

## ارزیابی اثر اورسولیک اسید در مقایسه با ایبوپروفن و دگزامتازون در مدل سینوویوسیت برای استئوآرتریت در شرایط *Ex Vivo*

حسین مقصودی<sup>۱\*</sup>، معصومه اله وردی میگونی<sup>۲</sup>

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور مرکز ری، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران

\* آدرس مکاتبه: تهران، شهرری، بزرگراه ورامین، سه راه تقی آباد، خیابان امین آباد، خیابان عربخواری، خیابان

مفاخر، مجتمع دانشگاه پیام نور مرکز ری، آزمایشگاه دکتر مقصودی

تلفن: ۱۵-۳۳۴۱۶۸۱۱ (۰۲۱) داخلی ۱۵۰، نمابر: ۳۳۴۱۶۸۳۱ (۰۲۱)

پست الکترونیک: hossein\_m2002@yahoo.com .hosseimm2002@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۶/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱

### چکیده

مقدمه: استئوآرتریت شایع‌ترین بیماری مفصلی در دنیا است و در گذشته به عنوان یک بیماری دژنراتیو مفصلی شناخته می‌شد که مشخصه آن تغییر شکل غضروف و ایجاد استخوان‌های جدید در لبه‌های مفصل بود. اما این بیماری تنها یک بیماری دژنراتیو نبوده بلکه ناشی از یک پدیده فعال بیومکانیکی، بیوشیمیایی و سلولی می‌باشد. درمان‌های رایج این بیماری همراه با عوارض جانبی مانند بروز زخم‌های پپتیک، خونریزی دستگاه گوارش، مسمومیت‌های کبدی و عوارض کلیوی می‌باشد. لذا بر آن شدید اثرات احتمالی ضد التهابی اسید اورسولیک، ماده مؤثره اصلی عصاره کلروفومی گیاه مریم‌گلی *Salvia officinalis L.* را بر میزان بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی که در استئوآرتریت مهم هستند، بررسی نماییم.

هدف: هدف اصلی از این تحقیق کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در مدلی شبیه استئوآرتریت در شرایط *ex-vivo* می‌باشد. روش بررسی: از سلول‌های THP-1 و سلول‌های سینوویوسیت به عنوان مدلی شبیه به بیماری استئوآرتریت استفاده کردیم. پس از تیمار سلول‌ها توسط LPS (افزایش بیان سایتوکاین پیش التهابی)، و سپس تیمار توسط اسید اورسولیک انجام شد. از DMSO (دی متیل سولفو اکساید) به عنوان حلال و شاهد منفی و از دگزامتازون و NSAID به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نتایج: اسید اورسولیک با غلظت ۱  $\mu\text{g/ml}$  باعث کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{iL-1}\beta$ ,  $\text{iL-18}$ ,  $\text{iNOS}$  و  $\text{COX-2}$  در مدلی شبیه به استئوآرتریت می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که اسید اورسولیک از طریق کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در مدلی شبیه به استئوآرتریت می‌تواند باعث روند بهبودی بیماری شود و برای این منظور بررسی آن در شرایط *in-vivo* توصیه می‌شود.

کل واژگان: استئوآرتریت، اسید اورسولیک، سایتوکاین‌های پیش التهابی، سینوویوسیت، THP-1



## مقدمه

کاربرد صحیح) در مقایسه با داروهای شیمیایی بسیار ناچیز و در بسیاری از موارد قابل چشم‌پوشی است و هزینه آن نیز کم است [۱۳]. لذا تصمیم گرفتیم تا تاثیر ضد التهابی اسید اورسولیک ماده موثره اصلی عصاره کلروفرمی گیاه مریم‌گلی را مورد بررسی قرار دهیم.

گیاه مریم‌گلی یا ساج از خانواده نعناع، بومی چندساله، کم درختچه، متعلق به مدیترانه است و خانواده آن شامل بیش از ۹۰۰ گونه است [۱۴]. مریم‌گلی با نام علمی (*Salvia officinalis* L.) متعلق به خانواده Labiatea. گیاهی چندساله، پرشاخه به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر با ظاهری پرپشت است. گل‌ها در فاصله ماه‌های خرداد و تیر ظاهر می‌شوند و به صورت گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در طول قسمت‌های انتهایی ساقه پدید می‌آیند برگ این گیاه دارای اسانس تانن و یک ماده تلخ است. اسانس آن از نوع وحشی تهیه می‌شود. مابعی زرد رنگ یا زرد متمایل به سبز و دارای بوی مخصوص می‌باشد. وزن مخصوص آن در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گرا ۰/۹۲۵ و ۰/۹۹ می‌باشد. این اسانس که در ۱ تا ۲ قسمت الکل ۸۰ درجه حل می‌شود، دارای معادل ۵۰ درصد از نوعی ستون به نام تیون است که به اسامی سال ویول، سال وون، سال ویون نیز نامیده می‌شود که مشابه تاناستون تشخیص داده شد. به علاوه این اسانس دارای پینن، سننول، بورنئول راست و چپ می‌باشد [۱۵]. مریم‌گلی یکی از چند گیاه اصلی دارویی است که آسیا و سراسر جهان برای درمان التهاب به کار برده می‌شود [۱۶]. این گیاه در درمان بیماری نقرس، روماتیسم مزمن، آلزایمر، سرگیجه‌های عصبی، سردردهایی با منشأ عصبی یا ناشی از سوء هاضمه، سرماخوردگی و دردهای ناحیه شکمی اثرات نافع دارد [۱۷]. تحقیقاتی که در برزیل انجام شد، نشان می‌دهد که استعمال موضعی عصاره مریم‌گلی میزان التهاب را کاهش می‌دهد [۱۸]. این گیاه بیشتر در حوزه مدیترانه، در جنوب شرق آفریقا و در قسمت مرکزی و جنوب آمریکا، رشد می‌کند [۱۹]. از ۹۰۰ گونه این گیاه ۱۷ گونه آن مختص ایران بوده و رویشگاه اصلی آن ایران است [۲۰]. فرمول شیمیایی اسید اورسولیک (*3β-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid*) (UA) می‌باشد که از تری‌ترپنوئیدهای شش عضوی حلقه‌ای با اتصالات

