints of rabbits treated with the essential oil group ($p<0.005$). However, celecoxib had no effect on cartilage protection. The expression levels of aggreginase-1 and aggreginase-2, metalloproteinases 1, 3, and 13 were dose-dependently decreased in the essential oil-treated group ($p<0.005$). In contrast, the level of tissue inhibitory metalloproteinase was dose-dependently increased. Proinflammatory cytokines involved in cartilage destruction, such as interleukin-1-beta ($p<0.005$), inflammatory mediators including prostaglandins ($p<0.005$), and neurite oxide ($p<0.005$), were also inhibited in the essential oil-treated group.

Conclusion: These results indicated that the effect of Geranium aromaticum leaf essential oil has significant therapeutic effects on the protection of affected cartilage, compared to Celebrex, through the reduction of the expression of inflammatory mediators and aggrecanases and metalloproteinases. Therefore, considering its favorable effect in reducing inflammation and repairing cartilage, it was proposed as an excellent drug candidate for further development as an alternative treatment for osteoarthritis

Keywords: Osteoarthritis, Geranium, Celecoxib, Proteoglycan, Aggrecan

***Corresponding author: Maghsoudi H,** Department of Biotechnology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Email: drhmaghssoudi@pnu.ac.ir

Please cite this article as follows: Maghsoudi H, Jola F, Bakhshi Khanegi GH. The Effect of Geranium Leaf Essential oil *Pelargonium graveolens* on the Expression of MMPs, IL-1β, NO, and PGE2 in Collagenase-induced Arthritis in Rabbits. Armaghane-danesh 2025; 30(2):184-202.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal