

## The effect of *Satureja sahendica* Bornm essential oil on the expression of metalloproteases 1, 2, 9 and 13 in bovine fibroblast-like synoviocytes

Hossein Maghsoudi <sup>1\*</sup> , Enayatollah Yazdanpanah <sup>2</sup> , Ali Moheb <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Biotechnology, Payame Noor university, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Dept of Biology, Payame Noor university, Tehran, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 04 December 2021

Revised: 11 March 2023

Accepted: 19 June 2023

Published Online: 16 December 2023

#### \* Correspondence to:

HosseinMaghsoudi

Dept of Biotechnology

Payame Noor university

Tehran Iran

Email:

hossein\_m2002@yahoo.com

### ABSTRACT

**Introduction:** Osteoarthritis is a progressive, age-related disease characterized by cartilage destruction, subchondral bone formation, and inflammation of the synovial membrane. Given the side effects of conventional OA treatments, including non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids, it is important to consider new treatment options for this disorder. Recently, the role of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of osteoarthritis has attracted attention.

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effect of *Satureja sahendica* Bornm essential oil on the expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and 13 in a model resembling osteoarthritis.

**Material & Methods:** Bovine fibroblast-like synoviocytes were isolated from the articular cartilage of the radiocarpal joint of an 8-month-old Holstein bovine. Using RT-PCR and ELISA, the expression of Matrix metalloproteinase 1, 2, 9, and 12 was measured. The effect of *Satureja sahendica* Bornm essential oil on migration and cell invasion was investigated in transwell.

**Results:** The results showed that *Satureja sahendica* Bornm essential oil significantly reduced the expression of matrix metalloproteinase 9 and 12 in bovine fibroblast-like synoviocytes stimulated by lipopolysaccharide. It also suppresses the migration and invasion of these cells. However, the essential oil of *Satureja sahendica* Bornm had no significant effect on the expression of matrix metalloproteinase 1 and 2.

**Discussion & Conclusion:** Our results show that the essential oil of *Satureja sahendica* Bornm can significantly reduce the activity and inflammatory effect of matrix metalloproteinase 9 and 12. Its potential role as an adjunct to current treatments for osteoarthritis was confirmed. However, cellular modeling does not confirm its beneficial effect in patients with osteoarthritis.

**Keywords:** Fibroblast-like synoviocytes, Matrix metalloproteinase, Migration and cell invasion, Osteoarthritis, *Satureja sahendica* Bornm

### How to cite this paper

Maghsoudi H, Yazdanpanah E, Moheb A. The effect of *Satureja sahendica* Bornm essential oil on the expression of metalloproteases 1, 2, 9 and 13 in bovine fibroblast-like synoviocytes. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(5): 94-108.



## تأثیر عطرمایه مرزه سهندی بر بیان متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۹ و ۱۳ در سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست گاوی

حسین مقصودی<sup>۱\*</sup>، عنایت‌الله یزدان‌پناه<sup>۲</sup>، علی محب<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

**مقدمه:** استئوآرتریت یک بیماری پیش‌رونده و وابسته به سن است که با تخریب غضروف، بازسازی استخوان تحت غضروفی و التهاب غشای سینوویال مشخص می‌شود. با توجه به عوارض درمان‌های معمول استئوآرتریت (Osteoarthritis)، از جمله داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و کورتیکواستروئیدها، بررسی درمان‌های جدید برای این اختلال بسیار مهم است. به‌تازگی، نقش متالوپروتئینازهای ماتریکسی در پاتوژنز استئوآرتریت توجه را به خود جلب کرده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر عطرمایه مرزه سهندی در مهار بیان ژن متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۹ و ۱۳ در سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست گاوی (bovine fibroblast-like synoviocytes/ فیبروبلاست شبه‌سینوویوسیت) تحریک‌شده به وسیله لیپولی ساکارید، به‌عنوان مدلی از استئوآرتریت انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست گاوی (BFLS) از غشای مفصلی غضروف مفصل رادیوکارپال یک گاو هولشتاین ۸ ماهه جدا گردید. سلول‌ها پس از تعیین میزان سمیت توسط روش MTT Assay، در معرض تحریک لیپولی ساکارید بدون یا در حضور دگزامتازون، ایبوپروفن و عطرمایه مرزه سهندی قرار گرفتند. بیان ژن متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۹ و ۱۲ با استفاده از روش RT-PCR و روش ELISA اندازه‌گیری شد. اثر عطرمایه مرزه سهندی بر مهاجرت و تهاجم سلولی توسط Transwell chambers بررسی گردید.

**یافته‌های پژوهش:** عطرمایه مرزه سهندی میزان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۱۳ را در سلول‌های سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست گاوی تحریک‌شده با لیپولی ساکارید به میزان فراوانی کاهش می‌دهد؛ همچنین مهاجرت و تهاجم به سلول‌های یادشده را سرکوب می‌کند. با این حال، عطرمایه مرزه سهندی تأثیر چشمگیری بر بیان متالوپروتئیناز ۱ و ۲ نداشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** عطرمایه مرزه سهندی می‌تواند به‌طور چشمگیری فعالیت و اثر التهابی متالوپروتئیناز ۹ و ۱۲ را در استئوآرتریت کاهش دهد. در این مطالعه نقش بالقوه آن به‌عنوان عامل مکمل درمان‌های رایج در بیماری استئوآرتریت تأیید شد. با وجود این، مدل‌سازی سلولی تأثیر مفید آن را در بیماران مبتلا به استئوآرتریت تأیید نمی‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** استئوآرتریت، متالوپروتئیناز، سینوویوسیت‌های شبه‌فیبروبلاست گاوی، عطرمایه مرزه سهندی، مهاجرت و تهاجم سلولی

نویسنده مسئول:

حسین مقصودی

گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Email: hossein\_m2002@yahoo.com

**استناد:** مقصودی، حسین؛ یزدان‌پناه، عنایت‌الله؛ محب، علی. تأثیر عطرمایه مرزه سهندی بر بیان متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۹ و ۱۳ در سینوویوسیت‌های

شبه‌فیبروبلاست گاوی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آذر ۱۴۰۲؛ ۳۱(۵): ۹۴-۱۰۸.

## مقدمه

استوآرتريت بیماری مزمن دژنراتیو مفصلی با فراوانی بسیار در افراد مسن و علت اصلی ناتوانی جسمی است که منجر به افزایش هزینه و اختلال کیفیت زندگی می‌شود و معمولاً با تخریب مفصل، تغییرات در استخوان زیر غضروف، تشکیل استئوفیت و سینوویت با درجات مختلف مشخص می‌گردد. آرتروز چهارمین علت اصلی ناتوانی تخمین زده می‌شود (۱). بیشتر این ناتوانی ناشی از درگیری مفصل زانو و لگن است. عوامل مستعدکننده سیستمیک بیماری به‌طور خلاصه عبارت‌اند از: عوامل سطح فردی مرتبط با استوآرتريت شامل افزایش سن، جنس زن، اضافه‌وزن، چاقی و نژاد (قومیت) که ممکن است نشان‌دهنده تأثیرات ژنتیکی یا اجتماعی فرهنگی باشند (۲). در میان سلول‌های التهابی که ممکن است در پاتوژنز استوآرتريت مشارکت داشته باشند، سلول‌های سینوویوسیت شبه‌فیروبلست در شروع و هدایت بیماری و در هماهنگی با سلول‌های التهابی بسیار مهم هستند و با ترشح متالوپروتئینازها در مایع سینوویال و حمله مستقیم به ماتریکس خارج سلولی، باعث تخریب غضروف و استخوان می‌شوند و آسیب مفصلی را تشدید می‌کنند. این سلول‌ها ویژگی‌های تهاجمی ذاتی دارند که در سایر فیروبلست‌ها مشاهده نمی‌گردد (۳). فرسایش غضروف به دنبال آرتروز توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریکس مانند ADAMTS و متالوپروتئینازهای ماتریکسی ایجاد می‌شوند. ماتریکس متالوپروتئیناز یک پروتئاز وابسته به روی ( $Zn^{2+}$ ) است که نه تنها نقش مهمی در فرایندهای تجزیه خارج سلولی دارد، بلکه دارای ماتریکس خارج سلولی است که در آسیب‌شناسی آرتروز و تهاجم تومورها نقش دارد (۴). ماکروفاژها با تولید طیف وسیعی از متالوپروتئینازها و واسطه‌هایی که باعث بیان متالوپروتئینازها توسط کندروسیت‌ها می‌شوند، مانند اینترلوکین-۱، فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا و چندین متالوپروتئیناز، در استوآرتريت دخیل هستند. بر اساس داده‌های بالینی و تجربی، شواهد قوی وجود دارد که متالوپروتئیناز نقش مهمی در آسیب غضروفی استوآرتريت ایفا می‌کند (۵). متالوپروتئیناز-۳ عضوی از خانواده

متالوپروتئینازها است و تعدیل‌کننده مشترک ماتریکس خارج سلولی است که در شکل‌گیری بیماری، ترمیم زخم، ترمیم بافت و بازسازی نقش دارد (۶). دخالت سایر متالوپروتئینازها در استوآرتريت کمتر مشخص است؛ به‌عنوان مثال، متالوپروتئیناز-۲ می‌تواند چندین کلاژن را بشکند و گزارش شده است که سایر متالوپروتئینازهای تولیدشده توسط کندروسیت‌ها استوآرتريت را در شرایط آزمایشگاهی فعال می‌کند (۷). با این حال، هنوز مشخص نیست که آیا این آنزیم‌ها در فرایند استوآرتريت واقعی دخیل هستند یا خیر. تنظیم مهارکننده‌های طبیعی متالوپروتئینازها و مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها Tissue inhibitors of metalloproteinase، مسئول تغییر در آسیب غضروف ناشی از متالوپروتئینازها در طول استوآرتريت هستند. مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها ۱ و ۲ می‌توانند طیف وسیعی از متالوپروتئینازها از جمله متالوپروتئیناز-۳ را مهار کنند (۸). گروهی از محققان ثابت کردند که سطح بیان متالوپروتئیناز-۳ سرم و واسطه‌های التهابی در آرتروز با شدت بیماری ارتباط مثبت دارد؛ بنابراین، متالوپروتئیناز-۳ می‌تواند به‌طور بالقوه برای تشخیص آرتروز با نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی استفاده شود (۹). یانگ و همکاران مشخص کردند که Nicotinamide phosphoribosyl transferase عملکرد کاتابولیک خود را با کاهش بیان آگریکان و تنظیم بیش‌ازحد متالوپروتئیناز-۳ و متالوپروتئیناز-۱۳ انجام می‌دهد که یک ویژگی کلیدی پاتوژنز استوآرتريت و هدف مستقیم عامل کمبود اکسیژن hypoxia-inducible factor subunit 2 ( $HIF2\alpha$ ) در کندروسیت‌های مفصلی و غضروف آرتروز است (۱۰). با وجود بروز بالای آرتروز، در حال حاضر هیچ درمان مؤثری برای درمان یا متوقف کردن پیشرفت این اختلال وجود ندارد. درمان‌های جراحی مانند استئوتومی و تعویض مفصل گزینه‌های مناسبی هستند. استروئیدها و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی اصلی‌ترین داروهای مسکن به‌شمار می‌روند. با این حال، به علت اثربخشی محدود و عوارض جانبی آن‌ها، از جمله عوارض شدید قلبی عروقی و گوارشی، نمی‌توان آن‌ها را در درازمدت مصرف کرد؛

سهندی و انجام گاز کروماتوگرافی توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران صورت گرفت.

کشت سلول‌های فیروبلست شبه‌سینوویوسیت گاوی: جداسازی سلول‌های فیروبلست شبه‌سینوویوسیت گاوی از مایع مفصلی، مفصل کف‌دستی بندانگشتی Carpometacarpal joint گوسالۀ هشت‌ماهه سالم انجام شد. پس از کشیدن مایع مفصلی به فلاسک حاوی محیط کشت DMEM-F12 غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، اسید اسکوریک 50 µg/mL و ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پنی‌سیلین 100 U/mL، استرپتومایسین 100 µg/mL، جنتامایسین 50 µg/mL و آمفوتریسین-ب 25 µg/mL در داخل فلاسک‌های 25 cm<sup>2</sup> در انکوباتور با شرایط ۵٪ CO<sub>2</sub>، دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری گردید. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیشتر از ۸۰ درصد، اقدام به شمارش سلول‌ها توسط محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها تعیین و سلول‌هایی با ۹۵ درصد زنده‌مانی برای کشت بعدی انتخاب گردید (۱).

تقسیم‌بندی گروه‌های پژوهش و تیمار سلول‌ها: گروه‌های پژوهش به هشت گروه تقسیم شدند که جدول شماره ۱ نحوهٔ گروه‌بندی آن‌ها را نشان می‌دهد. کشت سلول‌های فیروبلست شبه‌سینوویوسیت گاوی به تعداد ۱۰<sup>6</sup> x در فلاسک‌های 275 cm<sup>2</sup> در هشت گروه و نگهداری به مدت ۱-۲ ساعت در انکوباتور و سپس تزریق عطرهای مرزۀ سهندی به میزان 22/16 µg/mL صورت گرفت و همهٔ فلاسک‌ها به مدت ۵ دقیقه روی شیکر با حرکت چرخشی 50 rpm قرار گرفتند و مجدداً به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. به‌منظور فراهم کردن شرایطی شبیه به بیماری استئوآرتریت و افزایش بیان سایتوکین‌های پیش‌التهابی از لیوپلی ساکارید به میزان 100 ng/ml استفاده گردید (۱۴). دگزامتازون سولفات سدیم به میزان 4 mg/ml (۱)، ایوپروفن (ضدالتهاب غیراستروئیدی) به میزان 10 mg/ml (۲)، لیوپلی ساکارید به‌عنوان کنترل مثبت و مقایسهٔ اثر آن‌ها با عطرهای مرزۀ سهندی و دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی در گروه‌های پژوهش استفاده شد. در مطالعات پیشین، این گروه

بنابراین، نیاز به ایمنی و کارایی بیشتری در درمان آرتروز وجود دارد (۳). مرزۀ سهندی با نام علمی Satureja sahendica Bormm یکی از گیاهان بومی ایران است. فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، ضددیابتی، گشادکنندهٔ عروق و ضد درد به‌عنوان کاربردی‌ترین خواص زیرگونهٔ Satureja گزارش شده است. جنبه‌های درمانی این گونه‌ها را بیشتر می‌توان به روغن‌های فرار، فلاونوئیدها و تریترپنوئیدها اختصاص داد (۴). در این مطالعه آثار عطرهای مرزۀ سهندی بر بیان متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۹ و ۱۲ و مهاجرت و تهاجم سلولی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

همهٔ مراحل این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام‌نور واحد شهرری در سال ۱۴۰۰ انجام شده است. مواد شیمیایی استفاده‌شده: محیط‌های کشت سلول DMEM-F12 (D8437), RPMI-1640 (R8758) ال‌گلوتامین (C 59202)، سرم جنین گاوی (F 7524)، بیکرینات سدیم (S 5761)، گلوکوز-۴-۲-هیدروکسیل (پیرازین-۱-اتانوسولفونیک اسید (H 0887) (HEPES)، کیت MTT Assay (CT 01) معرف گریس (G 4410)، لیوپلی ساکارید (L Escherichia coli serotype O127:B8) (E 4516) پیرووات سدیم (P 5280)، تریپان بلو (T 6146)، Trypsin-EDTA 0.25% (T 4049) معرف تریزول (T 9424)، فنل-کلروفرم ایزومیل الکل (P 3803) و بتا مرکاپتواتانل (M 6250) از کمپانی سیگما (انگلستان)، کیت اندازه‌گیری متالوپروتئیناز-۱۳ (G-BOFI00148.96) و کیت اندازه‌گیری متالوپروتئیناز-۹ (G-BOFI00118.96) از کمپانی بیومل (انگلستان) و جنتامایسین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۵۰۷۰-۰۶۳) از شرکت ایده‌زیست نو ترکیب (ایران) و کیت استخراج RNA، کیت تبدیل RNA به cDNA توسط RT-PCR kit Vivantis-۲ Steps RT-PCR kit و مستر میکس RT-PCR و پرایمرها از کمپانی سیناژن (ایران) خریداری گردید و آمفوتریسین-ب از کمپانی سیپلا (هندوستان) تهیه شد. تهیهٔ عطرهای مرزۀ سهندی: تهیهٔ عطرهای مرزۀ

از سلول‌های سینه‌ویوسیت توسط آنتی‌بادی ویمتین تأیید شده بودند.

جدول شماره ۱. گروه‌های پژوهش

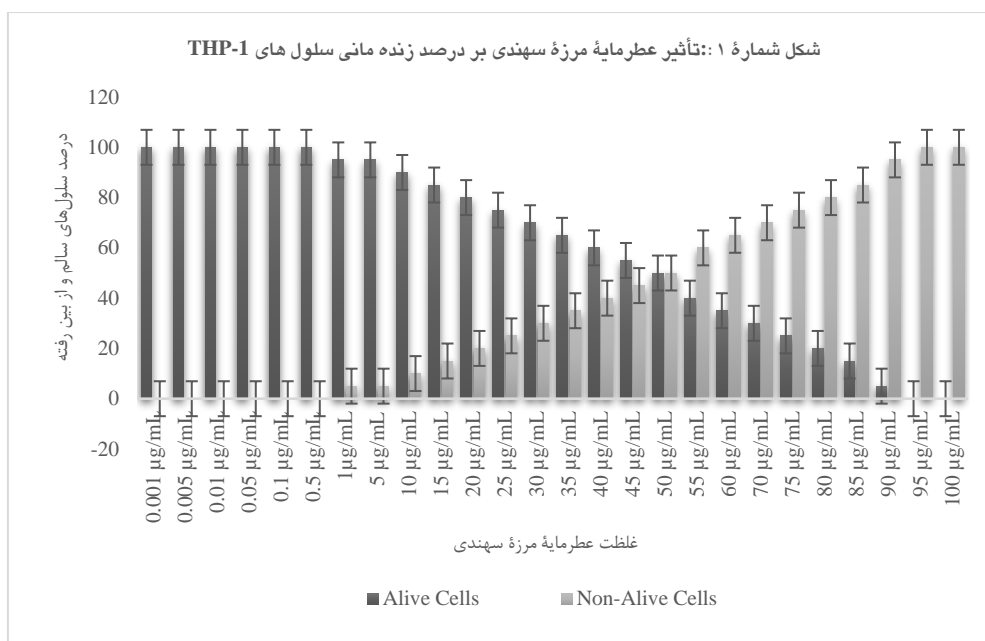
شماره گروه	گروه‌های پژوهش	دی‌متیل سولفو کساید	ایوپروفن	دگزامتازون	عطر مایه مرزه سهندی	لیپوپلی ساکارید	سلول (6x10 <sup>6</sup> )
۱	کنترل منفی (سلول)	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	+ve
۲	گروه شاهد (سلول+عطر مایه مرزه سهندی)	-ve	-ve	-ve	+e	-ve	+ve
۳	کنترل مثبت (سلول+لیپوپلی ساکارید)	-ve	-ve	-ve	-ve	+ve	+ve
۴	گروه تیمار (سلول+لیپوپلی ساکارید+عطر مایه مرزه سهندی)	-ve	-ve	-ve	+e	+e	+e
۵	گروه تیمار (سلول+لیپوپلی ساکارید+دگزامتازون)	-ve	-ve	+e	-ve	+ve	=e
۶	گروه تیمار (سلول+لیپوپلی ساکارید+ایوپروفن)	-ve	+e	-ve	-ve	+ve	+e
۷	گروه شاهد (سلول+لیپوپلی ساکارید+دی‌متیل سولفو کساید)	+e	-ve	-ve	-ve	+w	+e
۸	گروه شاهد (سلول+دی‌متیل سولفو کساید)	+ve	-ve	-ve	-ve	-ve	+e

1, 5x10<sup>-1</sup>, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95 and 100 µg/mL به همه چاهک‌ها افزوده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار گرفتند؛ سپس لیپوپلی ساکارید به میزان 100 ng/mL به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و دوباره در انکوباتور کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعد، به هر کدام از چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT افزوده گردید و مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور کشت سلولی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در پایان این مدت، همه محیط کشت سلولی از چاهک‌ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوبوتیل الکل به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید تا کریستال فومارازان حل شود. میزان جذب محلول هر کدام از چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. با افزایش میزان عطر مایه مرزه سهندی، به تدریج درصد زنده‌مانی کاهش پیدا می‌کند،

بررسی سیتوتوکسیسیته به روش MTT Assay: برای

بررسی سیتوتوکسیسیته عطر مایه مرزه سهندی و تعیین LC50 از روش رنگ‌سنجی استفاده گردید. پودر MTT یک نمک تترازولیم محلول در آب است که این محلول در محیط کشت فاقد فنل رد یا بافر PBS حل می‌شود و ترکیب زردرنگ ایجاد می‌کند. اساس این تست شکستن بلور فومارازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی زنده است. نتیجه این حالت ایجاد بلورهای نامحلول فومارازان ارغوانی‌رنگ است که توسط دی‌متیل سولفو کساید به حالت محلول درمی‌آید. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعداد بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بر اساس دستورالعمل ( )، سلول‌های فیروبللاست شبه‌سینه‌ویوسیت به تعداد ۱۰۵ در پلیت ۲۴ چاهکی کشت داده شدند و به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور نگهداری و سپس عطر مایه مرزه سهندی با غلظت‌های (۰, 1x10<sup>-1</sup>, 5x10<sup>-2</sup>, 1x10<sup>-2</sup>, 5x10<sup>-1</sup>, 1x10<sup>-3</sup>)

به صورتی که در غلظت 45 µg/mL این درصد در سلول‌های سینوویوسیت به میزان ۵۰ درصد کاهش می‌یابد. برای تیمار سلول‌ها از میانگین 22/16 µg/mL استفاده گردید (شکل



شکل شماره ۱. تعیین درصد زنده ماندنی سلولی به روش Trypan Blue برای BFLSc.

میلی‌متر میلی متر و قطر منافذ ۸ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Costar NY14831, USA). تعداد ۱ × ۱۰۵ سلول سلول فیروپلاست شبه سینوویوسیتساینوویوسیت ، بعد پس از تیمار با عطرمایه‌آسانس مرزه سهندی به مدت ۲۴ ساعت، در قسمت بالایی فیلتر دولایه پلیت Transwell Chamber کشت داده شد. سپس محیط کشت بدون سرم همراه یا بدون میزان ۱۰۰ نانوگرم نانوگرم بر میلی‌لیتر، میلی‌لیتر به قسمت پایین پلیت اضافه شد گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C و غلظت گاز دی‌اکسید کربن ۵٪ درصد ۵ نگهداری شد تا سلول‌ها به طبقه پایین مهاجرت کنند. سپس سلول‌های مهاجرت نکرده در طبقه بالا توسط سوپ استریل جمع‌آوری گردید جمع‌آوری شده و با کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. سلول‌های سلول‌های مهاجرت نکرده در پنج قسمت مختلف از پلیت مربوطه توسط میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی بزرگ نمایی ۱۰۰ شمارش شدند گردیدند. برای تعیین سنجش میزان مهاجم طبق پروتکل دستورالعمل، ابتدا منافذ در قسمت بالایی فیلتر دولایه توسط ماتریژل پوشش داده

سلول‌های BFLSc به میزان تعداد ۱۰۵ به پلیت ۲۴ چاهکی منتقل و به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند و سپس عطرمایه مرزه با غلظت‌های (۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵ and ۱۰۰ µg/mL) به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار گرفتند و سپس شمارش سلول‌ها با استفاده از لام شمارش Newbar در هر کدام از چاهک‌های مدنظر با سه نوبت تکرار انجام پذیرفت. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزایش میزان عطرمایه مرزه سهندی، به تدریج درصد زنده‌مانی کاهش پیدا می‌کند، به صورتی که در غلظت‌های 45 µg/mL این درصد در سلول‌های THP-1 به میزان ۵۰ درصد کاهش می‌یابد. داده‌ها به‌عنوان میانگین ±۱ در سه نوبت آزمایش تکراری مستقل ارائه شده است (\*P<0.01 و \*\*P<0.001).

سنجش مهاجرت و مهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی: مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی به‌وسیله‌بوسیله اتافک‌های کشت ترانسول با ضخامت ۶/۵

شد و محیط کشت به قسمت پایینی اتاقک اضافه شد گردید؛ سپس تعداد  $5 \times 10^4$  سلول را به محیط کشت مخلوط شده با 2% FBS درصد انتقال داده و به Transwell که قبلاً ماتریزل زده شده زده شده بود، اضافه شدند گردید و به مدت ۲۴ ساعت به سلول‌ها سلول‌ها اجازه تهاجم و مهاجرت داده شد؛ سپس سلول‌های بالایی توسط سوآپ برداشته برداشته شده و سلول‌های پایینی شمارش شدند.

واکنش زنجیره‌ای PCR برای لیز کردن سلول‌ها سلول‌ها از جداسازی RNA (کاتالوگ نامبر در قسمت مواد شیمیایی تایپ شده است): برای لیز کردن سلول‌ها سلول‌ها از معرف Trizol استفاده گردید و استخراج RNA با فنل-کلروفرم ایزومیل الکل انجام پذیرفت. پس از تحریک شدید و انکوباسیون ۳ دقیقه‌ای در دمای اتاق، نمونه‌ها نمونه‌ها با سانتریفیوژ شدند و یک فاز آبی حاوی RNA جمع‌آوری گردید. RNA با ایزوپروپیل الکل ته‌نشین شده و مجدداً در آب بدون RNase حل گردید. در نهایت، برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکتروفتومتری

استفاده شد و در صورت وجود آلودگی DNA، از آنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی استفاده نمود استفاده قرار می‌شود می‌گیرد.

سنتر cDNA (کاتالوگ نامبر در قسمت مواد شیمیایی تایپ شده است): برای هر نمونه، ۱  $\mu$ g از RNA توسط RT-PCR steps در شرایط: دمای ۴۲ درجه ه سانتی‌گراد سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۹۴ درجه ه سانتی‌گراد سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تبدیل به cDNA تبدیل گردید. با استفاده از پرایمرهایی اختصاصی (جدول شماره ۲)، برای هر کدام هر کدام از سایتو کین‌ها سایتو کین‌ها مطالعه شده‌مورد مطالعه، Semiquantitative PCR انجام گردید شد و ژن گلیسر آلدهید-۳-فسفات (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به‌عنوان عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد گردید و. و فرآورده PCR در آگارز آگارز ژل ۱/۵ درصد کنترل شد.

جدول شماره ۲. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها

NCBI Reference Sequence		Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	PCR Product Length(bp)
NM_174112.1	B.MMP-1	GGTGGAACCTTGCTCATGC	CTGCCACCCGGTACAAGTT A	118
NM_174745.2	B.MMP-2	CCGCTACGTTTTCTCGGAT	AGTGGGAATCTCCCCAAC T	154
BC142430.1	B.MMP-9	GACCAAGTGCTATCCTCACC A	TCCTGGAAGACCACAAC GG	119
NM_174389.2	B.MMP-13	AGACAGATTCTTCTGGCGGC	TAGGCGCATCAATACGG TT	102
NM_00103403 4.2	B.GAPDH	AAGGTCGGAGTGAACGGAT TC	ATTGATGGCGACGATGTCC A	90



نمودن آخرین قطره بافر از هر چاهک،  $100 \mu\text{L}$  از محلول HRP-Streptavidin به هر چاهک افزوده گردید و پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه روی شیکر با حرکات دورانی با سرعت ملایم قرار داده شد. دوباره محلول رویی هر چاهک دور ریخته و سپس توسط محلول شستشودهنده، در سه نوبت چاهک‌ها شستشو گردید. پلیت برعکس گذاشته شد تا آخرین قطرات محلول شستشودهنده خارج گردد. مجدداً  $100 \mu\text{L}$  محلول رنگی ELISA Colorimetric TMB به هر چاهک اضافه شد؛ سپس توسط نایلون سیاه کاور گردید و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه، بر شیکر با حرکات دورانی با سرعت ملایم قرار داده شد.  $50 \mu\text{L}$  از Stop Solution به هر چاهک افزوده و چگالی نوری توسط Microplate Reader در OD 450 nm اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری: همه داده‌ها به‌عنوان میانگین با انحراف معیار  $\pm 1$  بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از ANOVA, Student-Newman-Keuls، REST-2000 انجام یافت. برای آنالیز از Cts استفاده گردید و  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$  به شکل آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

### یافته‌های پژوهش

اثر مهارکنندگی عطرمایه مرزه سهندی بر توانایی مهاجرت و تهاجم سلول‌های سینوویوسیت: به‌منظور بررسی اثر مهارکنندگی عطرمایه مرزه سهندی بر توانایی مهاجرت و تهاجم سلول‌های سینوویوسیت که با لیپوبلی ساکارید تحریک شده بودند، از ترانسول چیمبر استفاده گردید. همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، توانایی مهاجرت سلولی در محیط آزمایشگاهی سلول‌های سینوویوسیت تا  $3/5$  برابر زمانی که با لیپوبلی ساکارید تحریک شده بودند، افزایش یافت. به‌طور مشابهی، اطلاعات به‌دست‌آمده از سنجش تهاجم سلولی نشان می‌دهد که تحریک با لیپوبلی ساکارید باعث افزایش قدرت تهاجم سلول‌های سینوویوسیت تا  $7/02$  برابر در مقایسه با گروه کنترل شد. با این حال، سرکوب توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی در سلول‌های سینوویوسیت تحریک‌شده با لیپوبلی ساکارید