التهاب مکانیسم دفاعی بدن در مقابل عوامل زیان‌آور مانند آلرژن‌ها، سلول‌های آسیب‌دیده و پاتوژن‌ها می‌باشد که پاسخ غیرمستقیم ایمنی بدن در قبال بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشد [۲، ۱]. فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و عوامل بیولوژیکی از طریق تعدادی از واسطه‌ها باعث ایجاد التهاب می‌شوند [۳]. تغییرات دژنراتیو در مفاصل ملتهب از طریق تولید بیش از حد سایتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۱ بتا (*IL-1β*) و تومر نکروزیس آلفا (*TNF-α*)، ایجاد می‌شوند. افزایش این سایتوکین‌ها باعث متوقف شدن تولید پروتوگلیکان‌ها و کلاژن نوع ۲ می‌شوند که در نهایت از طریق آنزیم‌های تخریب‌کننده غضروف مانند متالوپروتیناز، باعث تخریب ماتریکس غضروفی می‌شوند [۴]. این سایتوکین‌ها همچنین باعث افزایش بیان سیکلوکسیژناز ۲ (*COX2*) و نیتریک اکساید سنتتاز (*NO*) که آنزیم قوی پیش التهابی هستند و نقش مهمی در افزایش پروستاگلاندین‌ها و نیتریک اکساید سنتتاز دارند، می‌شوند [۵، ۶]. از آنجایی که تخریب غضروف‌ها رابطه مستقیم با سطوح سایتوکین‌های پیش التهابی (*IL-1β*), *iNOS*, (*TNF-α*) (*COX2*) دارد، استفاده از ترکیباتی که باعث مهار این واسطه‌های پیش التهابی می‌شود، استراتژی درمانی مناسب برای کنترل علائم استئوآرتریز می‌باشد [۷]. اگر این عوامل کنترل نشوند منجر به بیماری‌های مزمن از قبیل استئوآرتریز، دیابت ملیتوس نوع ۲، آسم و بیماری‌های قلبی عروقی می‌شوند [۸]. داروهایی که اثر ضد التهابی دارند و مصرف آن امروزه رایج است، دارای عوارض جانبی مانند آکنه متوسط، سندرم کوشینگ، و بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشند [۹، ۱۰]. از سوی دیگر داروهای طبیعی ایمن‌تر هستند و پتانسیل درمانی بالایی دارند. چندین گیاه با فرمول‌بندی ترپنوئیدی مانند اسید اورسولیک (UA) و اسیداولنولیک (OA)، مورد بررسی قرار گرفتند و به عنوان عوامل ضد التهابی در نظر گرفته شدند [۱۱]. این متابولیت‌ها خطر کلی بیماری‌های التهابی را از طریق کاهش سایتوکین‌ها مختلف، کم می‌کنند [۱۲]. از آنجایی که پرورش گیاهان دارویی در ایران از موقعیت خوبی برخوردار است و عوارض جانبی و سمی گیاهان دارویی (در صورت



ها تا چهار مرتبه انجام شد (در اصطلاح به چهار نسل اطلاق می‌شود [۲۵]).

سلول‌های THP-1 از انستیتو پاستور تهیه شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در انکوباتور با شرایط  $5\% \text{ CO}_2$ ، دما  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت  $95\%$  درصد نگهداری شد. بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیشتر از  $8 \times 10^4$  درصد اقدام به شمارش سلول‌ها توسط محلول تریپان بلو  $0.4\%$  درصد نموده و درصد زنده‌مانی سلول‌ها تعیین و سلول‌هایی با  $95\%$  درصد زنده‌مانی برای کشت بعدی انتخاب شد [۲۶].

### تأییدیه سلول‌های THP-1 (BFLS) and Bovine Fibroblast-like synoviocyte

در رابطه با تأییدیه سلول‌های فیبروبلاست، برای اینکه اندازه‌گیری بیان سایتوکین‌های پیش التهابی و التهابی فقط در سلول‌های فیبروبلاست شبه ساینوویوسیت صورت گیرد و به دلیل اینکه مایع مفصلی علاوه بر سلول‌های ساینوویال دارای سلول‌های متفاوتی مانند: مونوکلنار می‌باشد، که این گروه از سلول‌ها فاقد خاصیت تکثیر و تزیاد می‌باشند و به دلیل اختلالی که در اندازه‌گیری سایتوکین‌های موردنظر ایجاد می‌کنند، کشت اولیه سلول‌ها، چهار الی پنج کشت یا پاساژ متوالی داده خواهد شد تا سلول‌های مونوکلنارها به تدریج از محیط کشت همراه با دبری خارج شوند (از مشخصات اصلی سلول‌های مزانشیمال چسبندگی به پلیت می‌باشد ولی سایر سلول‌ها این حالت را ندارند). بعد از پنجمین کشت و لیز سلولی برای تأیید BFLS از آنتی‌بادی ویمنتین (Vimetin) که مارکر اختصاصی سلول‌های مزانشیمال است [۲۷]، استفاده می‌شود، حضور یک بند به وزن مولکولی  $55 \text{ KDa}$  نمایانگر واکنش اختصاصی Vimetin با سلول‌های BFLS و عدم واکنش با سلول‌های ماکروفازاست (شکل شماره ۱). به منظور حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌های THP-1 (شبه مونسیت/ماکروفاز)، از تست بیان CD-14 [۲۸] (گیرنده

ترانس و سیس می‌باشند [۲۱]. UA در اسید استیک بسیار سرد و NAOH الکلی قابلیت حل شدن دارد [۲۲]. این اسید از اسکوالن یا ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن که از ایزوپنتیل بیروفسفات (IPP) در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، تولید می‌شوند. بتا آمیران سبتناز (BAS) و آلفا آمیران ستناز (AAS)، اکسیدو اسکوالن سیکلازی هستند (آنزیم‌های درون سلولی) که اکسیدو اسکوالن را به بتا آمیران و آلفا آمیران تبدیل می‌کنند در ادامه تنها گروه متیل در کربن ۲۸ (C-28) از بتا آمیران و آلفا آمیران به اسید کربوکسیلیک اکسیده می‌شود و در نهایت اسید اورسولیک تولید می‌شود [۲۳، ۲۴].

### مواد و روش‌ها

#### کشت سلولی کندروسیت‌ها و THP-1

برای جداسازی سلول‌های ساینوویوسیت از مایه مفصلی، مفصل Metacarpal joint گوساله هشت ماهه سالم استفاده شد. بعد از گذشتار گوساله و جدا نمودن مفصل موردنظر و قرار دادن در گیسسه استریل و داخل یخ به آزمایشگاه ارسال شد. در آزمایشگاه بعد از شستشو و برداشتن کامل پوشش خارجی قلم دست گوساله، و ضد عفونی مفصل موردنظر با اتانل  $70\%$  و بتادین، توسط سوزن نم‌ره ۱۶ مایه مفصلی کشیده شده و بلافاصله به محیط کشت DMEM-F12 (GIBCO Life technologies, UK) غنی شده با سرم جنین گاوی  $10\%$  (GIBCO Life technologies, UK)، اسید اسکوربیک  $50 \text{ mg/ml}$  (Sigma-Aldrich, UK) و ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها شامل: پنیسیلین  $100 \text{ Unit/ml}$ ، استرپتومایسین  $100 \mu\text{g/ml}$  (Bioidea, Iran)، جنتامایسین  $50 \mu\text{g/ml}$  (داروپخش، ایران) و آمفوتریسین.ب.  $50 \text{ mg/ml}$  در داخل فلاسک‌های  $25 \text{ cm}^2$  در انکوباتور با شرایط  $5\% \text{ CO}_2$ ، دما  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت  $95\%$  درصد نگهداری شد.

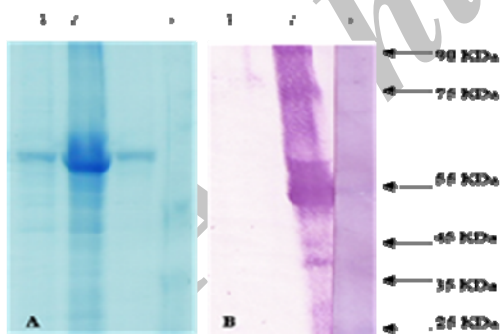
بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیشتر از  $8 \times 10^4$  درصد اقدام به شمارش سلول‌ها توسط محلول تریپان بلو  $0.4\%$  درصد نموده و درصد زنده‌مانی سلول‌ها تعیین و سلول‌هایی با  $95\%$  درصد زنده‌مانی برای کشت بعدی انتخاب شد و کشت دوباره سلول



شماره ۱ و ۲). در طول موج ۵۷۰ nm با افزایش غلظت اسید اوسولیک میزان از بین رفتن سلولها افزایش و در نهایت اسید اوسولیک در غلظت ۱ µg/ml باعث از بین رفتن ۵۰ درصد جمعیت سلولی می‌شوند که همان LC50 می‌باشد و چون باید کمترین مرگ سلولی را حین آزمایش داشته باشیم از این غلظت در تحقیق خود استفاده کردیم.

#### تقسیم‌بندی گروه‌های سلولی (در هر دو نوع سلول) جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی سایتوکین‌ها، در ابتدا از طریق تیمار سلولها با LPS، استئوآرتریت را در آنها القا می‌کنیم. سپس این سلولهای مبتلا به استئوآرتریت را به گروه‌های جداگانه تقسیم می‌کنیم: ۱- گروه اول همان شاهد منفی است که شامل سلول + DMSO می‌باشد که در اینجا به عنوان حلال و دارونما استفاده می‌شود ۲- گروه دوم همان شاهد مثبت است که شامل سلول + داروهای استروئیدی (دگزامتازون) و غیراستروئیدی (ایبuprofen) می‌باشد ۳- گروه سوم شامل سلول + ماده مؤثره اسید اوسولیک می‌باشد. میزان بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی را بین گروه‌ها مقایسه می‌کنیم.

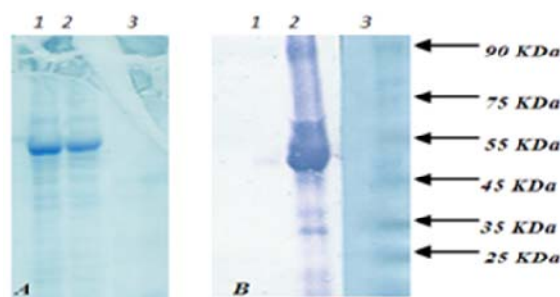


شکل شماره ۲ - تعیین عدم آلودگی سلول‌های سینوویوسیت در نسل چهارم توسط ماکروفاژ، چاهک شماره ۱ در هر دو شکل مربوط به سلول‌های سینوویوسیت نسل چهارم، چاهک شماره ۲، در هر دو شکل مربوط به سلول‌های سینوویوسیت نسل اول.

مذکور در سطح سلولی مونوسیت / ماکروفاژ وجود دارد) از طریق آنتی CD-14 با روش Western blot استفاده شد. حضور یک بند به وزن مولکولی ۵۵ KDa نمایانگر واکنش اختصاصی ۱۴ Anti CD با سلول‌های ماکروفاژ و عدم واکنش با سلول‌های BFLS می‌باشد (شکل شماره ۲).

#### تعیین سایتوتوکسیسیته توسط MTT assay و تریپان بلو

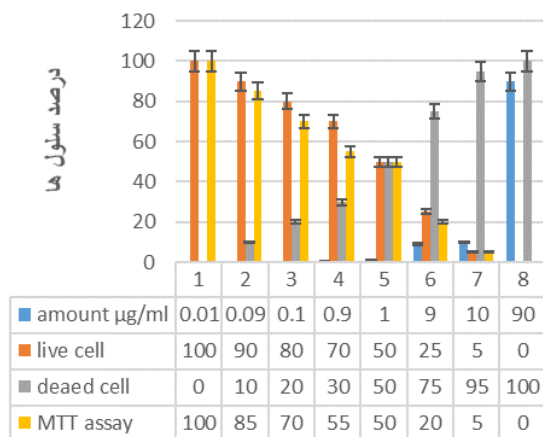
بعد از کشت سلولها و شمارش نهایی آنها توسط تریپان بلو، جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیته اسید اوسولیک و تعیین LC50 از روش MTT assay استفاده شد [۲۹]. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است که این محلول در محیط کشت فاقد فنل رد یا بافر PBS حل می‌شود و ترکیب زرد رنگ ایجاد می‌کند. اساس این تست، شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژنار (SDH) میتوکندریایی زنده است. نتیجه این کار ایجاد بلورهای نامحلول فرومازان ارغوانی رنگ است که توسط DMSO به حالت محلول در می‌آید. هر چه سلولها فعال‌تر و تعداد بیشتر، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ اندازه‌گیری می‌شود (نمودار



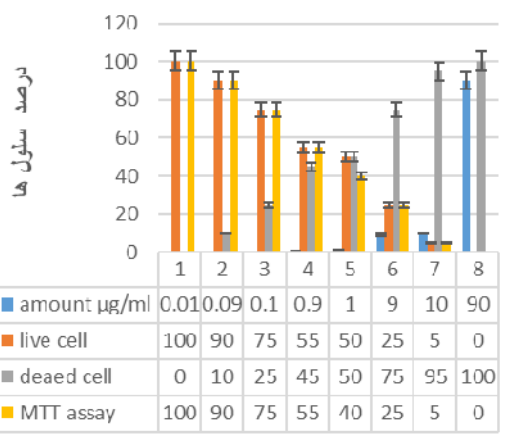
شکل شماره ۱ - SDS-PAGE و Western blot. شکل A و B، چاهک ۱ در هر دو تصویر مربوط به لیز سلولی بدون آنتی‌بادی، چاهک ۲ در هر دو تصویر مربوط به لیز سلولی به علاوه آنتی‌بادی wimentin.



