



اثرات حفاظتی رزین گیاه *Commiphora mukul* از غضروف مفصل زانو در استئوآرتریت تجربی

مهسا هادی پور جهرمی*

استادیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم پزشکی، واحد پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

رضا مظفری کرمانی

استادیار پاتولوژی، دانشکده پزشکی، واحد پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

شهرزاد خاکپور

استادیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم پزشکی، واحد پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

مکان انجام تحقیق: دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم پزشکی، واحد پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱

چکیده

عصاره رزین گوگول به علت دارا بودن مواد آنتی‌اکسیدان و خاصیت ضدالتهابی و همچنین اثرات کاهنده کلاسترول، از مقبولیت زیادی برخوردار است، اما تا کنون هیچ مطالعه هیستوپاتولوژیک در حیوانات جهت بررسی اثرات آن در جلوگیری از تخریب غضروف مفصلی و یا ترمیم آن انجام نشده است. لذا بررسی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، اثرات عصاره رزین گوگول بر استئوآرتریت تجربی مورد بررسی قرار گرفت. جهت ایجاد استئوآرتریت از تزریق تک دوز داخل مفصلی منویدواستات در مفصل زانوی موش صحرایی نر استفاده شده است. در این پژوهش، اثرات عصاره رزین گوگول بر استئوآرتریت تجربی مورد بررسی قرار گرفت. جهت ایجاد استئوآرتریت از تزریق تک دوز داخل مفصلی منویدواستات در مفصل زانوی موش صحرایی نر استفاده شده است. ابتدا تغییرات هیستوپاتولوژیک استخوان زیر غضروف و غضروف زانوی موش صحرایی ۱۴ روز بعد از تزریق ۱ میلی‌گرم در ۵۰ میکرولیتر از داروی منویدواستات مورد بررسی قرار گرفته و سپس اثرات تجویز خوراکی عصاره گوگول با دوزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه‌های مختلف تیمار شد و تغییرات هیستوپاتولوژیک در مفاصل زانو مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. مراحل اولیه استئوآرتریت از نظر پاتولوژیک شامل مناطقی از دژنراسیون و نکروز کندروسیت‌ها است که گاهی اوقات تمامی ضخامت غضروف مفصل را درگیر می‌سازد. تغییرات استخوان زیر غضروف و پروتئوگلیکان شامل کلاپس تراپیکول‌های استخوانی، فیبروز، نکروز و پرولیفراسیون سینوویوم است. تجویز عصاره رزین گوگول در گروه‌های مختلف موش صحرایی به صورت وابسته به دوز، مانع از اثرات منویدواستات در ایجاد استئوآرتریت می‌شود. این اثرات به ویژه در گروه‌هایی که دوز بالاتری از عصاره را دریافت کردند، به

* مسؤؤل مكاتبات: دكتر مهسا هادی پور جهرمی، خیابان دكتر شریعتی، زرگنده، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، کدپستی ۱۹۱۶۸، صندوق پستی ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵، پست الکترونیکی: jahromymh@yahoo.com

صورت معنی داری مشاهده گردید که از آسیب کندروسیت‌ها جلوگیری به عمل آورده است. تزریق تک دوز داخل مفصلی منویدواستات منجر به آسیب سریع و پیش‌رونده غضروف مفصلی شده که دقیقاً استئوآرتریت در انسان را تقلید می‌نماید. در این پژوهش، اثر عصاره رزین گوگول در بهبودی آسیب‌های هیستوپاتولوژیک غضروف مفصل و حفاظت مفاصل موش صحرایی مورد تایید و تاکید قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: عصاره رزین گوگول، استئوآرتریت، مدل حیوانی

مقدمه

استئوآرتریت (Osteoarthritis, OA) شایع‌ترین بیماری مفصلی است که در بیش از نیمی از افراد بالای ۶۵ سال دیده می‌شود. استئوآرتریت ابتدا در مفاصل تحمل‌کننده وزن (نظیر زانو و لگن) دیده می‌شود که شامل دژنراسیون غضروف مفصل و تغییرات در استخوان زیرغضروف است. در حال حاضر در کلینیک، هیچ دارویی که به طور قطعی از پیشرفت این بیماری جلوگیری کند، در دسترس نیست. امروزه درمان بیماران شامل کاهش درد و التهاب با داروهای مسکن و ضد التهاب مختلف یا داروهای گیاهی است (۱،۲).