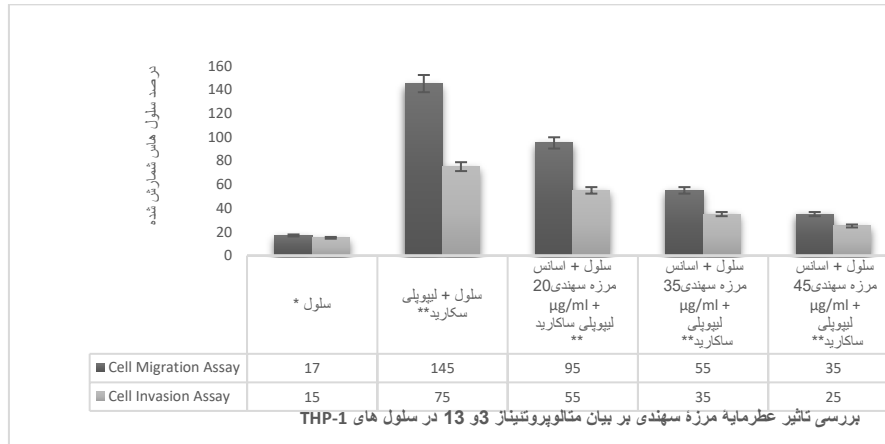
سنجش کمی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی: PCR در زمان واقعی با استفاده از همان پرایمرهایی که برای PCR کیفی استفاده گردید (جدول شماره ۲)، صورت گرفت و از evergreen به‌عنوان مستر میکس استفاده شد. نتایج  $CTs$  (Threshold Cycle) توسط دوروش منحنی استاندارد و روش Pfaffi ارزیابی گردیدند. در اصل  $CTs$  اعداد شمارشی هستند و معنی‌دار بودن آن‌ها ابتدا توسط ANOVA تعیین شد و در مرحله دوم توسط نرم‌افزار Student-Newman-Keuls (SNK)، REST-2000 ارزیابی گردید. در پایان، برای تعیین میزان بیان ژن از روش  $\Delta\Delta$  Pfaffi (ct) Method (2) - استفاده شد.

الایزا: کشت سلول‌های سینوویوسیت به تعداد  $10610 \times$  در هر فلاسک برای هشت گروه و نگهداری در انکوباتور به مدت ۲-۳ ساعت و سپس تیمار سلول‌ها با دگزامتازون، ایبوپروفن، عطرمایه مرزه سهندی  $22/16 \mu\text{g/mL}$  و DMSO و نگهداری مجدد در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت و سپس افزودن لیپوبلی ساکارید  $100 \text{ ng/mL}$  برای همه گروه‌ها به‌غیر از گروه اول و نگهداری مجدد در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعدی،  $100 \mu\text{L}$  از محلول‌های استاندارد کیت اندازه‌گیری متالوپروتئیناز-۹ و ۱۳ و سپس  $100 \mu\text{L}$  از مایع رویی محیط کشت به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید و نگهداری پلیت‌ها در تاریکی به مدت  $2/5$  ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه صورت گرفت. پس از خارج کردن محیط رویی چاهک‌ها، دو نوبت شستشوی همه چاهک‌ها با بافر شستشو انجام شد و پس از خارج کردن آخرین قطره بافر از هر چاهک،  $100 \mu\text{L}$  آنتی‌بادی Biotinylated به هر چاهک افزوده گردید و سپس پلیت به مدت یک ساعت روی شیکر با حرکات دورانی با سرعت ملایم در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. محلول روی دور ریخته شد؛ سپس توسط  $300 \mu\text{L}$  محلول شستشودهنده، در سه نوبت چاهک‌ها شستشو گردید. پلیت برعکس گذاشته شد تا آخرین قطرات محلول شستشودهنده خارج گردد. پس از خارج کردن محیط رویی چاهک‌ها، دو نوبت شستشوی همه چاهک‌ها با بافر شستشو صورت گرفت و بعد از خارج



وابسته به دوز است. نتایج حاکی از آن است که غلظت‌های غیرسمی از عطرهای مرزّه سهندی از ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شرایط آزمایشگاهی، قادر به کاهش میزان توانایی

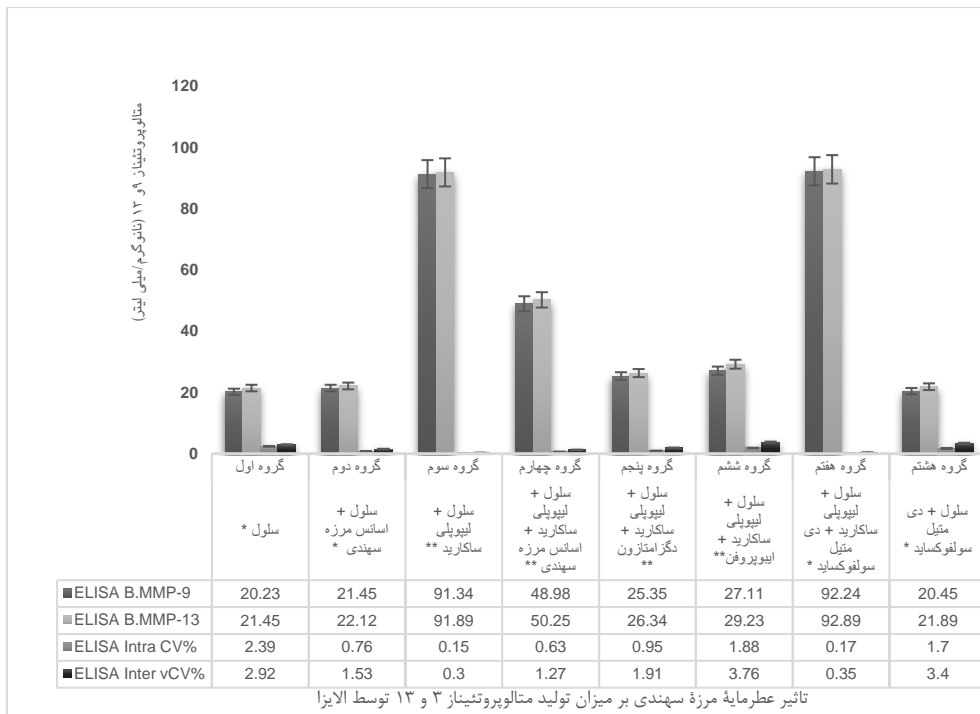
تهاجم و مهاجرت سلولی در سلول‌های سینوویوسیت تحریک‌شده با لیپوپلی ساکارید می‌شود (شکل شماره ۲).



**شکل شماره ۲.** سلول‌های BFLSc با غلظت‌های مشخصی از عطرهای مرزّه سهندی در محیط کشت حاوی سرم به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی سلول‌های BFLSc به وسیله سنجش میزان مهاجرت و تهاجم سلولی مشخص گردید. سلول‌های THP-1 با غلظت مشخصی از عطرهای مرزّه سهندی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند؛ سپس به سلول‌های BFLSc با یا بدون LPS (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت، اجازه مهاجرت داده شد. سلول‌هایی که مهاجرت و تهاجم کرده بودند، در سه آزمایش مستقل به صورت میانگین  $\pm 1$  خطای استاندارد در نمودار فوق رسم گردید. نتایج توسط آزمون آنوا ارزیابی شد ( $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ).

میزان بیان پروتئین‌های مطالعه‌شده در سلول‌های تیمار شده با عطرهای (گروه ۲) تقریباً شبیه سلول‌های گروه اول بود و دی‌متیل سولفو کساید هیچ تغییری بر کاهش بیان پروتئین‌های مطالعه‌شده در سلول‌های تحریک‌شده با لیپوپلی ساکارید (گروه ۷) و سلول‌های بدون تحریک (گروه ۸) را نشان ندادند (شکل شماره ۲، گروه ۴). به منظور بیان دقت یا تکرارپذیری نتایج تست ایمونواسی، معمولاً دو معیار ضریب تغییرپذیری Inter CV و Intra CV باید در نظر گرفته شود. ضریب تغییرپذیری Coefficient of Variability یک عدد بدون بعد است که به عنوان انحراف استاندارد مجموعه‌ای از اندازه‌گیری‌ها تقسیم بر میانگین مجموعه تعریف می‌شود. نتایج  $Intra CV < 15\%$  و  $Inter CV < 10\%$  بود؛ در نتیجه، نتایج الیزا قابل قبول هستند (شکل شماره ۳).

تأثیر عطرهای مرزّه سهندی بر تولید متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۳ و ۹ در سلول‌های سینوویوسیت: به منظور مقایسه تأثیر عطرهای مرزّه سهندی، دگزامتازون و ایوپروفن بر تولید متالوپروتئیناز ۳ و ۱۳ در سلول‌های سینوویوسیت در گروه‌های هشت گانه (جدول شماره ۱) و مقایسه تجزیه و تحلیل کمی نتایج RT-PCR نشان داد که افزودن لیپوپلی ساکارید منجر به افزایش چشمگیر تولید متالوپروتئیناز ۳ و ۱۳ در سلول‌های سینوویوسیت می‌شود (شکل شماره ۲، گروه ۳). تیمار با دگزامتازون (گروه ۵) و ایوپروفن (گروه ۶) در سلول‌های تحریک‌شده توسط لیپوپلی ساکارید به طور چشمگیر و معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) میزان تولید متالوپروتئیناز ۳ و ۱۳ را کاهش (۹۰ درصد) دادند. درباره تیمار با عطرهای مرزّه سهندی (گروه ۴) هم این کاهش سطح بیان (۵۰ درصد) در مورد همه پروتئین‌های مطالعه‌شده تعیین گردید ( $P < 0.001$ ).

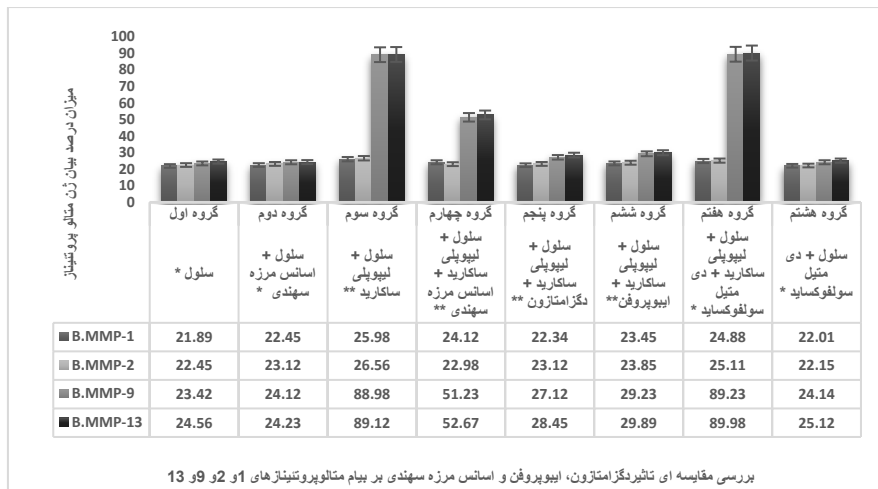


تأثیر عطرمایه مرزه سهندی بر میزان تولید متالوپروتئیناز ۳ و ۱۳ توسط الیزا

**شکل شماره ۳.** مقایسه تأثیر عطرمایه مرزه سهندی، دگزاتازون و ایوپروفن بر سلول‌های سینوویوسیت تحریک شده توسط LPS بر بیان متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۳ و ۹ با استفاده از Real-Time-PCR. کشت سلول‌ها به میزان  $10^6 \times 1$  در هر فلاسک برای هشت گروه و نگهداری در انکوباتور به مدت ۲-۳ ساعت انجام شد و سپس تیمار سلول‌ها با دگزاتازون، ایوپروفن و عطرمایه مرزه سهندی و DMSO و نگهداری مجدد در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت و سپس تریقی LPS 100 ng/mL برای همه گروه‌ها به غیر از گروه اول صورت گرفت و مجدداً در انکوباتور برای ۲۴ ساعت نگهداری شد. مقدار بیان طبیعی MMP-9، MMP-13 در گروه اول نشان داده شده است. اختلاف معنی دار آماری میان گروه چهارم و سایر گروه‌ها با استفاده از Student - Newman-Keuls میانگین تجزیه و تحلیل گردید و در سه آزمایش مستقل به صورت میانگین  $\pm 1$  خطای استاندارد نشان داده شد ( $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ).

لیپوپلی ساکارید به طور چشمگیر و معنی داری ( $P < 0.001$ ) سطح بیان متالوپروتئیناز-۳ و متالوپروتئیناز-۱۳ را کاهش (۹۰ درصد) دادند. درباره تیمار با عطرمایه مرزه سهندی (گروه ۴) هم این کاهش سطح بیان (۵۰ درصد) در مورد همه پروتئین‌ها مطالعه شده تعیین گردید ( $P < 0.001$ ). میزان بیان پروتئین‌های مطالعه شده در سلول‌های تیمار شده با عطرمایه (گروه ۲) تقریباً شبیه سلول‌های گروه اول بود و دی‌متیل سولفو کساید هیچ تغییری بر کاهش بیان پروتئین‌های مطالعه شده در سلول‌های تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (گروه ۷) و سلول‌های بدون تحریک (گروه ۸) را نشان نداد (شکل شماره ۴، گروه ۳).

تأثیر عطرمایه مرزه سهندی بر بیان ژن متالوپروتئیناز ۱، ۲، ۳ و ۹ در سلول‌های سینوویوسیت: به منظور مقایسه تأثیر عطرمایه مرزه سهندی، دگزاتازون و ایوپروفن بر بیان متالوپروتئیناز-۱، ۲، ۳ و ۹ و متالوپروتئیناز-۱۳ در سلول‌های سینوویوسیت در گروه‌های هشت گانه (جدول شماره ۱) و مقایسه تجزیه و تحلیل کمی نتایج RT-PCR نشان داد که افزودن لیپوپلی ساکارید به افزایش چشمگیر سطح بیان متالوپروتئیناز-۱، ۲، ۳ و ۹ و متالوپروتئیناز-۱۳ در سلول‌های سینوویوسیت منجر می‌شود (شکل شماره ۴، گروه ۳). تیمار با دگزاتازون (گروه ۵) و ایوپروفن (گروه ۶) در سلول‌های تحریک شده توسط



**شکل شماره ۴.** مقایسه تأثیر عطر مایه مرزه سهندی، دگزامتازون و ایبوپروفن بر سلول‌های سینوویوسیت تحریک شده توسط LPS بر بیان متالوپروتئین‌ها ۱، ۲، ۳، ۹ و ۱۳ با استفاده از Real-Time PCR. کشت سلول‌ها به میزان  $10^6 \times 1$  در هر فلاسک برای هشت گروه و نگهداری در انکوباتور به مدت ۲-۳ ساعت انجام شد و سپس تیمار سلول‌ها با دگزامتازون، ایبوپروفن و عطر مایه مرزه سهندی و DMSO و نگهداری مجدد در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت و سپس تزریق LPS 100 ng/mL برای همه گروه‌ها به غیر از گروه اول صورت گرفت و مجدداً در انکوباتور برای ۲۴ ساعت نگهداری شد. مقدار بیان طبیعی MMP-9، MMP-13 در گروه اول نشان داده شده است. اختلاف معنی دار آماری میان گروه چهارم و سایر گروه‌ها با استفاده از Student - Newman-Keuls میانگین تجزیه و تحلیل گردید و در سه آزمایش مستقل به صورت میانگین  $\pm 1$  خطای استاندارد نشان داده شد ( $P < 0.01$ ) و  $P < 0.001$  \*\*.

## بحث و نتیجه گیری

فیروز مانند سیروز کبدی، بیماری‌های فیروتیک ریه، تصلب شرایین و ضعف ماتریکس مانند کاردیومیوپاتی و آنوریسم آئورت (۱). در شرایط عادی، کندروسیت‌های مفصلی با حفظ تعادل میان سنتز و تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی توسط کلاژن نوع II و آگریکان و پروتئوگلیکان در غضروف مفصلی، تعادل پویایی را حفظ می‌کنند (۲). در آرتروز، اختلال در تعادل ماتریکس به از دست دادن تدریجی بافت غضروف، گسترش کلونال کندروسیت‌ها در مناطق تخلیه شده، القای حالت‌های اکسیداتیو در محیط سلولی استرس‌زا و در نهایت، آپوپتوز سلول‌ها منجر می‌گردد (۳). با پیشرفت بیماری، معمولاً تخریب و سنتز مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی در مفصل افزایش می‌یابد و با افزایش متابولیسم کندروسیت‌ها به علت تولید بیش از حد سایتوکین‌های التهابی و آنزیم‌های تجزیه کننده ماتریکس، همراه با تنظیم نامناسب سیگنالینگ آنابولیک در نهایت، به تخریب ماتریکس خارج سلولی و متعاقب آن، تخریب غضروف منجر می‌شود (۴). لیپوپلی ساکارید فعال کننده دستگاه ایمنی ذاتی مانند ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها است که از طریق اتصال به کمپلکس گیرنده‌های ناقوسی شکل شماره ۴ (Toll-like receptor 4)، فعالیت خود

خانواده ماتریکس متالوپروتئین‌ها شامل بیش از ۲۶ اندوپیتیداز است که توالی پروتئینی همولوگ دارند و با ساختار دومین‌های حفظ شده و دومین‌های اختصاصی مربوط به مواد اختصاصی و تشخیص سایر پروتئین‌ها هستند و این تنوع فراوان آن‌ها تأثیر بسیار بسیاری بر شرایط پاتوفیزیولوژیکی بیماری‌ها فراهم می‌کند (۵). ماتریکس متالوپروتئین‌ها به همراه پروتئین‌های سیستین، پروتئین‌های آسپارتیک و پروتئین‌های سرنی آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که در تخریب ماتریکس خارج سلولی و غشاهای پایه دخیلاوند ماتریکس خارج سلولی هم در شرایط فیزیولوژی مانند تکامل جنین و هم در شرایط پاتولوژیک مانند بیماری‌های التهابی (۶) و پیر شدن پوست ناشی از اشعه ماوراءبنفش دخالت دارند (۷). تولید بیش از حد متالوپروتئین‌ها در موارد پاتولوژیکی متعددی گزارش شده است و مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: در موارد تخریب بافت مانند تهاجم سلول‌های سرطانی و متاستاز، آرتروز روماتوئید، استئوآرتروز، زخم بستر، زخم معده، زخم قرینه، بیماری ریودنتال، آسیب مغزی و در بیماری‌های التهابی عصبی و

۹ در تخریب بافت فیروکتین و القای تهاجم سلولی در مقایسه با متالوپروتئیناز-۲ باشد؛ همچنین این اثر ممکن است مربوط به اتصال مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز Tissue Inhibitor of Metalloprotease ها به دومین شبه‌هموپکسین در متالوپروتئیناز-۲ باشد که مانع فعالیت این متالوپروتئیناز با وجود دومین O-glycosylated در متالوپروتئیناز-۹ می‌شود. ممکن است متالوپروتئیناز-۱۳ مربوط به اتصال مهارکننده بافتی متالوپروتئینازها به دومین شبه‌هموپکسین در متالوپروتئیناز-۲ باشد که مانع فعالیت این متالوپروتئیناز یا اتصال به دومین کاتالیزوری یا دومین شبه‌هموپکسین شود. با این حال، مطالعات بیشتری برای روشن شدن این محتوا مورد نیاز است. با توجه به مطالعه لی و همکاران، درمان با آنتی‌بادی anti-TLR4 و مهارکننده TLR4 بیان و فعالیت آنزیمی متالوپروتئیناز-۹ ناشی از لیوپلی ساکارید را کاهش داد. علاوه بر این، مهار TLR4 فعالیت رونویسی فاکتور نکروزدهنده کاپا بی (Nuclear factor kappa B) ناشی از لیوپلی ساکارید را می‌کاهد. TLR4 مبدل اصلی سیگنال بالادست NF-κB است که توسط لیگاندهای TLR و سایتوکین‌ها فعال می‌شود. NF-κB با اتصال به مولکول‌های خانواده IκB در سیتوپلاسم ترشح می‌شود و با فسفوریلاسیون IκBα فعال می‌گردد که تجزیه بعدی آن در پروتئوزوم، به زیرواحدهای NF-κB از جمله p50 و p65 اجازه می‌دهد تا وارد هسته شوند و ژن‌های هدف را فعال کنند ( ). متالوپروتئیناز-۱۳ در آرتروز افزایش بیان می‌یابد و تا حدی مسئول تخریب کلاژن‌ها و پروتئوگلیکان‌ها در غضروف و استخوان است که به از بین رفتن عملکرد مفصل منجر می‌گردد و نقش بسیار مهمی در استئوآرتریت دارد ( ). مهار فعالیت متالوپروتئیناز-۱۳ یک هدف درمانی جذاب برای تحقیقات دارویی علیه استئوآرتریت است. با این حال، بسیاری از مهارکننده‌های طیف گسترده‌ای از متالوپروتئینازها که تاکنون کشف شده‌اند، عوارض جانبی دردناکی را در پی داشته‌اند. متالوپروتئینازها، غیر از متالوپروتئیناز-۱۳، نقش مهمی در بازسازی و ترمیم بافت طبیعی ایفا می‌کنند و تصور می‌شود که مهار این عملکردها باعث عوارض جانبی

را نشان می‌دهد. در این تحقیق از لیوپلی ساکارید برای شبیه‌سازی التهاب و افزایش بیان ژن متالوپروتئینازها در کشت سلولی استفاده شد ( ). متالوپروتئیناز-۱۳ در تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن فیبریلار، فیروکتین و آگریکان نقش دارد و کلاژن‌های ماریچ سه‌گانه از جمله کلاژن نوع I، نوع II و نوع III را از بین می‌برد؛ اما بیشترین فعالیت را با کلاژن محلول نوع II دارد؛ همچنین می‌تواند کلاژن نوع IV، نوع XIV و نوع X را تخریب کند و نیز ممکن است با فعال یا تخریب پروتئین‌های تنظیم‌کننده کلیدی مانند فاکتور رشد تغییردهنده بتا (Transforming Growth Factor Beta) و فاکتور رشد بافت همبند (Connective Tissue Growth Factor) عمل کند. تصور می‌شد که متالوپروتئیناز-۱۳ در بافت همبند به‌ویژه غضروف و استخوان در حال توسعه بیان می‌شود. با این حال، متالوپروتئیناز-۱۳ در سلول‌های اپیتلیال و عصبی نیز تشخیص داده شده است. متالوپروتئیناز-۱۳ در بافت‌های غضروفی بیماران مبتلا به آرتروز بیش از حد بیان می‌گردد و افزایش بیان متالوپروتئیناز-۱۳ در کندروسیت‌ها ممکن است Coefficient of Variability به توسعه آرتروز کمک کند ( ). فرم فعال‌شده متالوپروتئیناز-۱۳ شامل یک دومین کاتالیزوری و یک دومین شبه‌هموپکسین haemopexin-like domain است. نکته مهم این است که دومین شبه‌هموپکسین بر خواص تخریب متالوپروتئیناز-۱۳ غالب است. اگرچه دومین کاتالیزوری متالوپروتئیناز-۱۳ به‌خودی‌خود می‌تواند کلاژن را تخریب کند؛ اما در انجام این کار به اندازه حوزه دومین شبه‌هموپکسین کارآمد نیست ( ). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، هیچ تغییر واضحی در بیان متالوپروتئیناز-۲ و متالوپروتئیناز-۳ در غلظت‌های مختلف عطر مایه مرزه سهندی در مقایسه با نمونه‌هایی که تنها در معرض لیوپلی ساکارید قرار گرفته‌اند، دیده نشد و در نتیجه، عطر مایه مرزه سهندی هیچ تأثیری بر این ژن‌های هدف ندارد. از سوی دیگر، کاهش بیان ژن متالوپروتئیناز-۹ و متالوپروتئیناز-۱۳ همین‌طور کاهش مهاجرت و تهاجم سلولی نسبت به دگزامتازون و ایوپروفن قابل توجه بود که احتمالاً به سبب توانایی بیشتر متالوپروتئیناز-

سفت کننده مفصل می گردد (۱).

دو مسیر اصلی که توسط متالوپروتیناز-۹ فعال می شوند، عبارتند از: فاکتور نکروزدهنده کاپا بی و مسیرهای پروتئینی کیناز فعال شده با میتوزن (۲). مشخص شده است که عطرمایه مرزه سهندی می تواند بیان ژن متالوپروتیناز-۱۳ و ۹ را کاهش دهد. نتایج این مطالعه باید با توجه به محدودیت های خاصی تفسیر شود. آثار عطرمایه مرزه سهندی بر درمان استوآرتروز در یک مدل سلولی به طور قابل توجهی اثر مفید آن را در بیماران مبتلا به استوآرتروز تضمین نمی کند؛ بنابراین، مطالعات بیشتر باید از آزمایش های بالینی برای تعیین اثر عطرمایه مرزه سهندی در بیماران مبتلا به استوآرتروز استفاده کنند. از محدودیت های مطالعه حاضر این است که نتایج در پی مطالعات کشت سلولی به دست آمده است و برای تأیید نیاز به مطالعه در حیوان آزمایشگاهی مانند موش یا خرگوش دارد؛ همچنین پس از آن، باید تأیید نهایی مطالعه در بیماران مبتلا به آرتروز انجام پذیرد که نیازمند مطالعات بیشتری است.

### سپاس گذاری

بدین وسیله از ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز ری، آقای دکتر یزدان و آقای حسین حجازیان، کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز ری، به علت پیگیری های مستمرشان در تجهیز آزمایشگاه بیوتکنولوژی و فراهم کردن محیط آموزشی و تحقیقاتی به دور از استرس همراه با انرژی مثبت، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

### تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده، به طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه پرهیز کرده اند و منافع تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده اند.

## References

- Sharma L. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2021;384:51-9. doi: 10.1056/NEJMc1903768.
- Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2022;30:184-95. doi: 10.1016/j.joca.2021.04.020.
- Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 2009;15:1414-20. doi: 10.1038/nm.2050.
- Xu Q, Gai PY, Lv HL, Li GR, Liu XY. Association of MMP3 genotype with susceptibility to frozen shoulder: a case-control study in a Chinese Han population. *Genet Mol Res* 2016;15:10-4238. doi: 10.4238/gmr.15017228.
- Huang X, You Y, Xi Y, Ni B, Chu X, Zhang R, et al. p-Coumaric acid attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory responses and cellular senescence in rat chondrocytes. *Inflammation* 2020;43:619-28. doi: 10.1007/s10753-019-01142-7.
- Gao JW, Zhang KF, Lu JS, Su T. Serum matrix metalloproteinases-3 levels in patients with ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res* 2015;14:17068-78. doi: 10.4238/2015.December.16.7.
- Milaras C, Lepetos P, Dafou D, Potoupnis M, Tsiridis E. Association of matrix metalloproteinase (MMP) gene polymorphisms with knee osteoarthritis: a review of the literature. *Cureus* 2021;13. doi: 10.7759/cureus.18607.
- Keller LE, Wojno ED, Begum L, Fortier LA. Regulatory T cells provide chondroprotection through increased TIMP1, IL-10 and IL-4, but cannot mitigate the catabolic effects of IL-1 $\beta$  and IL-6 in a tri-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil Open* 2021;3:100193. doi: 10.1016/j.ocrto.2021.100193.
- Ma JD, Zhou JJ, Zheng DH, Chen LF, Mo YQ, Wei XN, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 as a noninvasive biomarker of histological synovitis for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2014;2014:179284. doi: 10.1155/2014/179284.
- Yang S, Ryu JH, Oh H, Jeon J, Kwak JS, Kim JH, et al. NAMPT (visfatin), a direct target of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ , is an essential catabolic regulator of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:595-602. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204355.
- Grassel S, Muschter D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000Res* 2020;9. doi: 10.12688/f1000research.22115.1.
- Momtaz S, Abdollahi M. An Update on Pharmacology of Satureja Species; From Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetic and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. *Int J Pharmacol* 2010; 6:346-353. doi: 10.3923/ijp.2010.346.353.
- Maghsoudi H, Hallajzadeh J, Rezaeipour M. Evaluation of the effect of polyphenol of escin compared with ibuprofen and dexamethasone in synoviocyte model for osteoarthritis: an in vitro study. *Clin Rheumatol* 2018;37:2471-8. doi: 10.1007/s10067-018-4097-z.
- Jeong YH, Oh YC, Cho WK, Shin H, Lee KY, Ma JY. Anti-inflammatory effects of *Viola yedoensis* and the application of cell extraction methods for investigating bioactive constituents in macrophages. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:1-6. doi: 10.1186/s12906-016-1142-9.
- Padumadasa C, Dharmadana D, Abeysekera A, Thammitiyagodage M. In vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:1-6. doi:10.1186/s12906-016-1335-2
- Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 2009;119:1763-71. doi: 10.1172/JCI38339.
- Garbison KE, Heinz BA, Lajiness ME, Weidner JR, Sittampalam GS, Lajiness ME, et al. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2004.
- Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 2021;46:273-307. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005.
- Liao HY, Da CM, Liao B, Zhang HH. Roles of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in cancer. *Clin Biochem* 2021;92:9-18. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2021.03.003.
- Freitas-Rodriguez S, Folgueras AR, Lopez-Otin C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:2015-25. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.007.
- McCabe MC, Hill RC, Calderone K, Cui Y, Yan Y, Quan T, et al. Alterations in extracellular matrix composition during aging and photoaging of the skin. *Matrix Biol Plus* 2020;8:100041. doi: 10.1016/j.mbplus.2020.100041.

22. Mehana ES, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci* 2019;234:116786. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116786.
23. Latourte A, Kloppenburg M, Richette P. Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:673-88. doi: 10.1038/s41584-020-00518-6.
24. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 2013;527(2):440-7. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.069.
25. Blasioli DJ, Kaplan DL. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:355-63. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0377.
26. Sirikaew N, Chomdej S, Tangyuenyong S, Tangjitjaroen W, Somgird C, Thitaram C, et al. Proinflammatory cytokines and lipopolysaccharides up regulate MMP-3 and MMP-13 production in Asian elephant (*Elephas maximus*) chondrocytes: Attenuation by anti-arthritic agents. *BMC Vet Res* 2019;15:1-3. doi: 10.1186/s12917-019-2170-8.
27. Rose BJ, Kooyman DL. A tale of two joints: the role of matrix metalloproteases in cartilage biology. *Dis Markers* 2016;2016. doi: 10.1155/2016/4895050.
28. Malesud CJ. Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;148:305-25. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.003.
29. Li G, Liu D, Zhang Y, Qian Y, Zhang H, Guo S, et al. Celastrol inhibits lipopolysaccharide-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte invasion through suppression of TLR4/NF- $\kappa$ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *PloS One* 2013;8:e68905. doi: 10.1371/journal.pone.0068905.
30. Hu Q, Ecker M. Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2021;22:1742. doi: 10.3390/ijms22041742.
31. Wan Y, Li W, Liao Z, Yan M, Chen X, Tang Z. Selective MMP-13 inhibitors: promising agents for the therapy of Osteoarthritis. *Curr Med Chem* 2020;27:3753-69. doi: 10.2174/0929867326666181217153118.
32. Nakabayashi H, Shimizu K. HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways. *Cancer Sci* 2011;102:393-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01794.x.