بررسی میزان سمیت اسکوربیک اسید در سلول های THP-1 توسط روش MTT assay و تریپان بلو



بررسی میزان سمیت اسکوربیک اسید در سلول های سینوویوسیت توسط روش تریپان بلو و MTT Assay



نمودار شماره ۱ و ۲ - نتایج MTT Assay در Bovine Fibroblast-like synoviocyte و سلول های THP-1

### جداسازی RNA

با استفاده از Trypsin EDTA، تریپسین پیوند پپتیدی تشکیل شده توسط گروه کربوکسیل اسید آمینه لیزین یا آرژینین با سایر اسیدهای آمینه را می شکند پس باعث آزاد شدن اتصال سلولها از کف پلیت می شود و طبق پروتکل RNA را استخراج می کنیم.

### تعیین غلظت RNA با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری ژل آگارز ۱ درصد

اسپکتروفوتومتر یا طیف سنج، دستگاهی است که شدت نور را به صورت تابعی از طول موج اندازه گیری می کند. در حقیقت این دستگاه با استفاده از میزان جذب نور، غلظت مربوطه را تعیین می کند. برای بررسی خلوص RNA های استخراج شده می توان از نسبت جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ( $A_{260}/A_{280}$ ) استفاده کرد. این نسبت باید در بهترین حالت بین ۱/۸ الی ۲ باشد و نسبت های کمتر نشان دهنده ی آلودگی RNA با DNA و پروتئین می باشد. میزان ۵ لاندا از RNA جدا شده از هر یک از نمونه ها به همراه ۱ لاندا DNA Loading Dye ۶x پس از آنکه مخلوط کردیم به آگاروز ژل ۱ درصد تزریق می کنیم. جریان الکتریسیته در دستگاه الکتروفورز برای مهاجرت نمونه ها برقرار شد و معمولاً

### تحریک و تیمار سلولها توسط LPS

به منظور فراهم کردن شرایطی شبیه به بیماری و افزایش بیان سایتوکین های پیش التهابی از LPS [۳۰]، به میزان ۲۰ میلی لیتر/نانوگرم استفاده شد. ابتدا  $6 \times 10^6$  سلول را در محیط کشت، کشت دادیم. پس از ۷۲ ساعت میزان ۱۰۰ نانوگرم LPS به محیط اضافه شد. پلیت ها را به مدت ۲۴ به منظور بیان سایتوکین های پیش التهابی مانند  $COX-2$ ،  $COX-1$ ،  $iNOS$ ،  $iL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  در انکوباتور دی اکسیدکربن نگهداری شد.

### تیمار سلولها توسط گلوکوکورتیکوئیدها

در این مطالعه از دگزامتازون به عنوان کنترل مثبت که توانایی کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی را دارد با دوز 1-100 nanoM استفاده شد [۳۱].

### تیمار سلولها با Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

در این بررسی برای مقایسه اثر ضد التهابی Ursolic acid با داروهای NSAIDs از ایبوپروفن به منظور کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی با دوز 50-100 nanoM در سلول های تحریک شده توسط LPS استفاده شد [۳۲].



مرحله بعدی *cDNA* به عنوان الگوی توسط روش *RT-PCR* استاندارد تکثیر می‌یابد [۳۳].

### **RT-PCR**

*RT-PCR* استاندارد یک روش فوق‌العاده حساس، سریع و متنوع برای بررسی بیان ژن موردنظر می‌باشد که توانایی تشخیص کپی‌های بسیار کم از مولکول‌های *RNA* را فراهم می‌کند. از طرفی این روش قادر است اطلاعات نیمه کمی درباره میزان بیان ژن در یک سلول یا بافت را ارائه نماید. در حالت استاندارد *RT-PCR* تنها قادر به تعیین وجود یا عدم وجود نسخه‌های *mRNA* می‌باشد ولی اطلاعات کمی میزان بیان ژن را ارائه نمی‌دهد. با ایجاد تغییراتی در روش استاندارد، می‌توان *RT-PCR* را برای تعیین کمیت *mRNA* در یک نمونه و یا تخمین میزان بیان نسبی *mRNA* بین انواع سلول‌ها به کار برد. جدول شماره ۱ مراحل *Real Time PCR* را نشان داده است [۳۳].

### **Semiquantative PCR**

به منظور ارزیابی اثر مهارتی اسید اورسولیک بر بیان ژنی سایتوکین‌های پیش التهابی، میزان بیان ژنی این سایتوکین‌ها از طریق *mRNA* اختصاصی تولید شده توسط ژن‌های موردنظر اندازه‌گیری شد. جهت این ارزیابی، ابتدا از طریق *Real-Time PCR* و پرایمرهای اختصاصی و *Total cDNA* حاصل از *RT-PCR* که قبلاً توضیح داده شد، میزان *mRNA* اختصاصی هر یک از ژن‌های موردنظر ارزیابی شدند و با پرایمرهای آماده اختصاصی هر کدام از سایتوکین‌های مورد مطالعه که سکانس‌های آنها از قبل مشخص بود (جدول شماره ۲)، مقایسه شدند. ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. شرایط استاندارد *PCR* انجام شد و فرآورده *PCR* در آگاروز ژل ۱/۵ درصد همراه با اتیدیم بروماید ۵  $\mu\text{g/ml}$  چک شد و نتایج نهایی از طریق روش‌های آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

به ازای ۱ سانتی‌متر از طول مخزن ۵ تا ۱۰ ولت جریان در نظر گرفته می‌شود در این مطالعه از مختصات زیر استفاده شد: ولتاژ ۹۰ و جریان ۵۰ یا ۴۵ میلی‌آمپر به مدت ۴۵ دقیقه. تخمین غلظت نهایی *RNA* بر اساس درخشندگی بند مشاهده شده که این تکنیک به تجربه نیاز دارد بر اساس درخشندگی بند و مقایسه آن با درخشندگی بند مشابه در مرکز مولکولی تزریق شده به آگارز، با توجه به این نکته که مارکر مولکولی از تعداد زیادی بند تشکیل شده است و هرکدام از بندها دارای غلظت خاصی برحسب میزان تزریق شده دارند، پس با مقایسه بند اصلی و بند مشابه در مولکول از مارکر می‌توان تخمین زده شود که میزان غلظت *RNA* تخلیص شده چه میزان است. در مقایسه بین دو روش تفاوت معناداری وجود نداشت و غلظت در دو روش برابر با ۱ ماکروگرم در یک ماکرولیتر بود [۳۷].

### **تیمار با آنزیم *DNase I***

به منظور جلوگیری از آلودگی *RNA* توسط *DNA* در مراحل تخلیص و جلوگیری از ممانعت تأثیر *DNA* در تأثیر مواد شیمیایی در مراحل بعد این تیمار انجام می‌شود. برای تیمار کردن نمونه‌های *RNA* از کیت فرمنتاز شامل *DNase I*، بافر *EDTA*، *DNase I* و بازدارنده‌ی *RNase inhibitor* استفاده شد.

### **تولید رشته مکمل *DNA* یا *Complementary DNA (cDNA)***

از *RNA* استخراج شده از سلول‌های ساینوویوسیت بررسی بیان ژن‌ها نیازمند به تعیین دقیق میزان *mRNA* می‌باشد. از طرفی اساس *PCR* تکثیر *DNA* به عنوان الگوی اسید نوکلئیکی است نه بر اساس *RNA*، بنابراین لازم است در مرحله نخست *RNA* با استفاده از روش نسخه‌برداری معکوس به *DNA* تبدیل شود که تحت عنوان *cDNA or Complementary DNA* می‌است که از روی یک رشته مولکول *mRNA* به عنوان الگو توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس و آنزیم *DNA polymerase* ساخته شده است و در



جدول شماره ۱- شرایط زمانی و حرارت و تعداد سیکل مورد نیاز سایتوکین ها در Real-Time PCR

سیکل	دما		زمان
	مراحل RT_PCR		
۱	۹۵ درجه سانتیگراد	وا سرشته سازی اولیه	۹۰ دقیقه
۴۰	۹۵ درجه سانتیگراد	واسرشتگی	۱۵ ثانیه
۴۰	۶۰ درجه سانتیگراد	اتصال پرایمر	۳۰ ثانیه
۴۰	۷۲ درجه سانتیگراد	بسط پرایمر	۳۰ ثانیه
۱	۷۲ درجه سانتیگراد	بسط	۱۰ دقیقه

جدول شماره ۲- توالی نوکلئوتیدی، نقطه ذوب پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصول PCR بیان شده است.

ردیف	نام پرایمر	دما		Reverse 5' to 3'	Forward 5' to 3'	PCR Product size
		Reverse	Forward			
1	B.COX-2	52 °C	52.9 °C	5'-TG AGT ATC TTT GAC TGT GGG A-3'	3'-CTC TTC CTC CTG TGC CTG AT-5'	200 bp
2	TNF - $\alpha$	59.4 °C	61 °C	5' -GCA AGG GCT CTT GAT GGC AGA-3'	3' -TAA CAA GCC GGT AGC CCA CG-5'	200 bp
3	B.IL-1 $\beta$	57.2 °C	56.5 °C	5'-ATC TGC AGC TGG ATG TTT CCA T-3'	3'-TTC TCT CCA GCC AAC CTT CTA T-5'	200 bp
4	B.iNOS	70.4 °C	71.5 °C	5'-GGT GCT GCT TGT TAG CAG GTC AAG TAA AGG GC- 3'	3'-CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG-5'	200 bp
5	B.GAPDH	56.7 °C	56.3 °C	5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT - 3'	3'-ATT CCA CCC ACG GCA AGT T-5'	200 bp
6	B.CD14	59.4 °C	55.8 °C	5' -AGC TGA GCA GGA ACC TGT GC-- 3'	3' - -CTG GAA GCC GGC G- -5'	200 bp

## نتایج

آنالیز ابتدا توسط روش Pffafi یا  $\Delta\Delta C$  و سپس از نرم افزار REST version 2009 برای آنالیز کمی استفاده شد. آنالیز نتایج Real time-PCR به روش Pffafi یا  $\Delta\Delta C$  انجام می شود.

## آنالیز آماری

تمامی داده ها به عنوان میانگین  $\pm 1$  SD بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از آنالیز یک سویه واریانس (ANOVA)، نرم افزار REST version 2009 و نرم افزار SPS2000 اجرا شده است. برای آنالیز CT،  $P < 0.05$  به شکل آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.



### ج- اثر اسید اورسولیک بر روی *Bovine iNOS*

اسید اورسولیک باعث کاهش بیان *iNOS* در سلول‌های BFLS تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۵/۵ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، با معنی است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۳).

### د- اثر اسید اورسولیک بر روی *Bovine iL-1β*

اسید اورسولیک باعث کاهش بیان *iL-1β* در سلول‌های BFLS تحریک شده توسط LPS به میزان ۴۷/۹ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن موردنظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۳).

### ه- اثر اسید اورسولیک بر روی *TNF-α* در THP-1

اسید اورسولیک باعث کاهش بیان *TNF-α* در THP-1 در سلول‌های تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۴/۸۵ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن موردنظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۴).

### و- اثر اسید اورسولیک بر روی *IL-1β* در THP-1

اسید اورسولیک باعث کاهش بیان *IL-1β* در سلول‌های تحریک شده توسط LPS به میزان ۴۷/۹ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۴).

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{Expression Ratio}^{ct}$$

$$CT = \Delta\Delta C_t \text{ Calibrator} \Delta - C \text{ main cytokine} \Delta$$

$$CT = (\Delta\Delta C_t \text{ main cytokine} - CT \text{ GADPH}) - (CT \text{ sample positive} - CT \text{ GADPH})$$

ابتدا CT هر نمونه برای ژن رفرنس و اصلی با تعیین خط پایه محاسبه شد. سپس اختلاف CT ژن هدف و ژن GADPH و همچنین اختلاف CT نمونه کنترل مثبت و ژن GADPH محاسبه شد. که به آن  $\Delta C_t$  گفته می‌شود. سپس  $\Delta\Delta C_t$  محاسبه شد. یعنی  $\Delta C_t$  هر نمونه از  $CT \Delta$  تیمار شاهد تفریق شد. در این فرمول بازده ۱۰۰ درصد فرض شد و در انتها برای مقایسه نتایج از آزمون t-student استفاده شد. نتیجه آنالیز آزمون‌های انجام شده مؤید درستی نتایج تحقیق ما هستند.

### الف- اثر اسید اورسولیک بر روی *Bovine COX-2*

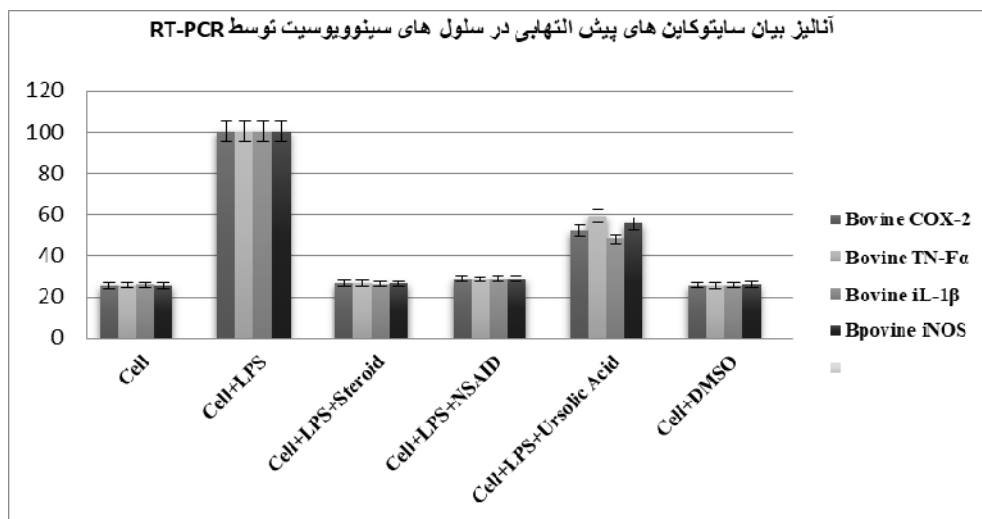
اسید اورسولیک باعث کاهش بیان ژنی آنزیم *COX-2* در سلول‌های تحریک شده توسط LPS به میزان به ترتیب ۵۲/۴۶ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۳).

### ب- اثر اسید اورسولیک بر روی *Bovine TNF-α*

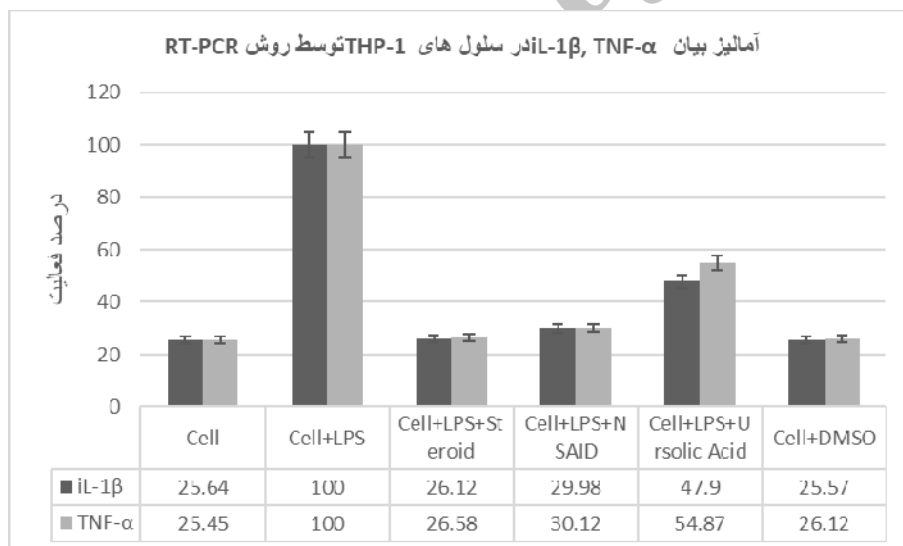
اسید اورسولیک باعث کاهش بیان *TNF-α* در سلول‌های BFLS تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۹/۲۷ درصد شده است. این نتیجه در مقایسه با نتایج گروه تیمار شده با استروئید و غیراستروئید که برای کاهش بیان ژن موردنظر استفاده شده بودند، معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه شاهد منفی هیچ تغییری در میزان بیان ژن موردنظر ایجاد نشد (نمودار شماره ۳).







نمودار شماره ۳- تأثیر عصاره اسید اورسولیک بر بیان سیتوکین های التهابی B. TNF-a, B. COX-2, B. iNOS, B. IL-1B, B. IL-18 در سلول های BFLS با استفاده از Real-Time PCR تیمار سلول های BFLS به مدت ۷۲ ساعت و سپس اضافه کردن LPS به میزان 20 ng و نگهداری در انکوباتور به مدت ۱ ساعت سپس لیز سلول ها و جدا کردن mRNA و تولید cDNA و انجام RT-PCR و در انتها انجام Real-Time PCR به منظور اندازه گیری بیان سیتوکین های پیش التهابی B. COX-2, B. iNOS, B. IL-1B, B. IL-18, B. TNF-a در شش گروه مورد نظر. بیان ژن در گروه ها نسبت به گروه Cell+LPS سنجیده می شود. اختلاف آماری قابل توجه بین گروه Cell+LPS و سایر گروه ها بوسیله t- student و ANOVA اندازه گیری شد (n=۳).



نمودار شماره ۴- تأثیر عصاره اسید اورسولیک بر بیان سیتوکین های التهابی، IL-1B و TNF-a در سلول های THP-1 با استفاده از Real-Time PCR تیمار سلول های THP-1 به مدت ۷۲ ساعت و سپس اضافه کردن LPS به میزان 20 ng و نگهداری در انکوباتور به مدت ۱ ساعت سپس لیز سلول ها و جدا کردن mRNA و تولید cDNA و انجام RT-PCR و در انتها انجام Real-Time PCR به منظور اندازه گیری بیان سیتوکین های پیش التهابی، IL-1B, B. TNF-a در گروه های مورد نظر، بیان ژن در گروه ها نسبت به گروه Cell+LPS سنجیده می شود. اختلاف آماری قابل توجه بین گروه Cell+LPS و سایر گروه ها بوسیله t- student و ANOVA اندازه گیری شد (n=۳).



## بحث

استئوآرتریت یک بیماری ناتوان‌کننده و پیشرونده است و عواملی مانند سن، ژنتیک، تروما، چاقی، باعث افزایش استرس بیومکانیک بر مفاصلی که درگیر هستند، می‌شود. افزایش ضخامت استخوان در مفصل ممکن است منجر به برهم ریختن تعادل کاتابولیک در سطح مولکولی شود. استئوآرتریت دژنراسیون پیشرونده غضروف در فضای مفصلی است که منجر به محدود شدن فضای مفصلی، درد، محدود شدن حرکت، بی‌ثباتی و ناتوانی و در نتیجه باعث ایجاد مشکلاتی در مفاصل انگشتان دست، انگشتان پا، گردن، پشت، لگن و ران می‌شود [۳۴، ۳۵]. استئوآرتریت عمدتاً در افراد مسن دیده می‌شود و منجر به ناتوانی جسمی و افزایش هزینه‌های درمانی می‌شود [۳۶]. این بیماری از طریق التهاب غشاء سینوویال و تخریب مفصل غضروفی و استخوان شناسایی می‌شود [۳۷]. از بین رفتن کامل غضروف‌ها باعث تحریک استخوان‌سازی به صورت برآمدگی‌های استخوانی به نام استئوفیت و اسکروز (ضخیم‌تر شدن) در لبه‌های استخوانی ساب‌کندرال می‌شود و منجر به تشکیل کیست‌هایی در این ناحیه می‌شود [۳۷].

در این تحقیق ما به بررسی اثر ضدالتهابی اسید اورسولیک در سلول‌های مبتلا به استئوآرتریت پرداختیم. اسید اورسولیک باعث کاهش بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود و چون این سایتوکین‌ها نقش مؤثری در ایجاد و تشدید التهاب دارند بنابراین اسید اورسولیک با کاهش بیان این سایتوکین‌ها منجر به کاهش التهاب می‌شود. تحقیقات وسیعی توسط محققان داخلی و خارجی در این زمینه انجام شد که به بیان تعدادی از آنها می‌پردازیم. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد اسید اورسولیک در پاسخ به عوامل التهابی، فاکتورهای تنظیم‌کننده نسخه‌برداری *NF-kB* را مهار می‌کند و باعث کاهش التهاب می‌شود [۳۸]. Shishodia و همکارانش مهار *TNF-α* القایی از *NF-kB* را توسط اورسولیک اسید در تومورهای مختلف نشان دادند [۳۹]. در مطالعه‌ای *Maia* و *Freitas* نشان دادند اسید اورسولیک باعث کاهش التهاب در تست فرمالین و کاهش درد ناشی از سینامالدئید می‌شود [۴۰]. Liu و همکارانش اثر مهار اسید اورسولیک را بر بیان ژنی *NF-kB*

در موشی که نسبت به پیوند مقاومت نشان می‌داد را نشان دادند که در نهایت باعث کاهش این علائم شد [۴۱]. در مطالعه دیگری *Vasconcelos* نشان داد که مصرف خوراکی اسید اورسولیک و اسید اولیونولیک در دوز خاص بر اسید استیک که باعث القا درد شکمی در موش می‌شود، اثر مهاری دارد که اثر مهاری اسید اورسولیک (۴۰ mg/kg) شبیه به اثر مهاری استیل سالیسیک (۱۰۰ mg/kg) می‌باشد و در نمونه‌ای که کاراجینان باعث ایجاد ورم پنجه در موش‌ها شده بود، مصرف خوراکی اسید اورسولیک و اسید اولیونولیک به میزان (۴۰ mg/kg) منجر به کاهش ورم شد [۴۲]. در یک مطالعه *Baricevic* و همکارانش به بررسی فعالیت ضد التهابی اسید اورسولیک در شرایط *In vivo* و *In vitro* مانند القا دم در موش آلبینو سوئسی، پرداختند [۴۸]. بعد از اینکه سلول‌های موش آلبینو توسط اسید اورسولیک تیمار شدند، میزان سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند این‌ترلوکین ۲ (*IL-2*)، این‌ترفرون گاما (*IFN-γ*) و تومر نکروزس آلفا (*TNF-α*)، کاهش یافت [۴۳]. در تحقیق دیگری *Nataraj* و همکارانش اثر مهاری اسید اورسولیک را بر آنزیم‌های التهابی مانند فسفولیپاز ۲ (*PLA2*) نشان دادند [۴۴]. در مطالعات دیگری *LU* و همکارانش اثر مهاری اسید اورسولیک را بر بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند *iNOS* و *Cox2* سیکلواکسیژناز ۲، ثابت کردند [۴۵]. در ایران نیز تحقیقات مشابهی در رابطه با اثر ضد دردی و ضد التهابی عصاره گیاه مریم‌گلی پرداخته شد اما اختصاصاً در رابطه با اثر مهاری اسید اورسولیک بر بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی کار نشده. نتایج تحقیق ما نشان دادند زمانی که ما از طریق *LPS 20 ng/mL* مدلی شبیه به استئوآرتریت را در سلول‌های ساینویوسیت و *THP-1* را ایجاد کردیم و با داروی ضد التهاب استروئیدی و ضد استروئیدی (شاهد مثبت) و دارونما (شاهد منفی) تیمار کردیم، اسید اورسولیک با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش بیان ژنی سایتوکین‌های پیش‌التهابی به این ترتیب می‌شود: *TNF-α* (۵۹/۲۷ درصد در ساینویوسیت و ۵۴/۸۵ درصد در *THP-1*)، *IL-1β* (۴۷/۹ درصد، *IL-18*) (۳۴/۵۹ درصد، *iNOS*) (۵۵/۵ درصد،



### نظرات و پیشنهادات

از آنجا که حوزه بررسی ما در سطح سلولی بوده است به منظور استفاده کارآمد اسید اورسولیک در زمینه التهاب، روش‌های زیر پیشنهاد می‌شود. ۱- بررسی مکانیسم کاهش بیان اینترلوکین‌ها و سایتوکین‌های پیش التهابی، که الان در دانشگاه ری در حال انجام است. ۲- استفاده از این گیاه برای درمان موش‌هایی که مبتلا به استئوآرتریت هستند. ۳- در صورت تأیید مرحله دوم با موافقت دانشکده پزشکی این آزمایش بر روی انسان مبتلا به استئوآرتریت انجام شود.

(*COX1, COX2*) به ترتیب ۵۲/۴۶ و ۳۹/۹. با کاهش این سایتوکین‌ها التهاب کاهش می‌یابد. مقایسه نتایج تحقیق ما و دیگر محققین، اثر مهار اسید اورسولیک را بر کاهش بیان ژنی سایتوکین‌های پیش التهابی ثابت می‌کند.

### نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که اسید اورسولیک از طریق کاهش بیان سایتوکارین‌های پیش التهابی در مدل شبیه به استئوآرتریت می‌تواند باعث روند بهبودی بیماری شود و برای این منظور بررسی آن در شرایط *in-vivo* توصیه می‌شود.