امروزه مدل حیوانی خاصی که ویژگی‌های رفتاری، بیوشیمیایی و فارماکولوژیک OA را تقلید کند، در دسترس است. تزریق داخل مفصلی منویدواستات (Monoiodoacetate, MIA) ه فعالیت گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز را در کندروسیت‌ها مهار می‌کند، منجر به اختلال در گلیکولیز و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود (۴). کاهش پیش‌رونده کندروسیت‌ها منجر به تغییرات هیستولوژیک و مورفولوژیک در غضروف مفصل می‌شود که دقیقاً استئوآرتریت در انسان را تقلید می‌کند (۳،۴،۵،۶).

با توجه به استفاده روزافزون از گیاهان دارویی و رویکرد جهانی به طب سنتی، امروزه اثرات بسیاری از گیاهان دارویی بر روی بیماری‌های عصبی و حرکتی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که برخی نیز در کلینیک پذیرفته شده است. گیاه *Commiphora mukul* از تیره مهر گیاه (Burcaraceae)، بومی کشورهای عربی و هندوستان بوده و رزین حاصل از تنه این درخت مشهور به

gum guggul یا guggul است. گوگولیپید (Gugulipid) یکی از مهم‌ترین مواد موثره این رزین بوده که در فراورده‌های تجاری موجود در بازار دارویی مورد توجه خاص قرار دارد. رزین این گیاه به‌علت داشتن اثرات آنتی‌اکسیدان، کاهنده چربی خون، ضد التهاب و تنظیم‌کننده فعالیت غده تیروئید، در دنیا از محبوبیت خاصی برخوردار است (۷،۸).
به‌علت اثرات ضدالتهابی این رزین و مصرف آن در طب سنتی جهت تسکین درد مفاصل، در این پژوهش تغییرات هیستوپاتولوژیک غضروف و استخوان زیرغضروف به دنبال تیمار رزین گوگول در مدل حیوانی OA مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ایجاد استئوآرتریت در حیوانات

در مطالعه حاضر، از موش‌های صحرایی نر بالغ با محدوده وزنی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم ($n=10$) استفاده شد. ابتدا حیوانات با کتامین بیهوش شدند و سپس داروی منویدواستات (Mono-iodoacetate, MIA; Merck) را با غلظت یک میلی‌گرم در ۵۰ میکرو لیتر، به صورت تک دوز زیر کشکک زانوی چپ تزریق گردید. منویدواستات، در سرم فیزیولوژیک حل شده و با سر سوزن ۰/۵ اینچ (۳۰ gauge) در زانوی چپ موش صحرایی تزریق گردید. در زانوی راست موش صحرایی به عنوان کنترل، ۵۰ میکرو لیتر سرم فیزیولوژیک تزریق شد. دو هفته پس از تزریق، حیوانات با استفاده از کلروفرم، کشته شدند، سپس مفاصل زانو، جدا شده و مقاطع مفاصل زانو با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

میزان AMI تزریق شده، برگرفته از یک مطالعه دوز-پاسخ است (۴).

تهیه عصاره گوگول

جهت تهیه عصاره رزین گیاه، از روش پرکولاسیون استفاده شد. در این روش با استفاده از دستگاه پرکولاتور با فشار زیاد، مواد موثره استخراج می‌گردند. پودر رزین گیاه با اتیل استات، عصاره‌گیری و سپس ماده حاصل در دمای اتاق (عاری از میکروب) خشک گآردید (گوگولیپید ۴۰w/w درصد).

بررسی اثر عصاره گوگول بر OA ناشی از MIA

اثرات درمانی عصاره گوگول در سه گروه (هر گروه شامل ده موش صحرایی) به مدت ۱۴ روز (بلافاصله پس از تزریق تک دوز MIA در زانوی حیوانات) مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گوگول به صورت خوراکی از طریق گاواژ با استفاده از feeding needle به میزان ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه تجویز شد. گروه کنترل یک‌بار در روز آب دریافت نمود. تغییرات هیستوپاتولوژیک در مفصل زانو پس از دو هفته بررسی شد.

