

# تأثیر اسانس برگ شمعدانی بر سطح بیان گلوکاتیون، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در استئوآرتریت القا شده در مفاصل زانو خرگوش

حسین مقصودی<sup>۱\*</sup>، فرشته جولا<sup>۲</sup>، غلامرضا بخشی خانگی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، آگروه بیولوژی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران  
تاریخ وصول: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۶

## چکیده

زمینه و هدف: تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد موجب آپوپتوز استئوکندروسیت‌ها و تخریب ماتریکس خارج سلولی می‌شود که در نهایت به بروز نقایص استئوکندرال منجر می‌گردد. از آن جا که اسانس برگ شمعدانی عطری (Pelargonium graveolens) دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است، این مطالعه با هدف تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی بر سطح بیان گلوکاتیون، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در استئوآرتریت القا شده در مفاصل زانو خرگوش بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ بر روی ۳۰ سر خرگوش نژاد نیوزیلندی انجام گرفت. 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، برای خرگوش‌ها به صورت خوراکی با آب مقطر (کنترل مثبت)، اسانس برگ شمعدانی عطری ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و سلوکسیب (۴/۰ درصد در ۰/۳ میلی لیتر) یک بار در روز به مدت ۳۰ روز تجویز شدند. در پایان هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم، سطوح SOD، MDA، GSH و ۸-OHdG در خون محیطی و مایع سینوویال اندازه‌گیری شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه، توکی و تی تجزیه و تحلی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در گروه تیمار با اسانس شمعدانی، سطوح GSH و SOD در هفته‌های هشتم و دوازدهم به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ( $p < 0/05$ ). همچنین بیان MDA و ۸-OHdG در گروه کنترل مثبت روند افزایشی داشت، در حالی‌که در گروه تیمار کاهش قابل توجهی مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: اسانس برگ شمعدانی عطری با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش بیان GSH و SOD و کاهش بیان شاخص‌های استرس اکسیداتیو MDA و ۸-OHdG می‌تواند نقش حفاظتی در برابر آسیب‌های استئوکندرال ناشی از استرس اکسیداتیو ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: اسانس برگ شمعدانی عطری، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین، گلوکاتیون

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

Email: drhmaghssoudi@pnu.ac.ir

"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 می‌شوند."

## مقدمه

امروزه الگوی شیوع بیماری، از بیماری‌های عفونی حاد به بیماری‌های مزمن غیرواگیر مانند؛ اختلالات اسکلتی - عضلانی مزمن به دنبال پیری جمعیت تغییر کرده است. میزان شیوع اختلالات اسکلتی - عضلانی بسیار زیاد و تأثیر آنها هم گسترده است. یکی ناتوانی‌های جسمی مانند اختلالات اسکلتی - عضلانی با درصد ابتلاء ۱/۷۱ بلیون استئوآرتریت با میزان ابتلاء بسیار بالا به عنوان مسایل اساس به وسیله سازمان بهداشت جهانی در نظر گرفته شده است. شایع‌ترین اختلالات اسکلتی عضلانی، با علت اصلی درد و ناتوانی اسکلتی عضلانی در سالمندان همراه با عوارض جانبی مانند؛ کاهش کیفیت زندگی، هزینه درمانی بسیار سنگین در بین سالمندان و آرتروز زانو است. آرتروز زانو شامل تخریب غضروف همراه با درد در داخل و اطراف مفصل زانو و همچنین سفتی مفاصل و کاهش دامنه حرکتی است که در نهایت منجر به ضعف عضلانی می‌شود و بزرگترین علت ناتوانی عملکردی است(۱). به طور کلی، اولین علامت آرتروز زانو درد مفاصل است و در بیماران بالای ۵۵ سال، درد زانو اغلب با آرتروز همراه است. تقریباً ۲۵ درصد از بزرگسالان بالای ۵۵ سال حداقل سالی یک بار زانو درد را تجربه می‌کنند که احتمالاً نشانه‌ای از آرتروز زانو زمینه‌ای است. آرتروز زانو سالانه ۸۰ درصد از افراد مسن و ۲۷ میلیون نفر را در ایالات متحده تحت تأثیر قرار می‌دهد و هزینه درمان آنها سالانه ۱۸۵/۵ میلیارد دلار

است. شیوع آرتروز زانو در منطقه آسیا و اقیانوسیه ۷/۵ درصد است. میزان شیوع در چین ۵/۷۸ درصد، در کره جنوبی ۱۲/۴ درصد، در روستاهای هند ۲۲ درصد، در جمعیت روستایی پاکستان شمالی ۲۵ درصد و در بنگلادش ۱۰/۲ درصد است(۲). علاوه بر افزایش سن و چاقی، جنسیت، سطح فعالیت بدنی، استعداد ژنتیکی و آسیب نیز از عوامل خطر آرتروز زانو هستند. با توجه به این که بار بیماری‌های مرتبط با سن مانند استئوآرتریت در بین کشورهای در حال توسعه به طور قابل توجهی تسریع شده است، افزایش چشمگیر شیوع آرتروز به ویژه در کشورهای آسیایی به وسیله محققین گزارش شده است. تخریب غضروف مفصلی یکی از تظاهرات پیشرفت استئوآرتریت است. التهاب و عوامل متابولیک به عنوان عوامل پایه پاتولوژیک ضروری استئوآرتریت محسوب می‌شوند. استئوآرتریت به عنوان یک آرتروپاتی غیرالتهابی اولیه در نظر گرفته شده است، زیرا نوتروفیل‌ها در مایع سینوویال وجود ندارند و تظاهرات سیستمیک التهاب نیز وجود ندارد(۳). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین سیستم‌های اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و بافت‌ها است و نتیجه تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیداتیو و گونه‌های اکسیژن فعال مرتبط رادیکال‌های آزاد است. تعداد زیادی از پژوهش‌ها ارتباط نزدیک استرس اکسیداتیو ناشی از تولید آهسته رادیکال‌های آزاد درون‌زا را به نقایص استئوکندری تأیید شده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، باعث آپوپتوز

استئوکلندروسیت و تخریب ماتریکس خارج سلولی می‌شود که در نهایت منجر به نقص استئوکلندرال می‌شود (۴). بیومارکرهای اصلی استرس اکسیداتیو عبارتند از: گلو تاتیون<sup>(۱)</sup>، مالون دی‌آلدئید<sup>(۲)</sup>، سوپراکسید دیسموتاز<sup>(۳)</sup> و 8-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین<sup>(۴)</sup>. استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن در بدن تعریف می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن بسیاری از ترکیبات بیولوژیکی را هدف قرار می‌دهد، اما عمدتاً لیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه را مورد هدف قرار می‌دهد. هنگامی که این مولکول‌های زیستی تحت پراکسیداسیون قرار می‌گیرند، واکنش زنجیره‌ای در سه مرحله تکامل می‌یابد: شروع، انتشار و خاتمه، با محصولات واکنش‌پذیر مختلفی که در هر مرحله تولید می‌شوند (۵).

مالون دی‌آلدئید همراه با سایر آلدئیدها، یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است که به بهترین وجه مورد مطالعه قرار گرفته است. مالون دی‌آلدئید می‌تواند هم از طریق یک مسیر آنزیمی، مشابه ترومبوکسان A2 و پروستاگلاندین‌ها، و هم از طریق یک فرآیند غیر آنزیمی تولید شود. مالون دی‌آلدئید فقط یک نشانگر زیستی استرس اکسیداتیو نیست، بلکه یک ترکیب فعال بیولوژیکی است که چندین نقش بیولوژیکی دارد. با توجه به چندین عملکرد بیولوژیکی آن، مالون دی‌آلدئید می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی

پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای سلولی در هنگام تولید از طریق فرآیند آنزیمی و به عنوان یک القا کننده بیان ژن کلاژن در سلول‌های کبدی در نظر کذفته می‌شود (۶). مالون دی‌آلدئید از طریق یک فرآیند غیر آنزیمی تولید می‌شود و با سایر مولکول‌های زیستی مانند؛ پروتئین‌ها، گروه‌های آمینه و DNA برای تولید تعداد زیادی از ترکیب‌های افزایشی در تعامل است که در نهایت منجر به یک اثر ژنوتوکسیک<sup>(۵)</sup> می‌شود. نشان داده شده است که مالون دی‌آلدئید به عنوان جهش‌زاترین مولکول در بین محصولات نهایی گونه‌های فعال اکسیژن است (۷).

گلو تاتیون یک یوبیکوتین تیول تری پپتید<sup>(۶)</sup> است که در طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله؛ کاردیومیوسیت‌ها، سلول‌های کبدی و کلوبول‌های قرمز یافت می‌شود. تقریباً ۹۰ درصد گلو تاتیون در سیتوزول با مقدار کم و به میزان قابل توجهی در میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی یافت می‌شود. گلو تاتیون از گلو تامات، سیستئین و گلیسین، با پیوند ۷-کربوکسیل بین گلو تامات و سیستئین گلو تاتیون سنتز می‌شود، که فقط در معرض هیدرولیز به وسیله گاما گلو تامیل ترانس پپتیداز است. گلو تاتیون دارای عملکردهای مهم بیولوژیکی از جمله از بین بردن رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن برای کاهش استرس اکسیداتیو، سیگنال‌دهی در آپوپتوز، تعدیل فرآیند سلولی مانند پاسخ ایمنی، سنتز DNA، سم‌زدایی الکتروفیل‌ها و به عنوان مخزن سیستئین عمل می‌کند.

اهدای الکترون به گونه‌های فعال اکسیژن و بازسازی در سراسر مکانیسم کاتالیزوری دارند. این کوفاکتورها تمایل به انتقال الکترون به گونه‌های فعال اکسیژن و بازسازی در سراسر مکانیسم کاتالیزوری دارند (۱۱).

۸- هیدروکسی دزاکسی گوانوزین شایع‌ترین ضایعه پایه که به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود گوانین است و یک گروه هیدروکسیل به موقعیت هشتم پایه پورین اضافه می‌شود که منجر به تشکیل ۸- هیدروکسی - دئوکسی گوانوزین می‌شود و به دلیل فعالیت جهش‌زایی قابل توجهی که دارد، بیشترین مطالعه ضایعه اکسیداتیو DNA است. برای این منظور، این شکل غالب ضایعه رادیکال آزاد DNA اغلب به عنوان نشانه‌ای از میزان آسیب DNA و استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شود و اغلب با دفع ادرار اندازه‌گیری می‌شود (۱۲). گونه‌های فعال اکسیژن را می‌توان به طور مداوم برای هفته‌ها تا ماه‌ها در بافت و سلول‌های تحت تابش پیدا کرد که منجر به آسیب نهفته در دیررس می‌شود (۱). شمعدانی (*Pelargonium graveolens* L. خانواده Geraniaceae) یک درختچه معطر مهم با منشأ آفریقای جنوبی، مصر و مراکش است. ترکیبات فرار اسانس برگ شمعدانی حاوی سیترونولول، ژرانیول و ۱۰- گاما- اپی - اودسمول است (۱۳).

شمعدانی عطری که در اسناد سنتی به عنوان شمعدانی، گل سرخ و "شمعدانی عطری" نیز شناخته می‌شود. دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

بهترین نقش مشخص شده گلوکاتایون به عنوان یک مولکول مهارکننده رادیکال اکسیژن می‌باشد (۸).

سوپراکسید دیسموتاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که برای استراتژی‌های دفاعی فیزیولوژیکی در حیوانات و گیاهان در برابر رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده از استرس‌های زیستی و غیرزیستی عمل می‌کند. مکمل

سوپراکسید دیسموتاز از گیاهان در جیره غذایی پستانداران یک رویکرد جدید از نظر بهبود سلامت در برابر شرایط پاتولوژیک است (۹). سوپراکسید دیسموتاز برای تبدیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده به وسیله گزانتین اکسیداز به اکسیژن و پراکسید هیدروژن مشخص شده است. سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اصلی‌ترین دفاع آنتی‌اکسیدانی درون سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته می‌شود. زیر واحدهای سوپراکسید دیسموتاز از ساختار دو دامین تشکیل شده‌اند، که در آن یک دامین از مارپیچ‌های  $\alpha$  و دامین دیگر شامل مارپیچ‌های  $\alpha$  و صفحات بتا است.

محققان اشکال معدودی از سوپراکسید دیسموتاز را یافته‌اند که شامل پروتئین‌های الیگومری فلزی با کوفاکتورهایی مانند؛ آهن، منگنز، یا مس و روی است (۱۰). این کوفاکتورها به وسیله سوپراکسید دیسموتاز برای انجام حداکثر فعالیت کاتالیزوری در متابولیسم واسطه‌های سمی مورد نیاز هستند. محل اتصال فلز بین دو حوزه سوپراکسید دیسموتاز قرار دارد و زنجیره‌های جانبی شامل؛ آسپاراتات، هیستامین و هیستیدین است. این کوفاکتورها تمایل به

## روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ انجام شد. تعداد ۳۰ سر خرگوش سفید نیوزلندی نژاد البینو، شش ماهه به وزن تقریبی ۱/۵-۱ کیلوگرم 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 اول) 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 کلرگزیدینزین ضدعفونی شدند. همه خرگوش‌ها به غیر از گروه کنترل مثبت با ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلاژناز ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (کلاستریدیوم 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 (۱۷). پس از تزریق اولیه کلاژناز (روز اول)، خرگوش‌ها به

اسانس گیاه تازه به دلیل داشتن رایحه مطلوب، در صنعت عطر بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. دارای اثرات ضدعفونی کننده و متعادل کننده بر سیستم عصبی است و افسردگی و اضطراب را تسکین می‌دهد (۱۴) و 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، بیماری‌های قلبی، آسم و تهوع استفاده می‌شود. 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 (۱۵). پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن p38 (MAPK) 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 (۱۶).

این تحقیق بیشتر بر رابطه بین استرس اکسیداتیو و فرآیند نقایص استئوکلندرال در یک نقطه زمانی خاص است. با این حال، بررسی‌ها در مورد مشاهده دینامیکی سطوح بیان و اهمیت بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانی و اکسیداتیو در خون و مایع سینوویال کم است. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی بر سطح بیان گلوتاتیون، مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی دی‌اکسی گوانوزین در استئوآرتريت القا شده در مفاصل زانو خرگوش بود.

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 گاوژ با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم (۱۹)، بر کیلوگرم وزن بدن، 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 (۲۰). همه حیوانات تحت درمان زنده ماندند و هیچ عوارض جانبی ظاهری در طول مدت مطالعه سمیت حاد مشاهده نشد. 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 به عنوان فهرست عمومی شناخته شده به عنوان ایمن یا به طور کل ایمن شناخته می‌شود. این لیست روغن شمعدانی عطری را به عنوان ایمن یا به طور کل ایمن بین ۱/۶ تا ۲۰۰ قسمت در میلیون می‌شناسد (۲۱). در مطالعه‌ای که به وسیله 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

چهار گروه مساوی تقسیم شدند؛ کنترل مثبت به صورت خوراکی با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تیمار ۱ و ۲ تحت درمان خوراکی اسانس برگ شمعدانی عطری (۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار ۳ با سلبرکس (سلوکسیب) (۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۴ درصد) (۱۸)، 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.

تمامی مراحل این تحقیق کاربردی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور واحد شهر ری انجام شد. مواد شیمیایی، کیت‌ها، کلسترییدیوم هیسستولیتیکوم از شرکت سیگما (هندوستان)، کتامین هیدروکلراید و میدازولام هیدروکلراید از کمپانی مرک (آلمان)، سلبرکس از کمپانی Pfizer (ایران)، دگزامتازون و ایبوپروفن (شرکت داروسازی اکسیر ایران)، معرف تریزول، کلروفرم ایزومیل‌الکل و RT-PCR 2-Steps و تمامی پرایمرهای مورد استفاده از شرکت سیناژن (ایران) خریداری گردید. اسانس برگ گیاه شمعدانی عطری از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد و بر اساس پروتوکول‌های معمول و در دسترس تهیه شد.

۵۰ درصد<sup>(۱)</sup> بیان کرد. مقدار IC 50 به عنوان غلظتی تعریف شد که اسانس باید در آن باشد تا ۵۰ درصد رنگ‌زدایی ۲، ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل<sup>(۲)</sup> پایدار را ایجاد کند (۲۲). وزن بدن خرگوش‌ها یک بار در هفته با استفاده از ترازوی الکترونیکی ثبت شد. شدت آرتريت روماتوئید در پنجه موش‌ها تحت نظارت روماتولوژیست با استفاده از سیستم امتیازدهی استاندارد دوسوکور ارزیابی شد (۲۳)، 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 آرتريت برای هر موش مجموع تمام نمرات پنجه است که بالاترین امتیاز در هر موش ۱۶ خواهد بود.

درجه سفتی با میزان حرکت، تورم و قرمزی زانو ارزیابی شد. هر آیتم در مقایسه با خرگوش‌های کنترل به عنوان آسیب خفیف، متوسط یا شدید طبقه‌بندی شد. معاینه به وسیله دو ناظر مستقل انجام شد که از گروه‌های درمانی بی‌اطلاع نگه داشته شدند. دوازده روز پس از ایمن‌سازی با کلاژن نوع II، ارزیابی ایمنی سلولی با استفاده از روش افزایش حساسیت نوع تأخیری 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 (۲۴).<sup>۱</sup>

گرفتن نمونه خون از ورید خارجی گوش و مایع سینوویال از مفصل زانو از تمامی خرگوش‌ها قبل از ایجاد آرتروز و در پایان هفته چهارم، هشتم و دوازدهم برای اندازه‌گیری میزان بیان و تولید ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین با استفاده کیت الیزا، استفاده از روش اختصاصی اونکواوا برای تعیین میزان بیان مالون دی‌آلدئید و PCR در زمان واقعی برای تعیین میزان بیان گلوکوتائون، سوپراکسید دیسموتاز، طبق پروتکل سازنده انجام شد. 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 نگهداری به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و یک فاز آبی حاوی RNA جمع‌آوری گردید. RNA با ایزوپروپیل الکل ته‌نشین 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 دوم سنتز cDNA با استفاده از RNAهای جدا شده انجام شد. به طور خلاصه برای هر

1-Inhibitory Concentration 50 % (IC50%)  
2-2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DDPH)

بود. مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شد تا یک کمپلکس مواد واکنش دهنده اسید تیوباربیتوریک<sup>(۳)</sup> تشکیل شود. پس از سرد شدن، ۴ میلی‌لیتر n- بوتانول به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از منحنی کالیبراسیون استاندارد محاسبه شد.

تعیین میزان ۸- هیدروکسی دزاکسی گوانوزین در سرم و مایع مفصلی با کمک کیت ELISA به وسیله abcam USA ab201734 تخمین زده شد. محلول‌های استاندارد برای رسم منحنی استاندارد با غلظت‌های مورد نظر بر اساس دستورالعمل کیت تهیه شد، سپس انکوباسیون، شستشو، افزودن آنزیم مزدوج و در نهایت خواندن صفحه انکوباسیون در ۴۵۰ نانومتر انجام شد (۲۶).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه، توکی، تی نمونه‌های وابسته و آزمون انتقال بازنمودی حالت تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی نوکلئوتید پرایمرهای مورد استفاده<sup>۱</sup>

نام ژن	پرایمررفت	پرایمربرگشت
گلوکاتینون اس ترانسفراز	5'- GAGGGAATGCAGCGATCTGA -3'	5'- TATACAGTCGCCCCGAAGA -3'
سوپر اکسید دسموتاز	5'- GCCAGGTTGAAGTCCGTTGT -3'	5'- GAGTCCTGCTGCTTCACTCA -3'
گلیسرآلدئید فسفودی ئیدروژناز	5'-GCT CTCCAGAACATCCCTGCC-3'	5'-CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3'

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 ژن‌های مورد مطالعه و ژن خانه‌دار<sup>(۱)</sup> انجام گردید و ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس استفاده 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 و از evergreen به عنوان مسترمیکس استفاده شد. نتایج به دست آمده سی‌تی‌های (CTs)<sup>(۲)</sup> به وسیله دو روش منحنی استاندارد و روش پفافی با فرمول Pfaffi Method (2<sup>-ΔΔct</sup>) استفاده شد.

سطوح مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از روش توصیف شده به وسیله اوکاو و همکاران تعیین شد (۲۵). این آزمایش شامل ترکیب ۲۰۰ میکرولیتر سرم یا مایع سینوویال با ۸/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات، ۱/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک ۲۰ درصد (PH 3.5) و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۸ درصد

1-HouseKeeping Genee  
2-Threshold cycle (CTs)  
3-Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

## 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 کردیم. 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 ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۱).

شروع و شدت علایم در خرگوش‌ها همان‌طور که قبلاً در بخش روش‌ها ذکر شد، رتبه‌بندی شد. نتایج در نمودار 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 نشان‌دهنده

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 ( $p < 0.05$ ). جالب توجه است که اسانس شمعدانی عطری به اندازه سلبرکس (سلوکسیب) در به تأخیر انداختن شروع علایم آرتروز مؤثر است (نمودار ۱).

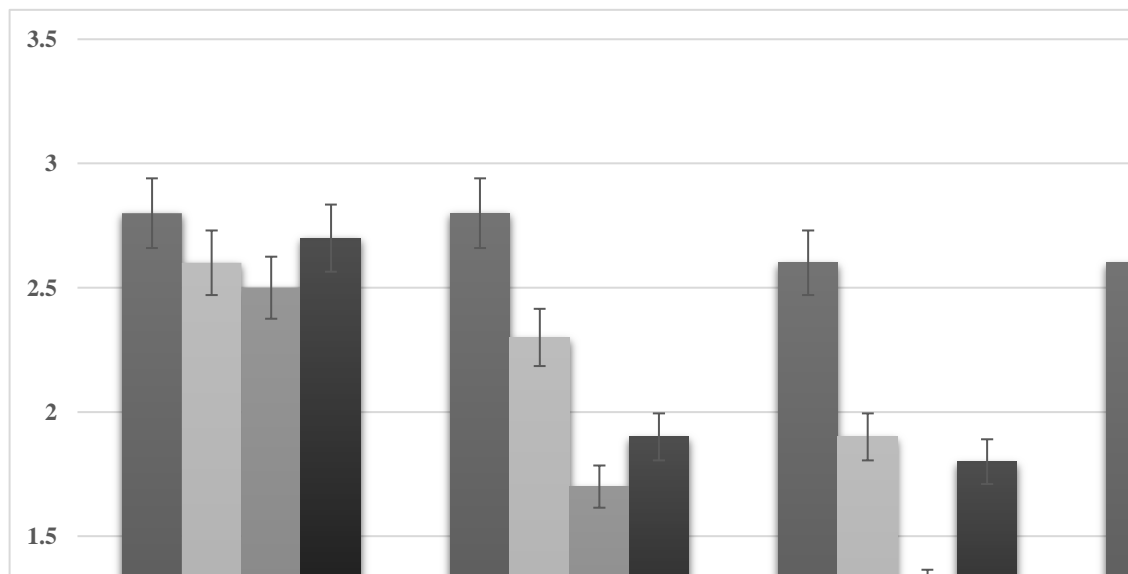
نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش حساسیت تأخیری نشان داد که ضخامت گوش در خرگوش‌های مبتلا به آرتروز ناشی از کلاژن از  $0.5 \pm 0.5$  میلی‌متر در خرگوش‌های سالم به  $0.3 \pm 0.98$  میلی‌متر در گروه کنترل مثبت افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). با این حال، در حیوانات تحت درمان در مقایسه با کنترل مثبت، ضخامت به طور قابل توجهی کمتر بود ( $p < 0.05$ ) با گروه مثبت + سلبرکس دارای کمترین مقدار ( $0.61 \pm 0.02$  میلی‌متر) و در گروه تیمار با اسانس شمعدانی عطری  $0.3 \pm 0.68$  بود. تفاوت معنی‌داری در ضخامت گوش بین حیوانات تیمار شده با سلبرکس (سلوکسیب) و اسانس شمعدانی عطری با گروه کنترل سالم وجود نداشت ( $p < 0.05$ ).

هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل دی‌آلدئید در مایع سینوویال و خون سه گروه قبل از ایجاد آرتروز در خرگوش‌ها مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲).

در مقایسه با گروه کنترل منفی، گروه کنترل مثبت و گروه تیمار با اسانس شمعدانی عطری، در

پایین‌تری از گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز و ۸- هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل‌دی‌آلدئید در مایع و خون سینوویال را نشان دادند ( $p < 0.05$ ). در گروه کنترل مثبت، گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز در خون و مایع سینوویال قبل از جراحی و در پایان هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم به تدریج افزایش یافت، اما هیچ تفاوت آماری مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ). در مقایسه با قبل از جراحی، سطح بیان - هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل‌دی‌آلدئید در مایع سینوویال و خون در پایان هفته‌های هشتم و دوازدهم افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) (نوسان درون دوری کمتر<sup>(۱)</sup> از ۱۵ و نوسان بیرون دوری<sup>(۲)</sup> کمتر از ۱۰) (نمودارهای ۳ و ۴).

پایان هفته چهارم روند نزولی گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز در خون و مایع سینوویال و روند صعودی مالونیل دی آلدئید و ۸- هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین را نشان دادند. با این حال، همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته نشدند ( $p < 0.05$ ). برخلاف گروه کنترل منفی، ظاهراً سطوح پایین‌تری از گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز و ۸- هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل دی آلدئید در مایع سینوویال و خون دو گروه دیگر در هفته هشتم مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۴). جدول ۵ نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل منفی، دو گروه دیگر در هفته دوازدهم سطوح



نمودار ۱: اثرات اسانس برگ شمع‌دانی عطری در درمان آرتريت ناشی از کلاژناز. به زانوی راست خرگوش‌ها در روزهای ۱ و ۴ کلاژناز به صورت داخل مفصلی تزریق شد. خرگوش‌ها به صورت خوراکی همراه با آب مقطر به عنوان شاهد، اسانس برگ شمع‌دانی عطری (۱۰۰، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) یا سلوکسیب (۰/۳ میلی لیتر از محلول ۰/۴ درصد) برای ۴ هفته مورد تیمار قرار گرفتند. سفتی با تعیین تحرک مفاصل زانو ارزیابی شد و در مقیاس نسبی ۰ تا ۳ همان‌طور که در مواد و روش‌ها شرح داده شد، درجه‌بندی شد. مقایسه نتایج بین گروه‌های a, b, c, d با گروه a اختلاف سطح معنی‌دار مشخص کرد ( $p < 0.05$ ). نتایج با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مشابه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در دو آزمایش مستقل

به دست آمده است.<sup>۱</sup>

1-HouseKeeping Genee  
2-Threshold cycle (CTs)

جدول ۲: میزان بیان گلوتاتیون، مالونیل دی آلدئید، سوپراکسید دسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در مایع مفصلی و نمونه خون سه گروه قبل از جراحی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گروه تیمار از اسانس شمعدانی عطری بعد از ایجاد آرتروز در خرگوش‌ها

گروه های مورد مطالعه	گلوتاتیون	سوپراکسید دسموتاز	مالونیل دی	۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین
گروه کنترل منفی (مایع مفصلی)	۹۱/۳۵ $\pm$ ۰/۲۴	۴۱/۳۴ $\pm$ ۱/۲۴	۸۵/۱۲ $\pm$ ۱/۲۳	۱۵/۳۷ $\pm$ ۰/۵۴
گروه تیمار (مایع مفصلی)	۹۲/۴۵ $\pm$ ۰/۳۴	۳۷/۴۵ $\pm$ ۰/۴۵	۸۴/۷۴ $\pm$ ۱/۳۴	۱۶/۰ $\pm$ ۰/۵۶
گروه کنترل مثبت (مایع مفصلی)	۹۴/۲۳ $\pm$ ۰/۴۱	۳۸/۶۷ $\pm$ ۱/۲۳	۸۱/۵۹ $\pm$ ۰/۴۵	۱۵/۲۵ $\pm$ ۱/۱۲
(مایع مفصلی)	۲۳/۵۴۰	۲۷/۳۴	۲۵/۱۲۳	۳۱/۴۵
(مایع مفصلی)	-/۳۲۳	-/۱۴۵	-/۴۳۵	-/۱۴۵
گروه کنترل منفی (خون)	۴۱/۲۴ $\pm$ ۰/۸۴	۲۱/۳۴ $\pm$ ۱/۸۷	۵/۵۷ $\pm$ ۱/۲۲	۱۶/۴۰ $\pm$ ۱/۳۴
گروه تیمار (خون)	۴۳/۳۴ $\pm$ ۱/۲۴	۱۹/۳۴ $\pm$ ۱/۳۴	۷/۳۴ $\pm$ ۱/۳۴	۱۵/۳۱ $\pm$ ۱/۲۳
گروه کنترل مثبت (خون)	۴۵/۶۱ $\pm$ ۰/۴۵۲	۲۰/۱۹ $\pm$ ۱/۳۴	۶/۲۱ $\pm$ ۱/۱۲	۱۶/۸۲ $\pm$ ۰/۴۵
(خون)	۲۸/۳۴	۲۶/۸۲	۲۵/۳۴	۲۵/۱۲۳
(خون)	-/۱۵۶	-/۱۳۸	-/۱۷۵	-/۱۲۴

جدول ۳: میزان بیان گلوتاتیون، مالونیل دی آلدئید، سوپراکسید دسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در مایع مفصلی و نمونه خون در سه گروه در انتهای هفته چهارم (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گروه تیمار از اسانس شمعدانی عطری بعد از ایجاد آرتروز در خرگوش‌ها

گروه های مورد مطالعه	گلوتاتیون	سوپراکسید دسموتاز	مالونیل دی	۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین
گروه کنترل منفی (مایع مفصلی)	۹۱/۲۳ $\pm$ ۱/۱۲	۴۳/۳۴ $\pm$ ۱/۴۵	۷۶/۵۲ $\pm$ ۱/۵۶	۱۵/۹۵ $\pm$ ۰/۴۵
گروه تیمار (مایع مفصلی)	۹۳/۲۳ $\pm$ ۱/۴۵	۳۸/۳۴ $\pm$ ۰/۴۵	۸۵/۲ $\pm$ ۱/۱۲	۱۶/۴۵ $\pm$ ۱/۳۴
گروه کنترل مثبت (مایع مفصلی)	۸۹/۲۳ $\pm$ ۱/۲۴	۴۱/۳۴ $\pm$ ۱/۴۵	۸۶/۰۴ $\pm$ ۱/۲	۱۷/۴۵ $\pm$ ۱/۴۵
(مایع مفصلی)	۹/۴۹۰	۱۱۱-/۲۳	۱۱/۲۳	۹/۱۲۳
(مایع مفصلی)	-/۰۷۵	-/۰۵۹	-/۸۳	-/۱۴۵
گروه کنترل منفی (خون)	۴۴/۳ $\pm$ ۱/۴۵	۲۳/۴۵ $\pm$ ۱/۴	۶/۴۵ $\pm$ ۰/۸۴	۱۶/۴۲ $\pm$ ۰/۵۶
گروه تیمار (خون)	۴۲/۲۳ $\pm$ ۱/۲۳	۱۸/۱۶ $\pm$ ۱/۲۸	۸/۵۶ $\pm$ ۰/۴۵	۱۵/۲۲ $\pm$ ۰/۴۵
گروه کنترل مثبت (خون)	۴۰/۴۵ $\pm$ ۰/۴۵	۱۹/۱۲ $\pm$ ۱/۲۳	۷/۵۶ $\pm$ ۱/۲۳	۱۷/۲۴ $\pm$ ۰/۴۲۳
(خون)	۲۸/۱۲۳	۱۲/۲۳۴	۲۹/۴۵۶	۸/۴۶۹
(خون)	-/۰۴۵	-/۰۶۲	-/۰۶۰	-/۰۹۰

جدول ۴: میزان بیان گلوتاتیون، مالونیل دی آلدئید، سوپراکسید دسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در مایع مفصلی و نمونه خون در سه گروه در انتهای هفته هشتم (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گروه تیمار از اسانس شمعدانی عطری بعد از ایجاد آرتروز در خرگوش‌ها

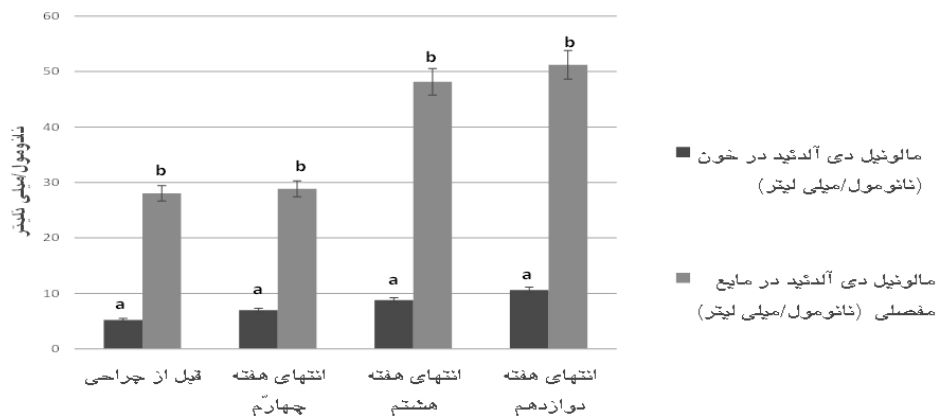
گروه های مورد مطالعه	گلوتاتیون	سوپراکسید دسموتاز	مالونیل دی	۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین
گروه کنترل منفی (مایع مفصلی)	۲۰/۲۳ $\pm$ ۱/۲۳	۴۴/۱۲ $\pm$ ۱/۳۴	۸۳/۳۴ $\pm$ ۱/۴۸	۱۵/۴۵ $\pm$ ۱/۵۹
گروه تیمار (مایع مفصلی)	۸۹/۴۵ $\pm$ ۰/۴۵	۴۳/۴۸ $\pm$ ۱/۳۴	۸۲/۱۰ $\pm$ ۰/۴۵	۱۶/۲۳ $\pm$ ۱/۴۵
گروه کنترل مثبت (مایع مفصلی)	۸۸/۳۴ $\pm$ ۱/۱۵ $^{\#}$	۳۸/۲۳ $\pm$ ۰/۴۵ $^{\#}$	۹۲/۳۴ $\pm$ ۰/۸۴ $^{\#}$	۱۸/۳۴ $\pm$ ۰/۸۵ $^{\#}$
(مایع مفصلی)	۳۲/۳۴	۲۸/۲۳۴	۲۴/۳۴۸	۲۶/۳۴۵
(مایع مفصلی)	۰/۰۱۶	۰/۰۳۲	۰/۰۴۵	۰/۰۳۰
گروه کنترل منفی (خون)	۴۵/۱۲ $\pm$ ۱/۲	۲۳/۳۴ $\pm$ ۱/۳	۵/۱۲ $\pm$ ۱/۰۲	۱۶/۳۴ $\pm$ ۱/۳۴
گروه تیمار (خون)	۴۲/۴۵ $\pm$ ۰/۴۵	۱۹/۴۵ $\pm$ ۱/۲	۷/۳۴ $\pm$ ۰/۴۵	۱۱۵۳/۳۴ $\pm$ ۱/۲۱
گروه کنترل مثبت (خون)	۳۹/۴ $\pm$ ۰/۳۴ $^{\#}$	۱۲/۳۶ $\pm$ ۱/۲۴ $^{\#}$	۱۹/۷۵ $\pm$ ۰/۵۴ $^{\#}$	۳۰/۶ $\pm$ ۱/۲۱ $^{\#}$
(خون)	۲۶/۴۵۶	۱۶/۳۴۵	۲۳/۳۴۶	۳۰/۱۲۳
(خون)	۰/۰۳۲	۰/۰۷۱	۰/۳۴	۰/۲۱

گروه کنترل مثبت هیچ تیماری برای خرگوش‌ها بعد از ایجاد آرتروز در نظر گرفته نشده است، در مقایسه با گروه کنترل منفی  $p < 0.05$ ؛ در مقایسه با گروه تیمار با اسانس شمعدانی عطری  $p < 0.05$   $^{\#}$

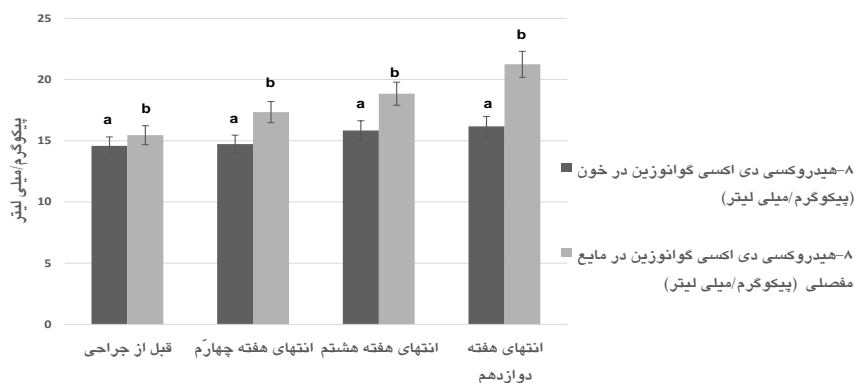
جدول ۵: میزان بیان گلوتاتیون، مالونیل دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در مایع مفصلی سه گروه در انتهای هفته دوازدهم (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گروه تیمار از اسانس شمعدانی عطری بعد از ایجاد آرتروز در خرگوشها

گروه‌های مورد مطالعه	گلوتاتیون	سوپراکسید دیسموتاز	مالونیل دی	۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین
گروه کنترل منفی (مایع مفصلی)	۹۳/۴۵ $\pm$ ۱/۰۷	۴۳/۳۴ $\pm$ ۱/۳۵	۸۵/۰۱ $\pm$ ۱/۰۴	۱۵/۱۲ $\pm$ ۱/۱۲
گروه تیمار (مایع مفصلی)	۹۱/۸۹ $\pm$ ۱/۳۶	۴۲/۶۹ $\pm$ ۰/۳۴	۸۱/۷۵ $\pm$ ۱/۳۴	۱۴/۳۴ $\pm$ ۰/۸۵
گروه کنترل مثبت (مایع مفصلی)	۸۳/۲ $\pm$ ۰/۹۴ $^{\#}$	۳۷/۸۳ $\pm$ ۱/۳۴ $^{\#}$	۹۲/۳ $\pm$ ۱/۲۳ $^{\#}$	۱۷/۵۶ $\pm$ ۰/۵۸ $^{\#}$
مایع مفصلی	۲۵/۳۹۸	۳۱/۰۰۱	۳۸/۰۴۵	۲۷/۴۵۱
مایع مفصلی	۰/۰۴۷	۰/۰۰۴	<۰/۰۰۲	۰/۰۰۴
گروه کنترل منفی (خون)	۴۴/۵۱ $\pm$ ۰/۷۳۴۹	۲۳/۰۷ $\pm$ ۱/۴۵	۵/۳۴ $\pm$ ۰/۶۸	۱۶/۴۵ $\pm$ ۱/۴۵
گروه تیمار (خون)	۴۳/۰۵ $\pm$ ۰/۴۵	۱۹/۳۴ $\pm$ ۱/۴۵	۷/۵۶ $\pm$ ۰/۵۷	۱۵/۲۴ $\pm$ ۱/۳۴
گروه کنترل مثبت (خون)	۳۴/۵۶ $\pm$ ۰/۵۶ $^{\#}$	۱۲/۳۴ $\pm$ ۱/۳۴ $^{\#}$	۱۱/۳۴ $\pm$ ۱/۰۰ $^{\#}$	۳۴/۳۷ $\pm$ ۰/۵۶ $^{\#}$
خون	۲۷/۲۳۴	۲۸/۳۴۵	۳۸/۴۵۸	۴۱/۳۴۵
خون	۰/۰۳۱	۰/۰۱۳	۰/۰۰۴	<۰/۰۰۲

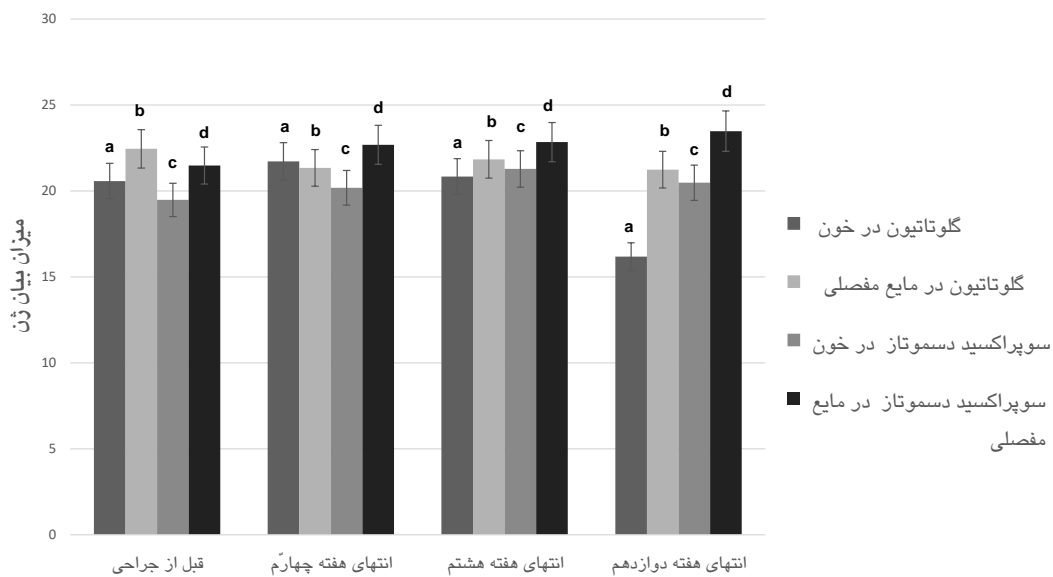
گروه کنترل مثبت هیچ تیماری برای خرگوشها بعد از ایجاد آرتروز در نظر گرفته نشده است. در مقایسه با گروه کنترل منفی  $p < 0.05$ : در مقایسه با گروه تیمار با اسانس شمعدانی عطری  $p < 0.05$



نمودار ۲: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر میزان تولید مالونیل دی آلدئید در نمونه مایع مفصلی و خون خرگوشها قبل از جراحی، هفته ۴، ۸ و ۱۲ به روش ELISA، قبل از جراحی، هفته چهارم، هشتم و دوازدهم بعد از جراحی و تیمار اندازه‌گیری شد. هر مقدار گزارش (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های a, b, c, d، در سطح معنی‌دار  $p < 0.001$  با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مشابه در دو آزمایش مستقل به دست آمد. نوسان درون دوری کمتر از ۱۵ و نوسان بیرون دوری کمتر از ۱۰.



نمودار ۳: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر سطوح بیان ۸-هیدروکسی دی اکسی گوانوزین در نمونه مایع مفصلی و خون خرگوشها قبل از جراحی، هفته ۴، ۸ و ۱۲ به روش ELISA، قبل از جراحی، هفته چهارم، هشتم و دوازدهم بعد از جراحی و تیمار. هر مقدار گزارش شده (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های a, b, c, d، در سطح معنی‌دار  $p < 0.001$  با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا و آزمون توکی.



نمودار ۴: اثرات اسانس برگ شمعدانی عطری بر سطح بیان گلوتاتیون و سوپراکساید دسموتاز با RT-PCR از غضروف خرگوش قبل از جراحی، هفته ۴، ۸ و ۱۲ اندازه گیری شد. بیان کمی mRNA ژن‌های مورد نظر در مقایسه با گروه کنترل منفی (خرگوش سالم) و به عنوان درصد بیان ژن GAPDH هر مقدار گزارش شده (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) است. مقایسه نتایج بین گروه‌های a, b, c, d با گروه a اختلاف سطح معنی‌دار مشخص کرد ( $p < 0.05$ ). 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.

## بحث

هیدروکسی دی‌اکسی‌گوانوزین (8-OHdG) می‌شود. این تغییرات در نهایت موجب تخریب غضروف و تشدید علائم بیماری می‌گردد (۲۷). در سال‌های اخیر، توجه به ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان گزینه‌های درمانی مکمل افزایش یافته است. اسانس برگ شمعدانی، به دلیل وجود ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قابل توجهی دارد، با این حال، اثر آن بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در استئوآرتریت، به‌ویژه در مدل‌های حیوانی مانند خرگوش، هنوز به طور جامع بررسی نشده است (۲۸).

استئوآرتریت یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تخریبی مفصل است که با فرسایش تدریجی غضروف، التهاب موضعی و کاهش عملکرد مفصل همراه می‌باشد. نقش استرس اکسیداتیو در ایجاد و پیشرفت این بیماری به‌خوبی شناخته شده است. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به کاهش سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و در مقابل افزایش شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA مانند مالون دی‌آلدئید (MDA) و ۸-

سوپراکسید دیسموتاز در گروه تیمار نشان می‌دهد که اسانس شمعدانی عطری توانسته است سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن را فعال کند و با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، شدت آسیب را کاهش دهد. این نتایج با پژوهش‌های قبلی که بر اهمیت نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش آسیب‌های غضروفی تأکید داشته‌اند هم‌خوانی دارد (۳۰). به عنوان نمونه، بررسی‌های انجام شده بر روی بیماران مبتلا به آرتروز نشان داده است که سطوح گلوکاتیون و سوپراکسید دیسموتاز در مایع سینوویال کاهش یافته و در مقابل، غلظت ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل‌دی‌آلدئید افزایش یافته است (۳۱). بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر در راستای شواهد موجود بوده و اثربخشی اسانس شمعدانی را به عنوان یک عامل تعدیل‌کننده استرس اکسیداتیو تأیید می‌کند.

یکی از نکات قابل توجه در این مطالعه، نبود تفاوت معنی‌دار در شاخص‌ها طی هفته چهارم بود. این موضوع احتمالاً ناشی از زمان ناکافی برای بروز تغییرات بیوشیمیایی یا محدودیت حجم نمونه است. با این حال، در هفته‌های هشتم و دوازدهم تغییرات معنی‌داری مشاهده شد که بیانگر اثرات تدریجی و زمان‌بر اسانس شمعدانی عطری است. مکانیسم‌های احتمالی اثر اسانس شمعدانی عطری می‌تواند شامل مهار مسیرهای التهابی وابسته به پروتئین‌های MAPK و کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی باشد. همچنین ترکیبات فنولی و ترپن‌های موجود در این گیاه می‌توانند با تقویت تعادل ردوکس در سلول‌ها، به

با توجه به نقش کلیدی استرس اکسیداتیو در آسیب مفصلی، ارزیابی این که آیا اسانس شمعدانی می‌تواند با افزایش GSH و SOD و کاهش MDA و ۸-OHdG به بهبود وضعیت بافتی کمک کند، اهمیت پژوهشی و کاربردی دارد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر اسانس برگ شمعدانی بر سطح بیان گلوکاتیون، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی دی‌اکسی گوانوزین در استئوآرتروز القا شده در مفاصل زانو خرگوش بود.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که اسانس برگ شمعدانی عطری قادر است با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (افزایش گلوکاتیون و سوپراکسید دیسموتاز) و کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو (کاهش ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل‌دی‌آلدئید) نقش حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از استئوآرتروز القا شده ایفا کند. این نتایج بیانگر آن است که استرس اکسیداتیو در ایجاد و پیشرفت نقایص استئوکندرال نقش کلیدی دارد و مداخله با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند روند بیماری را تعدیل نماید. بر اساس بررسی‌های پیشین، استرس اکسیداتیو از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن موجب تخریب ماتریکس خارج سلولی و مرگ سلولی کندروسیت‌ها می‌شود (۲۹). در تحقیق حاضر نیز افزایش سطوح ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین و مالونیل‌دی‌آلدئید در گروه کنترل مثبت مؤید نقش رادیکال‌های آزاد در آسیب اکسیداتیو بافت مفصلی است. در مقابل، افزایش بیان گلوکاتیون و

بازسازی بافت غضروفی کمک کنند(۳۲). با وجود نتایج ارزشمند این مطالعه، چند محدودیت نیز وجود دارد. نخست، حجم نمونه نسبتاً کم ممکن است قدرت آماری تحقیق را کاهش داده باشد. دوم، اثر جنسیت بر پاسخ به درمان بررسی نشده است. علاوه بر این، مسیرهای مولکولی دقیق اثر اسانس شمعدانی مورد مطالعه قرار نگرفتند. لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده، بررسی‌ها با حجم نمونه بالاتر، بازه‌های زمانی طولانی‌تر و بررسی سیگنالینگ مولکولی به‌طور جامع انجام گیرد.

### تعارض منافع

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

### حمایت مالی

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

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اسانس برگ شمعدانی عطری می‌تواند به عنوان یک درمان مکمل یا جایگزین بالقوه در مدیریت استئوآرتریت مورد توجه قرار گیرد. استفاده از این ترکیب گیاهی می‌تواند راهکاری کم‌عارضه و مقرون به صرفه در بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به آرتروز باشد.