### منابع

- Ferrero ML, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE and Nielsen Andersen. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147 (2): 227-35.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Health Sciences; 2014.
- Allijn IE, Vaessen SFC, Quarles van Ufford LC, Beukelman KJ, de Winther MPJ, Storm G and et al. Head-to-Head comparison of antiinflammatory performance of known natural products in vitro. *PLoS ONE* 2016; 11 (5): 0155325.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43 (9): 1916e26.
- Goldring SR and Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop.* 2004; 427 (Suppl): S27e36.
- Mastbergen SC, Lafeber FP and Bijlsma JW. Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41 (7): 801e8.
- Zargari A. Medical Plants. Tehran University Publications. 1997, Vol.3, sixth edition, pp: 243-244.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454 (7203): 428-35.
- Fardet L, Flahault A, Kettaneh A, Tiev KP, Génereau T, Tolédano C and et al. Corticosteroid-induced clinical adverse events: Frequency, risk factors and patient's opinion. *Br. J. Dermatol.* 2007; 157 (1): 142-8.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: Molecular mechanisms. *Clin. Sci. (Lond)* 1998; 94 (6): 557-72.
- Raphael TJ and Kuttan G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine* 2003; 10 (6-7): 483-9.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A and Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 2001 May 1; 75 (2-3): 125-32.
- Arzi A, Sarkaki A, Aghel N, Nazari Z and Zarei Naserabadi M. The effect of *Salvia officinalis*. Hydroalcoholic extract on analgesic effect of morphine in rat. *Jundishapur Scientific Medical J.* 2011; 10: 506-12.



14. ILKIU-VIDAL L.H. and et al. Ação de potenciais hidrogeniônicos no crescimento e produtividade de sálvia (*Salvia officinalis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 2010; 12 (1): 43-7.
15. Zargari A. Medical plants. Tehran: Tehran University Press. 2009, v. 4. pp: 59-64.
16. Kim KA, Lee JS, Park HJ, Kim JW, Kim CJ, Shim IS, Kim NJ and Han SM Lim S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sci.* 2004; 74: 2769 - 2779.
17. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H and Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 2002 Jul 1; 88 (1): 544-8.
18. Melo GA, Fonseca JP, Oliveira Farinha Th, Pinho RJ, Damião MJ, Grespan R and et al. Anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. *J. Medicinal Plants Research* 2012; 6: 4934-39.
19. Kintzios S.E. Medicinal and aromatic plants industrial profiles, Sage, The Genus *Salvia*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands. vol. 27. 2000, pp: 10-15.
20. Alebrahim-Dehkordy E, Bahmani M and Rafieian-Kopaei M. Phytochemical, pharmacological, and biochemical characteristics of essential oil of some *Salvia* L. species. *J. Chemical and Pharmaceutical Sciences* 2016; 9 (4): 3395-402.
21. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 1995; 49: 57-68.
22. Fan JP, Kong T, Zhang XH, Zhang L, Tong S, Tian ZY and et al. Solubilities of oleanolic acid and ursolic acid in (ethanol + water) mixed solvents from T = (292.2 to 328.2) K. *J. Chem. Thermodynamics* 2012; 47: 372-75.
23. Kashyap D, Tuli HS and Sharma AK. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* 2016; 146: 201-13.
24. Pollier J and Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 2012; 77: 10-5.
25. Maghsoudi H., Hallajzadeh J. and Rezaeipour M. Evaluation of the effect of polyphenol of escin compared with ibuprofen and dexamethasone in synoviocyte model for osteoarthritis: an in vitro study. *Clinical Rheumatol.* 2018; 37 (9): 2471-2478.
26. Maghsoudi H and Haj-allahyari S. Down regulation of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in cynoviocyte by essential oil of *Fraxinus excelsior*. *International Journal of Contemporary Research and Review.* 2018 Mar 8; 9 (03): 20192-203.
27. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA and Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research & Therapy* 2000 Sep; 2 (6): 477.
28. Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A and Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003 Apr 1; 88 (4): 1780-4.
29. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW and Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica.* 2012 Dec 1; 114 (8): 785-96.
30. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I and Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G i  $\alpha$  dependent PI-3kinase signalling. *J. Inflammation* 2012 Dec; 9 (1): 1.
31. eong YH, Oh YC, Cho WK, Shin H, Lee KY and Ma JY. Anti-inflammatory effects of *Viola yedoensis* and the application of cell extraction methods for investigating bioactive constituents in macrophages. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016 Dec; 16 (1): 180.



32. Padumadasa C, Dharmadana D, Abeysekera A and Thammitiyagodage M. In vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016 Dec; 16 (1): 345.
33. Tefvik DM. Real-time PCR.-Taylor.chapter 2006, 1; 1-29.
34. Martel-Pelletier J and Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues. *Eklemler Hastalik Cerrahisi*. 2010 Apr; 21 (1): 2-14.
35. Buckwalter JA, Saltzman C and Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 2004 Oct 1; 427: S6-15.
36. Sharma L. Osteoarthritis C. treatment. In *Primer on the Rheumatic Diseases: Thirteenth Edition* 2008. Springer New York.
37. Klippel JH, Stone JH and White PH. *Primer on the rheumatic diseases*. Springer Science & Business Media; 2008 Jan 23. 226.
38. Maia JL, Lima-Júnior RC, Melo CM, David JP, David JM, Campos AR, Santos FA and Rao VS. Oleonic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. *Pharmacological Res*. 2006 Oct 1; 54 (4): 282-6.
39. Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S and Aggarwal BB. Ursolic acid inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res*. 2003 Aug 1; 63 (15): 4375-83.
40. Freitas CS, Baggio CH, Dos Santos AC, Mayer B, Twardowschy A, Luiz AP, Marcon R, Soldi C, Pizzolatti MG, Dos Santos EP and Marques MC. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicol*. 2009 Apr; 104 (4): 285-92.
41. Liu Y, Huang X, Li Y, Li C, Hu X, Xue C, Meng F and Zhou P. Ursolic acid promotes robust tolerance to cardiac allografts in mice. *Clinical & Experimental Immunol*. 2011 May; 164 (2): 282-8.
42. Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, e Silva ML, Carvalho JC, Bastos JK and Cunha WR. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleonic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006 Aug 1; 61 (7-8): 477-82.
43. Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A and Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol*. 2001 May 1; 75 (2-3): 125-32.
44. Nataraj A, Raghavendra Gowda CD, Rajesh R and Vishwanath BS. Group IIA secretory PLA2 inhibition by ursolic acid: a potent anti-inflammatory molecule. *Current Topics in Medicinal Chem*. 2007 Apr 1; 7 (8): 801-9.
45. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF, Ye Q and et al. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-B pathway activation. *Cereb Cortex* 2010; 20 (11): 2540.