مطالعات بافت‌شناسی

تغییرات هیستوپاتولوژیک در تمامی موش‌هایی که MIA یا سرم فیزیولوژیک را در زانو دریافت کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های صحرایی پس از ۱۴ روز با استفاده از کلروفورم کشته شدند. بافت نرم از زانوی چپ (استئوآرتریتی) و زانوی راست (کنترل) جدا شد. کشکک از هر زانو جدا شد تا فیکساسیون مفصل تسهیل شود. سپس نمونه‌های بافتی از طریق فرایندهای استاندارد جهت بررسی با میکروسکوپ نوری آماده شد. به طور خلاصه، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شده، سپس در اسید فرمیک ۵ درصد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد تا دکلسیفیه شوند. متعاقباً نمونه‌ها در اتانل،

دهیدراته شده، سپس در پارافین قرار داده شدند. نمونه‌ها با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. تغییرات هیستوپاتولوژیک، شامل: (۱) تخریب و صدمه به کندروسیت‌ها و وسعت منطقه صدمه دیده؛ (۲) پرولیفراسیون سلول‌های سینوویال؛ (۳) وجود سلول‌های التهابی و (۴) نکروز کامل و زخم شدید توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته است و تغییرات هر مفصل از لحاظ کیفی با جمع‌بندی امتیازات بیان گردید: (خفیف: +، متوسط: ++، شدید: +++). از لحاظ کمی نیز میانگین امتیاز پاتولوژی برای هر مفصل مورد بررسی قرار گرفت (۶).

آنالیز آماری

آنالیز آماری یافته‌های فوق توسط Student's T-Test و تست ANOVA یک‌طرفه انجام گرفت و نمودارها توسط برنامه آماری ORIGINVI تهیه گردید. در هر سری، تعداد حیوانات ۱۰ عدد بوده و میانگین \pm انحراف از استاندارد محاسبه گردیده است. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات هیستوپاتولوژیک پس از تزریق MIA

ابتدا تغییرات هیستوپاتولوژیک، دو هفته پس از تزریق تک دوز MIA (۱ mg/۵۰ μ l) بررسی شد. شاخص‌های پاتولوژی جهت بررسی فوق، شامل آسیب به کندروسیت‌ها از نظر وسعت منطقه و ضخامت غضروف، وجود سلول التهابی در سینوویوم و پرولیفراسیون سینوویوم است که در جدول ۱ تحت عنوان شاهد (Sham) قابل مشاهده است.

اثرات درمانی رزین گوگول

اثرات تجویز دوزهای مختلف گوگول ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در محافظت از غضروف مفصلی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که تجویز گوگول در گروه‌های مختلف موش صحرایی تا

می‌کند. جمع‌بندی امتیازات پاتولوژیک در هریک از گروه‌های کنترل، شاهد و گروه‌های تجربی که رزین را با دوزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند به ترتیب ۳، ۲/۰، ۲/۸، ۳، ۷/۷ می‌باشد. نتایج بررسی‌های فوق در جدول ۱ آورده شده است.

حدودی از اثرات منفی منویدواستات در کندروسیت‌ها جلوگیری بعمل آورده است، خصوصاً در دوزهای بالاتر که این اثرات بیشتر محسوس می‌باشد. هیچ سلول التهابی یا پرولیفراسیون سینوویوم در گروه‌های تحت درمان دیده نشد (جدول ۱).

یافته‌های هیستوپاتولوژیک، قابلیت عصاره رزین در حفاظت از کندروسیت‌ها و اثرات ضد التهابی آن را تایید

جدول ۱- مطالعات هیستوپاتولوژیکی در استئوآرتریت ناشی از منویدواستات (۱ میلی‌گرم در ۵۰ میکرولیتر) پس از ۱۴ روز در مفصل

زانوی موش صحرایی

	score	Control	Sham	Experimental	Groups	
Chondrocyte damage: area	+	۰	۲/۱۰	۶/۱۰	۷/۱۰	۹/۱۰
	++	۰	۴/۱۰	۴/۱۰	۳/۱۰	۱/۱۰
	+++	۰	۴/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۱/۱۰
APS		۰	۲/۲۰	۱/۴۰	۱/۳۰	۱/۱۰
Chondrocyte necrosis: thickness	+	۰	۲/۱۰	۵/۱۰	۵/۱۰	۸/۱۰
	++	۰	۴/۱۰	۴/۱۰	۵/۱۰	۲/۱۰
	+++	۰	۵/۱۰	۱/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
APS		۰	۲/۳۰	۱/۶۰	۱/۵۰	۱/۲۰
Inflammatory cell in synovial	+	۰	۷/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
	++	۰	۲/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
	+++	۰	۱/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
APS		۰	۱/۴۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
Synovial cell proliferation	+	۰	۵/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
	++	۰	۴/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
	+++	۰	۱/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
APS		۰	۱/۶۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
Total pathology score		۰	۷/۵۰	۳/۰۰	۲/۸۰	۲/۳۰

تزیق سرم فیزیولوژیک به زانوی راست. گروه کنترل سرم فیزیولوژیک و گروه‌های درمانی دوزهای مختلف رزین گوگول را دریافت نموده‌اند. APS, Average Pathology Score روش متداول جهت محاسبه مطالعات پاتولوژیکی و به دست آوردن میانگین امتیاز پاتولوژی است (۶). سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

شناخته شده است، در این تحقیق اثرات حفاظتی کندروسیت‌ها را از خود نشان داده است. در مطالعه حاضر، در درمان با گوگولپید در مدل حیوانی استئوآرتریت،

بحث

رزین گوگول که در طب سنتی به عنوان یک داروی کاهش دهنده چربی خون (۱۰،۱۱) و ضد التهاب (۷،۸،۹)

است و به همین دلیل، اثربخشی عوامل دارویی مثل NSAIDs، کورتیکواستروئید و مهارکننده متالوپروتئیناز ماتریکس (Matrix MetalloProteinase, MMPs) و مکانیسم‌های احتمالی آن‌ها را می‌توان در این مدل مورد مطالعه قرار داد (۱۳).

مهارکننده‌های ماتریکس متالوپروتئیناز، آنزیم‌های مهمی در حفظ ساختار طبیعی سلولی هستند که از طریق ایجاد فضای بینابینی به دنبال تخریب پروتئین‌های ساختاری عمل می‌نمایند. در گزارش‌های اخیر، اشاره به مهار این آنزیم‌ها در کندروسیت‌ها توسط برخی عصاره‌های گیاهی با خاصیت ضد التهابی در *in vitro* شده است (۱۳) و به علاوه، روند تخریب استخوان را در مدل منویوز موش سوری متوقف نموده است (۱۴). نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که علاوه بر اثرات ضد التهابی، به دلیل اثرات ترمیمی و محافظتی بر کندروسیت‌ها، احتمالاً ترکیبات فیتواسترول موجود در گوگول قادر به مهار MMPs در کندروسیت‌ها است؛ بدین ترتیب که باعث حفاظت غضروف مفصلی شده و پروتئوگلیکان‌های بیشتری در مفصل زانو باقی می‌ماند.

به علت تشابه زیاد هیستوپاتولوژیک بین این مدل تجربی در حیوان و مدل OA انسان و اثربخشی مناسب رزین گوگول در این تحقیق، به جای استفاده از مسکن‌ها که عوارض جانبی زیادی به همراه دارند، می‌توان از این رزین به عنوان یک داروی طبیعی جهت حفظ کندروسیت‌ها و درمان OA بهره جست.

اثرات حفاظتی دارو حتی در دوزهای پایین نیز مشاهده شده است. این اثر در برخی بیماری‌های التهابی (۱۲) دیده شده، ولی تاکنون بر روی مدل‌های تجربی OA، تحقیقاتی صورت نگرفته است.

روند استئوآرتریت (OA) که منجر به تغییرات ساختاری در غضروف مفصلی می‌شود، تا حد زیادی پیچیده و ناشناخته است. گزارش‌های اخیر نشان داده است که با استفاده از مدل‌های حیوانی می‌توان علایم و تغییرات هیستوپاتولوژیک این بیماری و مداخلات درمانی آن را به طور هم‌زمان بررسی نمود. تزریق ماده شیمیایی منویدواستات (MIA) به داخل مفصل زیرکشک زانوی موش صحرایی بدین منظور انجام می‌شود. این روش جهت ایجاد مدل OA در حیواناتی نظیر اسب، جوجه، موش سوری و صحرایی و خوکیه هندی نیز انجام گرفته است. از نظر مکانیسم، تزریق MIA باعث مهار ۳-گلیسرآلدئید فسفات شده و در نهایت باعث تخریب کندروسیت و مرگ سلولی می‌گردد. شایان ذکر است که تخریب پیشرونده کندروسیت‌ها در انسان ایجاد OA می‌کند و با علایمی نظیر کلاپس ماتریکس غضروفی، فیبریلایسیون و تشکیل زائده‌های استخوانی همراه است. مقدار MIA در این مطالعه براساس درجه تخریب مفصلی و تغییرات بافت شناسی تعیین گردیده است. شایان توجه است که در ابتدا غضروف مفصلی صفحه داخلی تیبیا مورد هدف قرار می‌گیرد. علت این امر آن است که در موش صحرایی، صفحه میانی تیبیا تحمل کننده وزن است. براساس این یافته‌ها، ایجاد OA در این مدل، دقیقاً مشابه OA انسانی

منابع

- 1-Carter, D.R., Beaupre, G.S., Wong, M. 2004. The mechanobiology of articular Cartilage development and degeneration. Clin Orthop 427:69-77.
- 2-Clavo, E., Palacios, I., Delgado, E. 2004. Histopathological correlation

of cartilage swelling detected by MRI in early experimental osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 11:878-86.

- 3-Dumond, H., Presle, N., Puttiev, P. 2004. Site-Specific changes in gene expression and cartilage metabolism

- during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12:248-95.
- 4- Guzman, R.E., Evans, M.G., Bove, S. 2003. Mono-iodoacetat-induced histological changes in subchondrol bone and articular cartilage of rat femorotibial joint: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31:619-24.
- 5- Guingamp, C., Gegout-pottie, P., Philippe, L. 1997. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose – response study of loss of mobility, morphology and biochemistry. *Arthritis Rheum* 40:1670-90
- 6- Kobayashi, K., Imaizumi, R., Sumichka, H. 2003. Sodium iodoacetate – induced osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 65:1195-9.
- 7- Panda, S., Kar, A. 1999. Gugulu (*C. mukul*) induces triiodothyronine production; possible involvement of lipid peroxidation, *Pharmacol Lett* 65(12):137-41.
- 8- Saxena, G., Pratap, S.H., Pol, R. 2007. Gugulipid, an extract of *C. mukul* with lipid lowering properties, has protection against streptozotocin-induced memory deficits in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 86:797-805.
- 9- Waheed, N., Siddique, N., Rahman, A. 2004. INAA for dietary assessment of essential and other trace elements in 14 fruits harvested and consumed in Pakistan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 26:523-31.
- 10- Ulbrichta, C., Baschb, E., Szaparyc, P., Hammernessd, P., Axentseve, S., Boonf, H. 2005. Guggul for hyperlipidemia: A review by the Natural Standard Research Collaboration, *Complementary Therapies in Medicine* 13:279-90.
- 11- Sahni, S., Hepfinger, C.A., Sauer, K.A. 2005. Guggulipid use in hyperlipidemia: case report and review of the literature. *Am J Health Syst Pharm* 62(16):1690-2.
- 12- Tripathi, Y.B., Reddy, M.M., Pandey, R.S., Subhashini, N., Tiwari, O.P., Singh, B.K. 2004. Anti-inflammatory properties of BHUx, a polyherbal formulation to prevent atherosclerosis. *Inflammopharmacology* 12(2):131-52.
- 13- Ahmed, S., Wang, N., Hafeez, B. 2005. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappa B in human

- chondrocytes in vitro. J Nutr 135:2098-102.
- 14- Lansky, E., Newman, R. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 109:177-206.