### ملاحظات اخلاقی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک با کد اخلاق IR.PNU.ERC.1398.158 می‌باشد

### مشارکت نویسندگان

طراحی ایده و روش کار به وسیله حسین مقصودی و 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، مدیریت پروژه تحت نظر دکتر حسین مقصودی، نگارش(پیش‌نویس): به وسیله فرشته جولا و نگارش(بررسی و ویرایش) به وسیله حسین مقصودی انجام پذیرفت.

### تقدیر و تشکر

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

## REFERENCES

1. Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An update. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24(7): 6405.
2. Liang J, Wang Y, Yu F, Jiang G, Zhang W, Tian K. Evaluation of the osteoarthritis disease burden in China from 1990 to 2021: based on the Global Burden of Disease Study 2021. *Frontiers in Public Health* 2024; 12: 1478710.
3. Semenistaja S, Skuja S, Kadisa A, Groma V. Healthy and osteoarthritis-affected joints facing the cellular crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24(4): 4120.
4. Liu L, Luo P, Yang M, Wang J, Hou W, Xu P. The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: A comprehensive research review. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2022; 9: 1001212.
5. Xiao Z, Yu X, Zhang S, Liang A. The expression levels and significance of GSH, MDA, SOD, and 8-OHdG in osteochondral defects of rabbit knee joints. *BioMed Research International* 2022; 2022(1): 6916179.
6. Mohideen K, Sudhakar U, Balakrishnan T, Almasri MA, Al-Ahmari MM, Al Dira HS, Suhluli M, Dubey A, Mujoo S, Khurshid Z, Raj AT. Malondialdehyde, an oxidative stress marker in oral squamous cell carcinoma—A systematic review and meta-analysis. *Current Issues in Molecular Biology* 2021; 43(2): 1019-35.
7. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020; 2020(1): 9829176.
8. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies. *Biomolecules* 2020; 10(10): 1429.
28. Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials* 2021; 14(8): 1984.
9. Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Esa NM, Gnanaraj C. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods* 2020; 68: 103917.
10. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran TB, Mitra S, Olatunde A, et al. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2022; 62(26): 7282-300.
11. Frye KA, Sendra KM, Waldron KJ, Kehl-Fie TE. Old dogs, new tricks: New insights into the iron/manganese superoxide dismutase family. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2022; 230: 111748.
12. Orfanakos K, Alifieris CE, Verigos EK, Deligiorgi MV, Verigos KE, Panayiotidis MI, et al. The predictive value of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) serum concentrations in irradiated non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients. *Biomedicines* 2024; 12(1): 134.
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, Farzinejadizadeh H, Parsaei P, Elmamooz A. 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. 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.
17. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 177-86.
18. Jiang D, Zou J, Huang L, Shi Q, Zhu X, Wang G, Yang H. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11(10): 4106-13.
19. 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): 22520.

20. 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.
21. Schlosser KK, editor. *The Herb Society of America's Essential Guide to Growing and Cooking with Herbs*. LSU Press; 2007
22. 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.
23. 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.
24. Mehling R, Schwenck J, Lemberg C, Trautwein C, Zizmare L, Kramer D, 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.
25. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95(2): 351-8.
26. Kumar M, Jeevitha M, Jayaraman S. Assessment of 8-Hydroxy 2-Deoxyguanosine as Salivary Biomarker for Periodontitis Patients with or without Diabetes Mellitus. *Journal of Pharmaceutical Research International* 2021; 33(62B): 8-15.
27. Liu L, Luo P, Yang M, Wang J, Hou W, Xu P. The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: A comprehensive research review. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2022; 9: 1001212.
28. Alshehri B. The geranium genus: A comprehensive study on ethnomedicinal uses, phytochemical compounds, and pharmacological importance. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2024; 31(4): 103940.
29. Pooja G, Shweta S, Patel P. Oxidative stress and free radicals in disease pathogenesis: a review. *Discover Medicine* 2025; 2(1): 104.
30. He F, Wu H, He B, Han Z, Chen J, Huang L. Antioxidant hydrogels for the treatment of osteoarthritis: mechanisms and recent advances. *Frontiers in Pharmacology* 2024; 15: 1488036.
31. Abdulkarim AM, Jassim MM, Hassan ZL. Biomarkers of oxidative stress in rheumatoid arthritis: clinical relevance and therapeutic targets.
32. Kim H, Li S, Nilkhet S, Baek SJ. Anti-cancer activity of rose-geranium essential oil and its bioactive compound geraniol in colorectal cancer cells. *Applied Biological Chemistry* 2025; 68(1): 1-3.

# The Effect of Geranium Leaf Essential Oil on the Expression Levels of Glutathione, Malondialdehyde, Superoxide Dismutase and 8-Hydroxydeoxyguanosine in Osteoarthritis Induced in Rabbit Knee Joints

Maghsoudi H<sup>1\*</sup>, Jola F<sup>2</sup>, Bakhshi Khaneghi GH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Payam Noor University, Tehran, Iran, <sup>2</sup>Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Received Date: 10 Feb 2025 Accepted Date: 28 Sep 2025

## Abstract

**Background & aim:** Excessive production of free radicals induces apoptosis of osteochondral cells and degradation of the extracellular matrix, ultimately leading to osteochondral defects. Given that the essential oil of *Pelargonium graveolens* (rose geranium) contains antioxidant constituents, the present study aimed to determine the effects of rose-geranium leaf essential oil on the expression levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in collagenase-induced osteoarthritis of the rabbit knee joint.

**Methods:** This experimental study was conducted in 2021 on 30 New Zealand white rabbits. After preparation of the plant essential oil, the rabbits were acclimatized to laboratory conditions for one month. Osteoarthritis was induced by intra-articular injection of collagenase into the right knee joints. Thirty days after OA induction, the rabbits received oral treatments of distilled water (positive control), rose-geranium leaf essential oil at 50 or 100 mg/kg, or celecoxib (0.3 mL of 0.4%), once daily for 30 days. At the end of weeks 4, 8, and 12, levels of GSH, MDA, SOD, and 8-OHdG were measured in peripheral blood and synovial fluid. Data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey's post hoc test, and t-tests.

**Results:** In the essential-oil-treated group, GSH and SOD levels at weeks 8 and 12 were significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ). Conversely, MDA and 8-OHdG levels indicated an increasing trend in the positive control group, whereas a significant reduction was observed in the treated groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Rose-geranium leaf essential oil enhanced antioxidant activity by increasing GSH and SOD expression and reducing oxidative-stress markers (MDA and 8-OHdG). These findings suggest a potential protective role of this essential oil against oxidative stress-induced osteochondral damage.

**Keywords:** Geranium essential oil, Osteoarthritis, glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

**\*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 Khaneghi GH. The Effect of Geranium Leaf Essential Oil on the Expression Levels of Glutathione, Malondialdehyde, Superoxide Dismutase and 8-Hydroxydeoxyguanosine in Osteoarthritis Induced in Rabbit Knee Joints. Armaghane-danesh 2025; 30(4):466-483. The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal

