

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانو اوژنول در مدل حیوانی بیماری آرتریت روماتوئید

نازنین جباری^۱، زهره افتخاری^{۲*}، نسیم حیاتی رودباری^۱، کاظم پریور^۱

چکیده

طحال و چشم می شود. علائم غالب RA عبارتند از: سفتی صبحگاهی مفاصل، خستگی و ضعف زودرس، سندرم چشم خشک (کراتوکونژونکتیویت سیکا)، گره های روماتوئید، بی اشتها، کاهش وزن و تورم مفاصل. (۱).

روش های درمانی دارویی متنوعی برای آرتریت وجود دارد که شامل داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAIDs)، کورتیکواستروئیدها و داروهای ضد روماتیسمی اصلاح کننده بیماری (DMARDs) (Disease-modifying antirheumatic drugs) می شود، اگرچه آنها پیشرفت بیماری را متوقف نمی کنند و با عوارض جانبی در دستگاه گوارش مرتبط هستند. با توجه به این محدودیت ها، محققین تمایل به استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یک درمان کمکی برای جلوگیری از پیشرفت آرتریت و سایر بیماری های مزمن وجود دارد (۲). با توجه به خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اوژنول که یکی از ترکیبات طبیعی روغنی فنلی بی رنگ یا زرد رنگ است که از جوانه ی گل میخک (*Syzygium aromaticum*) به دست می آید، ارزیابی این فراورده در درمان بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود، به دلیل تبخیر، حلالیت جزئی در آب و سهولت شکستن در مواجهه با دما، هوا و نور بالا، اوژنول به تنهایی کاربردهای درمانی زیادی ندارد (۳). فن آوری کپسوله سازی برای بهبود پایداری، محافظت از مواد شیمیایی فعال در برابر تماس با سایر اجزا، تقویت فعالیت یا کیفیت

هدف: با توجه به افزایش آرتریت روماتوئید (RA) در کشورهای صنعتی، مطالعه مدل حیوانی حاضر در نوزاد رت به منظور مقایسه اثر اوژنول و نانو اوژنول بر بیان مولکولی و شرایط هیستوپاتولوژیک انجام شد. رت های نوزاد به طور تصادفی به چهار گروه (۱۰ نفر در هر گروه) تقسیم شدند. در گروه شم (G1) روزانه ۱۰۰ میکرولیتر نرمال سالین استفاده شد. در گروه مدل (G2)، CFA و کلاژن گاوی نوع II (CII) دریافت کردند. رت های گروه III (G3) اوژنول و نانوذرات کیتوزان و گروه IV (G4) اوژنول (۱۰۰ میکرولیتر در روز) دریافت کردند. پس از درمان، رت ها قربانی شدند و ماتریکس متالوپروتئاز-۹ (MMP-9)، فاکتور نکروز تومور- α (TNF- α)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10)، قطر و اندازه پنجه پا، و فاکتور روماتوئید (RF) ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل هیستوپاتولوژی غضروف نیز مورد بررسی قرار گرفت. رت های مبتلا به آرتریت، هیپرپلازی شدید مفصل، سفتی، افزایش حجم پنجه و علائم بالینی را نشان دادند. کاهش قابل توجهی در بیان پروتئین TNF- α ، RF، MMP-9 در G3 و G4 مشاهده شده است. با این حال، سطح بیان ژن IL-10 در G2 افزایش یافت. در G3، بهبود قابل توجهی در علائم آرتریت، نشانگرهای بیوشیمیایی و ناهنجاری های بافتی مفصل در مقایسه با G4 وجود داشت. اوژنول و نانو اوژنول علائم التهابی و تخریب غضروف ناشی از آرتریت روماتوئید را کاهش و بهبود بخشیدند که نشان می دهد اوژنول می تواند به عنوان یک ماده گیاهی موثر برای درمان سستی روماتیسم مفصلی استفاده شده و پتانسیل درمانی برای بیماری های خود ایمنی داشته باشد.

واژگان کلیدی: نانوذرات کیتوزان، اوژنول، اینترلوکین-۱۰، آرتریت روماتوئید، فاکتور نکروز تومور- α

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۲۱

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA) (Rheumatoid arthritis) یک بیماری خودایمن با علل مختلف است که سبب التهاب در مفاصل و اثرات جانبی بر روی سایر اعضای بدن مانند ریه،

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مجتمع تحقیقاتی و تولیدی، گروه کنترل کیفیت، انستیتو پاستور ایران، البرز- ایران. کد پستی: ۳۱۵۹۹۱۰۱۱۱ z_efekehari@pasteur.ac.ir

آزمایشگاهی استاندارد با چرخه طبیعی تاریکی - روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) نگهداری شدند (۹). تمامی پروتکل های آزمایشی توسط کمیته ملی اخلاق در پژوهش ایران (IR.IAU.SRB.REC.1398.061) تایید شده است.

تهیه عصاره گیاهی

جوانه های گیاه *Syzygium aromaticum* از مؤسسه ی گیاهان دارویی ایران تهیه شدند. سپس در هوای آزاد خشک و توسط مخلوط کن تجاری آسیاب شدند. عصاره اتانولی دوپست گرم پودر میخک توسط یک همزن مغناطیسی با ۱۵۰۰ دور به مدت ۴۸ ساعت همگن شده و سپس از طریق فیلترهای ۰/۴ میکرومتری فیلتر شده و در نهایت، عصاره توسط روتاری اوپراتور تغلیظ شد (۱۰).

تهیه نانوکپسول اوژنول کیتوزان

نانوکپسول های اوژنول- کیتوزان به روش فراصوت تهیه شدند. ۱ گرم کیتوزان (سیگما آلد ریچ، شماره CAS: 9012-76-4، وزن مولکولی کیتوزان: ۶۰-۱۸۰ کیلو دالتون، درجه استیل زدایی ۹۳٪) در ۳۰۰ میلی لیتر اسید استیک (۱٪) حل شد و pH محلول با استفاده از سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال به ۵/۷ تنظیم شد. تری پلی فسفات (TPP) (TriPolyPhosphate) به محلول ترکیبی اوژنول- کیتوزان در آب یونیزه شده با همزن مغناطیسی برای تشکیل امولسیون کلوئیدی اضافه شد. امولسیون تهیه شده فیلتر و با مخلوطی از آب و اتانول شسته شد. محصول به مدت ۴۸ ساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد خشک شد و گیاه استریل در یک خشک کن انجمادی در دمای ۱۸۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. پودر خشک شده در انجماد در ۵ درصد دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد و به صورت خوراکی توسط لوله گاواژ تجویز شد. از پتانسیل زتا و میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای بررسی اندازه ذرات نانوکپسول استفاده شد (۱۱).

عملکرد، کاهش فرار و سمیت، و بهبود استفاده از اسانس ها به عنوان دارو برای مقابله با این چالش ها استفاده شده است. کربوهیدرات ها به طور کلی ترکیبات مناسبی برای کپسوله کردن هستند. کیتوزان به عنوان یک پلیمر کاتیونی طبیعی با بار مثبت، می تواند اتصالات یونی یا کووالانسی را با عوامل اتصال عرضی ایجاد کند تا شبکه ای ایجاد کند که در آن مواد شیمیایی فعال نگهداری شوند (۴).

سیتوکین پیش التهابی فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا (Tumour Necrosis Factor α) (TNF- α) تولید شده توسط سلول های متنوعی از جمله ماکروفاژها و لنفوسیت ها نیز توسط کیتوزان مهار می شود (۵). ایتروکین ۱۰ (IL-10) (Interleukin 10)، یک تنظیم کننده فعال سازی التهابی که توسط تمام سلول های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی تولید می شود، ممکن است در کنترل مسیر التهابی در بیماری آرتریت و آسیب ساختاری همراه آن نقش داشته باشد (۶). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) (Matrix metalloproteinase 9)، به عنوان گروهی از اندوپپتیدازهای وابسته به روی، می توانند تمام اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) را کاهش داده و باعث مهاجرت ماکروفاژها به مایعات سینوویال RA شود (۷). جهت ایجاد مدل در حیوان، از آرتریت القا شده با کلاژن گاوی نوع II به همراه ادجوانت استفاده میشود (۸). هدف از این مطالعه، ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اوژنول به همراه نانوذره کیتوزان جهت درمان مدل CIA (collagen-induced arthritis) در رت می باشد.

مواد و روش کار

حیوانات

در این مطالعه از نوزادان موش های صحرايي (رت) نژاد ویستار (۲ تا ۳ گرم) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. رت ها در قفس های پلی کربنات II، در شرایط

القاء CIA

کلاژن گاوی نوع II (BCII, Sigma-Aldrich, Inc. Calbiochem®. 9007-34-5 | 234184) Bovine Collagen (Type II) در ۰/۰۱ مولار اسید استیک حل شد، سپس با حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (Sigma-CFA, Complete Freund) (MFCD00131105, Aldrich) مخلوط شده و در روزهای ۱ (روز تولد)، ۴، ۷، و ۱۰ به پنجه راست (هر روز ۵ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن) نوزاد رت تزریق شد (۱۲).

حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه (۱۰ نفر در هر گروه) تقسیم شدند: گروه ۱ (شم، نرمال سالین؛ ۱۰۰ میکرولیتر در روز). گروه ۲ (مدل) (دریافت BCII و CFA بدون هیچ درمانی) (G2). گروه ۳ (دریافت نانو ذرات اوژنول و کیتوزان؛ ۱۰۰ میکرولیتر در روز) (G3)؛ و گروه ۴ (دریافت اوژنول؛ ۱۰۰ میکرولیتر در روز) (G4). درمان از طریق گاوژ در روز ۱۴ برای اطمینان از پذیرش القای مدل آغاز شد و تا روز ۳۹ ادامه یافت، پس از آن رت ها با کمک محفظه CO_2+O_2 یوتانایز شدند.

اندازه گیری پنجه و نمره دهی آرتریت

با کولیس دیجیتال، ضخامت پنجه راست و چپ در روزهای مختلف در همه گروه‌ها اندازه‌گیری و سپس علائم التهابی مانند تورم و قرمزی مفاصل در طول مطالعه ارزیابی شد. رتبه (نمره) درد مفاصل هر پنجه با استفاده از معیارهایی که در مطالعات قبل بررسی شده است برای توصیف تفاوت‌های شدت بیماری بین گروه‌ها، نمرات بافت‌شناسی بر اساس التهاب، هیپرپلازی سینوویال، تشکیل پانوس و فرسایش غضروف/استخوان در چهار گروه طبقه‌بندی شده، بین ۰-۳ ارزیابی شد (۱۳). به طور خلاصه، اعداد ۰ تا ۳ به عنوان استاندارد برای اندازه‌گیری میزان التهاب به شرح زیر استفاده می‌شود: ۰ برای نرمال، بدون تشدید یا قرمزی، ۱ برای قرمزی و التهاب در یک انگشت، ۲ برای قرمزی و کشش

بیش از یک انگشت یا قرمزی در مچ پا و مچ دست و در نهایت عدد ۳ قرمزی و افزایش التهاب در همه مفاصل (جدول ۱).

نگاره ۱: اثر نانو ذرات اوژنول، اوژنول و کیتوزان بر ضخامت پنجه موش‌های مبتلا به آرتریت ناشی از کلاژن.

| گروه‌ها | آسیب‌ها | مفصل مچ پا | |
|--------------------|---------------------------|------------|----|
| | | راست | چپ |
| گروه شم | التهاب | ۰ | ۱ |
| | هایپرپلازی سینوویال | ۱ | ۰ |
| | تشکیل پانوس | ۰ | ۰ |
| | از دست دادن استخوان/غضروف | ۰ | ۰ |
| | امتیاز | ۱ | ۱ |
| گروه مدل (کنترل) | التهاب | ۳ | ۰ |
| | هایپرپلازی سینوویال | ۲ | ۰ |
| | تشکیل پانوس | ۳ | ۰ |
| | از دست دادن استخوان/غضروف | ۳ | ۰ |
| | امتیاز | ۱۱ | ۱ |
| گروه درمانی نانو | التهاب | ۱ | ۰ |
| | هایپرپلازی سینوویال | ۱ | ۰ |
| | تشکیل پانوس | ۲ | ۱ |
| | از دست دادن استخوان/غضروف | ۱ | ۰ |
| | امتیاز | ۵ | ۱ |
| گروه درمانی اوژنول | التهاب | ۲ | ۰ |
| | هایپرپلازی سینوویال | ۲ | ۰ |
| | تشکیل پانوس | ۱ | ۱ |
| | از دست دادن استخوان/غضروف | ۳ | ۰ |
| | امتیاز | ۸ | ۱ |

تهیه ی سرم

حیوانات با کتامین ۱۰ درصد (Co: Kepro BV). هلند ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (Co: آلفاسان ۱۸ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و خون جهت تهیه ی سرم از طریق قلب با استفاده از لوله های هیپارینه جمع آوری شد. سپس با استفاده از یک سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf 5415R) به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰

RT-PCR را نشان می دهد. ترکیبی از ۰/۵ میکرولیتر جفت پرایمر فوروارد و معکوس، یک زنجیره پلیمرز مخلوط اصلی واکنش (PCR) (Applied Biosystems)، پنج میکرولیتر سایبر گرین در Applied ABI Step One (Biosystems, Sequences Detection Systems) توسط C-DNA تکثیر شد. بتا اکتین به عنوان یک ژن استاندارد (housekeeping) مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

نگاره ۲: پرایمرهای طراحی شده جهت ارزیابی بیان ژن توسط RT-PCR

| Gene | Primer sequence | Length | Tm | Gene bank Code |
|---------------|----------------------------------|--------|-------|----------------|
| TNF- α | F: 5'-GAGATGTGGAATGGCAGAGGA-3' | 231 | 60/09 | NM_012675.3 |
| | R: 5'-GAGAAGATGATGTGAGTGTGAGG-3' | | 58/57 | |
| IL-10 | F: 5'-CTGTCATTGATTCTCCCT-3' | 201 | 54/71 | NM_012854.2 |
| | R: 5'-TCTATTTATGCTGCTGTGCC-3' | | 54/82 | |
| GAPDH | F: 5'-AAGTCAACGGCACAGTCAAGG-3' | 121 | 61/58 | NM_017008.4 |
| | R: 5'-CATACTCAGCACCAGCATCC-3' | | 61/32 | |

تجزیه و تحلیل MMP9 توسط وسترن بلات

نمونه توسط بافر رپا رادیو ایمونو رسوب گذاری Radio immunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) حاوی بازدارنده پروتئاز همگن و سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه). سپس، فاز رویی برای محتوای پروتئین کل با روش لوری جمع آوری شد. نمونه های هموزن شده (۵۰ میکروگرم) بر روی ۱۲/۵ درصد سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) با الکتروفورز شناسایی شدند و متعاقباً پروتئین ها به غشای پلی وینیلیدین فلوراید (Polyvinylidene fluoride) (PVDF) منتقل شدند. غشاها در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه با محلول مسدود کننده (۵ درصد شیر بدون چربی) انکوبه شدند. آنتی بادی های اولیه منحصر به فرد به MMP9 (آنتی بادی I SC-393859: (E-11) سانتا کروز) سپس به مدت ۱۲۰ دقیقه

دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه سرمی برداشته شده در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد (سامسونگ، کره) تا زمان سنجش سطوح سرمی RF، MMP-9، TNF- α و IL-10 نگهداری شد (۱۴).

۲،۷. ارزیابی بیومارکر سرم (فاکتور روماتوئید)

غلظت سرمی RF با استفاده از کیت تجاری ELISA (MBS702417) با روش هایی که در دستورالعمل های کیت سازنده توضیح داده شده است، برای تایید القای RA در رت های نوزاد ارزیابی شد (۱۴).

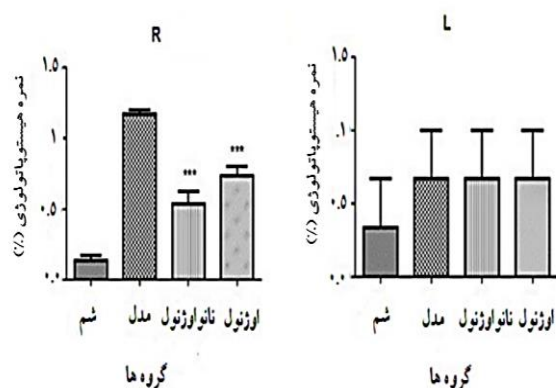
تجزیه و تحلیل بافت شناسی مفصل

بلافاصله پس از خونگیری، رت ها توسط محفظه CO₂+O₂ یوتانایز شدند و کل مفصل زانو از جمله سینوویوم و استخوان ها با دقت جدا شده و در اسید نیتریک ۱۰ درصد به مدت دو هفته نگهداری و سپس در پارافین جاسازی شدند و در مقاطع ۵ میکرومتری برش داده شدند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با استفاده از روش های استاندارد انجام شد. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری برای ارزیابی میزان التهاب مفصل پنجه بررسی شد (۱۵).

سنجش بیان ژن توسط ریل تام پی سی آر (RT-PCR)

سطوح بیان ژن TNF- α و IL-10 توسط RT-PCR ارزیابی شد. تحت شرایط بدون RNase، RNA استخراج شده از پنجه عقبی پای راست رت همگن گردید. ام آر ان ای بافت ها طبق پروتکل کیت (Ulm, ZellBio GmbH، آلمان) برای تعیین بیان ژن های TNF- α و IL-10 استخراج شد. برای اطمینان از خلوص RNA از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. مقدار RNA و پروتئین با استفاده از اسپکتروفتومتری UV ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. پرایمرها با استفاده از سایت NCBI برای RT-PCR پس از سنتز cDNA (کیت سنتز cDNA (فرمتاس، ایالات متحده)) طراحی شدند. جدول ۲ پرایمرهای خاص مورد استفاده برای

داشت. هیچ تفاوت آماری قابل توجهی در اندازه گیری ضخامت پنجه چپ مشاهده نشد (نگاره ۱).



نگاره ۱: نمایش گرافیکی اندازه گیری ضخامت پنجه در گروه های مختلف در پنجه راست (R) و چپ (L).

ارزیابی جنسیت و اثرات فیزیولوژیکی

میزان بروز بیماری در دو جنس ارزیابی شد که بین دو جنس ارزیابی شده به احتمال زیاد به دلیل عدم بلوغ رت، عدم گسترش سیستم ایمنی و ایمنی مادر تفاوت معناداری مشاهده نشد. اثرات متضاد CIA بر الگوهای راه رفتن و عادات غذایی از طریق مشاهدات فیزیولوژیکی و رفتاری مشخص شد.

ارزیابی ویژگی های نانو ذرات

اوزنول کپسوله شده توسط نانو ذرات کیتوزان، نگاره کروی با قطر متوسط ذرات ۳۰/۸-۳۷/۹۵ نانومتر و سطح بار مثبت با پتانسیل زتا ۴۹/۶ میلی ولت را نشان داد.

ارزیابی فاکتور روماتوئید

تجزیه و تحلیل داده ها تایید کرد که سطح سرمی RF در G1 در مقابل G2 به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($P < 0.01$). تجزیه و تحلیل ANOVA یک طرفه در بین دو گروه درمانی مختلف نشان داد که سطوح سرمی نشانگر روماتوئید کاهش یافته است اما از نظر آماری تفاوت

روی شیکر چرخشی استفاده شد. در مرحله بعد، غشاها با تریس بافر سالین Tween 20 (TBST) سه بار شستشو شدند. سپس یک آنتی بادی ثانویه (Antibody II sc-516102 Santa Cruz) مرتبط با پراکسیداز horseradish به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق روی شیکر اضافه شد و بیان پروتئین تایید شد. شدت باند به دست آمده از هر عصاره پروتئین در برابر مقادیر متناظر باندهای پروتئین GAPDH (EPR16891) استاندارد شد و چگالی باند پروتئین ها با استفاده از نرم افزار Image J (موسسه ملی بهداشت، ایالات متحده آمریکا) اندازه گیری شد (۱۷).

تحلیل آماری

نتایج به صورت مقادیر میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شد. تمامی آنالیزهای آماری تخمین های بیوشیمیایی با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار Prism (Graph Pad Prism 5.04) انجام شد. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. با استفاده از مطالعه همبستگی پیرسون، همبستگی بین بیان ژن های مختلف و فعالیت بیماری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

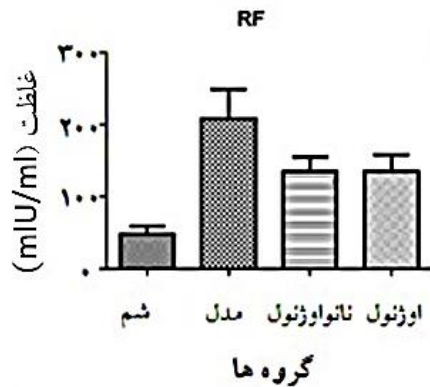
نتایج

تایید مدل CIA

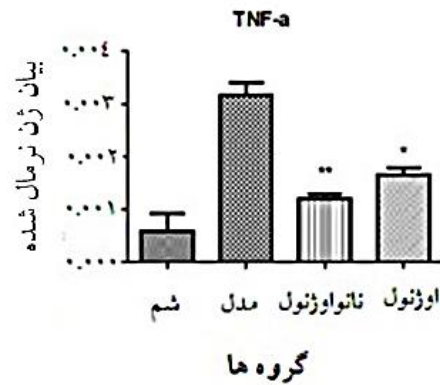
رت های تحت درمان با ۱۰۰ میکروگرم نانو ذرات اوزنول-کیتوزان کاهش قابل توجهی در بروز و شدت CIA نشان دادند. با توجه به بررسی ضخامت پنجه راست، سطح التهاب، تشکیل پانوس و از بین رفتن غضروف در گروه G2 نسبت به G3 و G4 در سطح $P < 0.001$ افزایش یافته بود. در گروه (G1) نسبت به گروه (G2) در سطح $P < 0.001$ ، همچنین در سطح $P < 0.01$ نسبت به گروه (G3) و در سطح $P < 0.001$ نسبت به گروه (G5) به صورت معنی داری کاهش

(P) (نگاره ۲-آ).

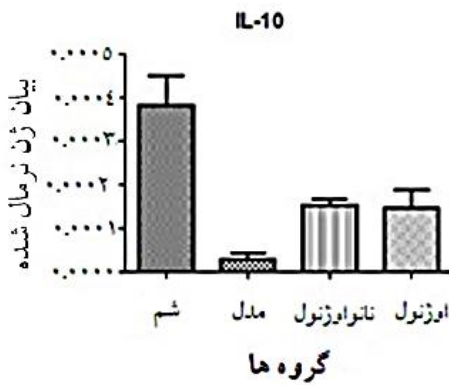
معنی داری بین G3 و G4 در مقابل G2 وجود ندارد ($P < 0.05$)



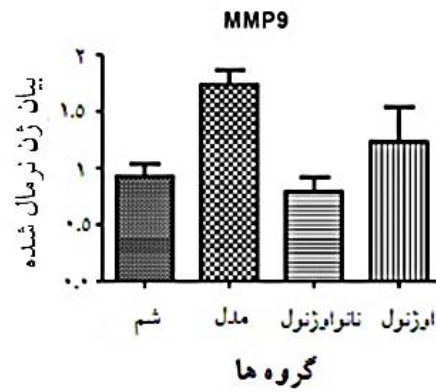
A)



B)



C)



D)

نگاره ۲: ارائه گرافیکی تخمین های بیوشیمیایی سرم در گروه های مختلف. که در آن (الف) فاکتور روماتوئید (RF)؛ (ب) فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)؛ (ج) اینترلوکین ۱۰ (IL-10)؛ (د) ماتریکس متالوپروتیناز ۹ (MMP-9). تفاوت معنی داری با گروه کنترل طبیعی (G1)، تفاوت معنی دار با گروه کنترل آرتريت (G2)، تفاوت معنی داری با گروه درمان G3 و G4 در $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ ***.

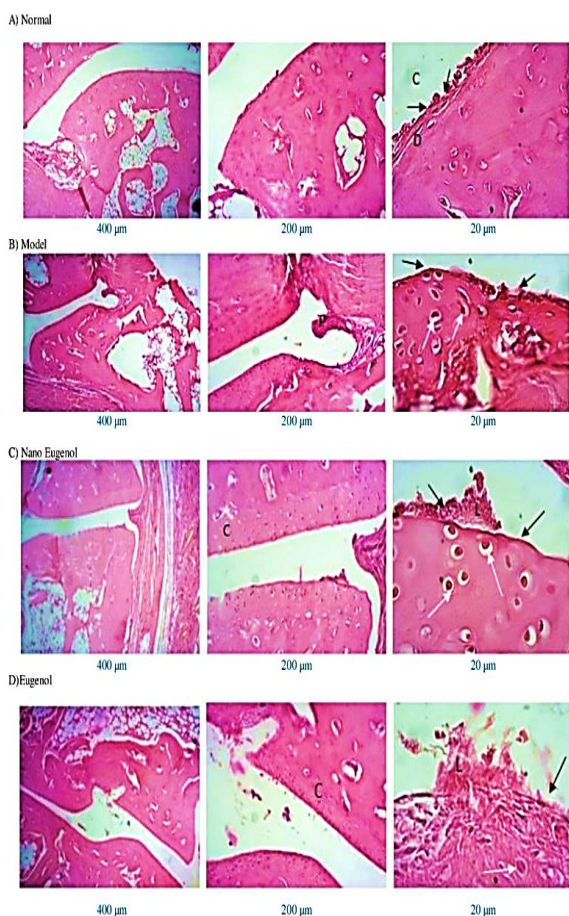
میزان بیان اینترلوکین ۱۰ در گروه مدل بسیار پایین بود، در حالی که در G1 در مقابل G2 در $P < 0.01$ به طور قابل توجهی بالاتر بود. هیچ تغییر قابل توجهی در سایر گروه ها مشاهده نشد (نگاره ۲-ج).

تست وسترن بلائینگ

بیان پروتئین MMP-9 با روش وسترن بلات، همانطور که در نگاره ۲-د نشان داده شده است، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که اگرچه سطح MMP 9 در G1 نسبت به G2 کاهش یافته است، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود

ارزیابی بیان mRNA ژن TNF-α و IL-10 توسط RT-PCR

تجزیه و تحلیل بیان ژن TNF-α در گروه G4 کاهش معنی داری را نسبت به گروه مدل نشان داد ($P < 0.05$)، همچنین G3 نیز کاهش معنی داری را نسبت به گروه مدل نشان دادند ($P < 0.01$). بیان ژن در گروه G1 نسبت به G2 در سطح $P < 0.001$ به طور قابل توجهی کاهش یافت و همچنین بیان ژن در گروه G1 نسبت به گروه G4 در سطح $P < 0.05$ کاهش معنی داری نشان داد (نگاره ۲-ب).



نگاره ۳. فتومیکروگراف مفاصل مقاطع مختلف (H&E؛ ۲۰۰). الف) برش بافتی رت شم یک سطح مفصلی پیوسته صاف (پیکان سیاه) را نشان می دهد، غضروف مفصلی (C) و استخوان زیر غضروفی (D) را می توان دید. ب) برش بافتی رت مدل یک سطح مفصلی متلاشی شده (پیکان سیاه) را نشان می دهد که سلول های غضروفی دژنره شده با هسته های پیکنوتیک (فلش سفید) را نشان می دهد. تشکیل پانوس دیده می شود. ج) برش بافتی رت تیمار شده با نانو اوژنول، ناحیه باریکی از سطح مفصلی در هم شکسته را نشان می دهد (پیکان سیاه). ضخیم شدن غضروف مفصلی (C) و استخوان ساب غضروفی (D) قابل مشاهده است. یک علامت جزر و مد منظم نیز قابل مشاهده است (فلش سفید). لنفوسیت ها نیز دیده می شوند (L). د) برش بافتی رت درمان شده با اوژنول یک سطح مفصلی صاف را نشان می دهد (فلش سیاه). غضروف مفصلی (C) هیپرسلولی بودن و تجمع کندروسیت ها (فلش سفید) را نشان می دهد.

بحث

بیماری روماتوئید نوعی بیماری التهابی و از انواع بیماری های خود ایمن می باشد که اثرات اولیه آن روی مفاصل

($p < 0.01$). علاوه بر این، یافته های ما هیچ ارتباط آماری بین فعالیت $TNF-\alpha$ و $IL-10$ و فعالیت $MMP-9$ را نشان نداد، اما رابطه بسیار معنی داری بین $MMP-9$ و $IL-10$ وجود داشت ($r = 0.761$, $p = 0.003$).

هیستوپاتولوژی مفاصل

در گروه شم در مقایسه با گروه مدل سطح بافت استخوان با غضروف هیالین صاف و ضخامت یکنواخت پوشیده شده بود. هیچگونه هیپرپلازی در لایه سینوویال و تغییرات در بافت مفصلی کنار استخوان مشاهده نشد (نگاره ۳-A). بررسی های هیستوپاتولوژیک در رت های گروه مدل، تورم مفصل، فرسایش و تغییرات استخوانی از جمله تخریب شدید استخوان، تشکیل پانوس، تکثیر و التهاب سینوویال و آسیب قابل توجه غضروف هیالین را نشان داد که می توانست به مفاصل تحتانی نفوذ کرده و آنها را از بین ببرد. نفوذ سلولهای التهابی از جمله لنفوسیت های B و T، نوتروفیل ها و ماست سل ها مشاهده شد (نگاره ۳-B). گروه درمانی اوژنول کپسوله شده توسط نانوذرات کیتوزان تراکم یکنواخت غضروف و همچنین هیپرتروفی کندروسیت ها و بازسازی غضروف مشخص بود. علاوه بر این، استخوان توسط یک لایه یکنواخت از غضروف هیالین صاف پوشیده شده بود و لایه ضخیمی از پانوس تشکیل شد. تعداد زیادی نوتروفیل در زیر لایه پانوس در این گروه مشاهده شد که نشان دهنده بهبود التهاب در منطقه است. وجود تعداد زیادی لنفوسیت در زیر غشای سینوویال هیپوپلاستیک که در گروه شم وجود نداشت، یکی دیگر از ویژگیهای مهم است که در این گروه قابل مشاهده بود (نگاره ۳-C). در گروه درمان اوژنول، یک لایه ضخیم از پانوس و تعداد زیادی نوتروفیل در زیر لایه پانوس مشاهده شد که نشان دهنده التهاب در ناحیه است. همچنین در زیر غشای سینوویال هیپوپلاستیک لنفوسیت هایی قابل مشاهده بودند (نگاره ۳-D).

مهاری و کاهنده مانند ریتوکسیماب، ۴) BS DMARDs به طور مثال می توان به Tofacitinib اشاره نمود (۲۰). با وجود اینکه این گروه از داروها می توانند در کاهش علائم بیماری موثر باشند، اما شایع ترین عوارض آنها مشکلات گوارشی، افزایش شاخص توده بدنی (BMI) و دیابت می باشد (۲۱). نتایج تحقیقات حاضر نشان داد که تورم پنجه مدل های القایی کاهش یافت، همچنین شاخص آرتريت ناشی از کلاژن در گروه های نانوآوژنول و اوژنول در مقایسه با گروه مدل کاهش معناداری در مقایسه با گروه شم نشان داده است. بررسی های هیستوپاتولوژیکی رت های CIA پس از استفاده اوژنول و نانوآوژنول ها کاهش التهاب مفاصل و بافت سینوویال را نشان داده است. اوژنول به طور موثری سبب کاهش هیپرپلازی سینوویال، تخریب غضروف و استخوان، سینوویوم و ناحیه اطراف مفصل گردیده است و لنفوسیت ها نقش مهمی در CIA دارند، زیرا آنتی بادی ها می توانند باعث آرتريت در موش های دریافت کننده شوند (۲۲).

این مطالعه نشان داد که تجویز اوژنول همانطور که کاهش قابل توجه سطوح TNF- α و MMP9 در مقایسه با گروه مدل به دنبال دارد، به طور معنی داری پیشرفت روماتوئید را بهبود می بخشد. براساس ارزیابی های صورت گرفته، گروهی از محققین، نتایج هیستوپاتولوژیکی خواص ضد التهابی اوژنول را در برابر آسیب حاد ریه ناشی از LPS با واسطه تجویز داخل ریه در موش نشان داد. آنها همچنین نشان دادند که با افزایش سطح پروتئین SOD، CAT، GPX و GST، کاهش بیان IL-6 و TNF- α وجود دارد (۲۳). به نظر می رسد که اوژنول کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان با جلوگیری از تولید TNF- α توسط مونوسیت ها و ماکروفاژها به طور موثر از مدل رت CIA محافظت می کند.

گروهی از محققین در سال ۲۰۱۰ بررسی کردند که درمان با اوژنول، التهاب ریه ناشی از LPS را کاهش می دهد که در

سینوویال می باشد که به تدریج منجر به التهاب و آسیب به غضروف ها، درد مفاصل و رشد بافت های فیبروتیک می گردد و در نهایت منجر به ناتوانی های پیشرونده شده و به دنبال آن فرد بیمار، متحمل مشکلات اجتماعی-اقتصادی می گردد. القا بیماری را با استفاده از ترکیبات شیمیایی متعدد و همچنین به کار گیری انواع گونه های حیوانات می توان ایجاد نمود. جوندگان به سبب کم هزینه بودن، همگنی ژنتیکی، کاربری آسان، و سهولت کار با آنها، به سایر حیوانات ارجح می باشند. عمدتاً از ترکیبات شیمیایی به منظور القا آرتريت استفاده می شود. با توجه به تشابهات پاتولوژیک و ایمونولوژیک در روماتوئید های انسانی و جوندگان، عمدتاً روماتوئید القا شده توسط کلاژن مورد بررسی قرار می گیرد (۱۸). در مطالعه حاضر، نتایج حاکی از آن می باشند که عصاره های اوژنول و نانوآوژنول سبب افزایش میزان بیان اینترلوکین ۱۰ می گردد. از سویی، کاهش میزان سایتوکاین پیش التهابی TNF- α و کاهش بیان MMP-9 در مفاصل التهابی در مقایسه با گروه های نرمال مشهود می باشد. براساس مطالعات پیشین، MMP-9 می تواند از سویی عاملی القایی بر عملکرد RANKL (که نوعی عامل تنظیم کننده ژن آپوپتوز می باشد) باشد و از سوی دیگر کاهش بیان MMP-9 می تواند منجر به کاهش عملکرد RANKL گردد، در نتیجه تحلیل استخوان مربوط به آرتروز را محدود می کند. القاء مدل CIA برای تعیین جنبه های پاتوفیزیولوژیک بیماری اعمال می شود و از آن به عنوان آزمایشی برای داروهای جدید استفاده می شود (۱۹).

داروهای شیمیایی مختلفی برای کاهش علائم بیماری یا پیشرفت بیماری استفاده شده است، که براساس اثراتشان شامل: ۱) داروی ضد روماتیسمی اصلاح کننده بیماری جنبشی رایج (CS DMARDs) از جمله هیدروکسی کلروکینون، ۲) داروهای بیولوژیک DMARDs از جمله بازدارنده های TNF- α مانند اتانرسپت، ۳) آنتی بادی های

گردد. بنابراین، مطالعه حاضر می تواند شواهد جدیدی از خواص و مکانیسم های ضد التهابی اوزنول ارائه دهد.

محققینی در سال ۲۰۱۴ اثرات سیترال را در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و اوزنول در دوزهای ۳۱، ۶۲، ۱۰۰، ۲۴۰ و ۲،۴۸ $\mu\text{g/ml}$ را در موش های نژاد Balb/c ارزیابی نمودند.

نتایج، بیان COX-2، NF- κ B و TNF- α را در برخی از ماکروفاژها نشان داد، اما بیان TNF- α را در سلول های فعال شده با LPS افزایش داد که با نتایج مطالعه حاضر

مطابقت نداشتند (۲۷). اخیراً تأثیر پلی مورفیسم TNF- α G-308A بر سطوح MMP-9 در پلاسمای خون (BP) و مایع سینوویال (SF) بیماران مبتلا به روماتوئید با تمرکز بر نقش

آنها در رشد مجدد مفصل آسیب دیده بررسی گردیده است. در کار این محققین نتایج آنها موید آن است که فعالیت SF و MMP-9 در گروه مبتلا به روماتوئید در مقایسه با گروه

شم بیشتر بوده است. علاوه بر این، وجود آلل - TNF- α 308A با افزایش فعالیت MMP-9 در SF بیماران مرتبط بوده

است که این امر می تواند عامل پیشبینی پیشرفت سریع بیماری باشد (۲۸). نتایج ارزیابی های ما حاکی از آن است

که، با توجه به آن که میزان بیان MMP-9 در گروه های تجربی افزایش معنی داری را داشته است، اما با کاهش در

گروه های تحت درمان همراه بوده است. افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک، از جمله MMP، ممکن است

مسئول فرسایش مفاصل در آرتریت نوزادان باشد. MMP-9 می تواند در پروتئولیز کلاژن های انواع IV، V و تخریب

اجزا کلاژن ها گردد و همچنین می تواند باعث ترشح IL-8 شود، نقش اینترلوکین-8 در واقع این است که نوتروفیل ها

را در محل التهاب جذب می کند و منجر به آزاد شدن آنزیم های پروتئولیتیک التهابی بیشتر می شود.

در مطالعه ای بر روی ۹۷ بیمار مبتلا به روماتوئید و ۱۰۳ بیمار استئوآرتریت به بررسی بیان MMP شماره های ۱-، ۲-، ۳-، ۷-، ۸-، ۹- و ۱۳- پرداختند. نتایج، بیانگر بیان بیشتر

آن تعداد نوتروفیل، بیان ماکروفاژها، TNF- α و NF- κ B کاهش می یابد (۲۴). علاوه بر این، در سیستم آسیب ایسکمی / خونرسانی مجدد (I / R)، اثر محافظتی اوزنول

(۱۰-۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، گاوآژ) در مدل رت ویستار، با آسیب ساختاری و عملکردی کبدی طی ۱۵

روز مورد بررسی قرار گرفت. با سطوح کمتر TNF- α ، MPO و NF-B و سطوح بالاتر GSH، اوزنول ۱۰ میلی گرم بر

کیلوگرم، عملکرد و ساختار کبد را بهبود بخشید (۲۵). با توجه به نتایج ما، اثر مثبت استفاده همزمان اوزنول کپسوله

شده با نانوذرات کیتوزان، میزان دوز مصرفی دارو را کاهش داد و با کمک اثرات درمانی دارو های گیاهی، سطح تماس

غضروف افزایش معنی داری داشته است. در مقایسه کار تحقیقاتی محققین در سال ۲۰۱۰ با بررسی کنونی صورت

گرفته، به نظر می رسد که آنتی اکسیدان های فنولی می توانند از فعال شدن NF-B (که تنظیم کننده کلیدی رونوشت

TNF- α در ماکروفاژها می باشد)، جلوگیری کنند و از این رو تولید TNF- α را در سطح رونویسی مسدود کنند.

بر طبق مطالعات گروهی دیگر در سال ۲۰۱۱ مکانیسم های مولکولی سنتز اکسید نیتریک القا شده توسط پلی ساکارید

(INOS) در ماکروفاژهای موش (RAW 264.7) در چهار دوز شامل ۱، ۱۰، ۵۰ یا ۱۰۰ μm ایجاد گردیده است. در

موش های القا شده با LPS، اوزنول و گلیسرین-ایزو اوزنول اثرات مھاری بر تنظیم سطوح نیتریت، پروتئین INOS و mRNA داشته اند و از سوی دیگر سرکوب TNF- α و

تولید اینترلوکین- β ۱ را به دنبال داشته اند (۲۶). در مطالعه ما، تجویز اوزنول کپسوله شده با نانوذرات کیتوزان به مدت

۲۵ روز منجر به سرکوب TNF- α و کاهش بیان مارکر RF همانند اوزنول گردیده است. به احتمال زیاد، اثرات ضد

التهابی اوزنول و اوزنول کپسوله شده با نانوذرات کیتوزان به طور بالقوه با مهار MAPKs و مسیرهای سیگنالینگ

Akt/ κ Ba با واسطه کاهش بیان NF-KB و AP-1 انجام می

احتمالاً باعث سرکوب رشد و تکامل سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از لنفوسیت‌های فعال می‌گردد. از سوی دیگر مصرف نانو اوژنول سبب افزایش بیان ام‌آز ان‌آی اینترلوکین ۱۰ و TNF- α می‌گردد.

اگرچه نانو اوژنول دارای اثرات کاهنده TNF- α است، اما بر اساس ارزیابی‌های انجام شده، تفاوت معنی‌داری در سایر ژن‌های مورد مطالعه با اوژنول مشاهده نگردیده است. بنابراین، با توجه به اینکه اوژنول از نظر هزینه و منابع مصرف روزانه در ادویه جات در دسترس و مقرون به صرفه تر است، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در مورد تأثیر اوژنول در بیماری‌های التهابی انجام گردد.

تقدیر و تشکر

تشکر ویژه از تیم تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران و کارکنان محترم آزمایشگاه زکریای رازی (دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات) ابراز می‌دارم.

فهرست منابع

1. Yu MB, Firek A, Langridge WH. Predicting methotrexate resistance in rheumatoid arthritis patients. *Inflammopharmacology*. 2018;26(3):699-708.
2. Hirata A, Ota R, Hata T, Hamada T, Nishihara M, Uchiyama K, et al. Prescribing Trends of Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs Using a Claims Database from 6 Million People in Japan. *Clinical drug investigation*. 2021;41(11):967-74.
3. Haro-González JN, Castillo-Herrera GA, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H. Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*. 2021;26(21):6387
4. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, et al.

MMP-1, 2, 3, 8, 9 در بیماران مبتلا به روماتوئید بوده است (۲۹). در بررسی‌های ما، میزان بیان MMP-9 در هر دو گروه‌های اوژنول و نانو اوژنول در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است، اگرچه میزان کاهش معنی‌دار نمی‌باشد. با این حال، کاهش قابل توجه TNF- α و MMP-9 نشان دهنده اثربخشی اوژنول در تسکین التهاب می‌باشد.

ارزیابی آزمایشگاهی نشان داده‌اند که اینترلوکین ۴ و ۱۰ تولید سایتوکاین‌های التهابی، از جمله اینترلوکین ۱، ۶ و TNF- α را سرکوب می‌کنند. علاوه بر این، اینترلوکین ۱۰ منجر به معکوس کردن دژنراسیون غضروف در بیماران روماتوئیدی می‌گردد (۳۰). بنابراین، اثرات ضد التهابی نانو اوژنول و اوژنول با توانایی آنها در سرکوب ترشح سیتوکاین‌های پیش‌التهابی و افزایش ترشح ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ توجیه می‌گردد. آنالیزهای هیستوپاتولوژیکی همچنین نشان داده‌اند که نانو اوژنول و اوژنول ممکن است به کاهش التهاب مفصل و تحلیل استخوان کمک کنند. در نتیجه، استخوان و غضروفی که از اثرات نانو اوژنول و اوژنول محافظت می‌کنند، می‌توانند با کاهش تخریب سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مواجه گردند.

در عین حال که استفاده از داروهای بیولوژیکی می‌توانند سبب بهبود کیفیت زندگی بیماران گردد، از سوی دیگر گزارشاتی از اثرات جانبی مختلف این داروهای شیمیایی در درمان این بیماران دیده شده است. به دلیل کاهش التهاب، خواص اوژنول سبب می‌گردد تا گزینه مناسبی برای درمان‌های گیاهی باشد و بر اساس نتایج به دست آمده، فیتونانومدیسین به عنوان یک عامل درمانی جدید در درمان بیماران مبتلا به اختلالات خودایمنی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه با تحقیقات قبلی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بر روی اندام مطابقت دارد. اوژنول با نانوذرات کیتوزان در حیوانات القا شده کپسوله‌گردیده، که

- Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*. 2021;13(19):3256.
5. Rahman SU, Gong H, Mi R, Huang Y, Han X, Chen Z. Chitosan Protects Immunosuppressed Mice Against *Cryptosporidium parvum* Infection Through TLR4/STAT1 Signaling Pathways and Gut Microbiota Modulation. *Frontiers in immunology*. 2021;12:784683-.
 6. Das SC, Rahman MA, Das Gupta S. In-silico analysis unravels the structural and functional consequences of non-synonymous SNPs in the human IL-10 gene. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2022;23(1):10.
 7. Xu J, Zhang M-Y, Jiao W, Hu C-Q, Wu D-B, Yu J-H, et al. Identification of Candidate Genes Related to Synovial Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Bioinformatics Analysis. *International Journal of General Medicine*. 2021;14:7687.
 8. Luan J, Hu Z, Cheng J, Zhang R, Yang P, Guo H, et al. Applicability and implementation of the collagen-induced arthritis mouse model, including protocols. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;22(3):1-10.
 9. Richmond J, Morton D, Hawkins P. *Guideline 20: Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions*. Orange, Australia: Animal Research Review Panel. 2007.
 10. Kim MY, Ha H-K, Ayu IL, Han K-S, Lee W-J, Lee M-R. Manufacture and physicochemical properties of chitosan oligosaccharide/A2 β -casein nano-delivery system entrapped with resveratrol. *Food science of animal resources*. 2019;39(5):831.
 11. Bento R, Pagán E, Berdejo D, de Carvalho RJ, García-Embido S, Maggi F, et al. Chitosan nanoemulsions of cold-pressed orange essential oil to preserve fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 2020;331:108786.
 12. Wang X, Shen Y, Zhuang X, Wang N, Zhang Q, Zhu L, et al. Jintiang Capsule Alleviates Rheumatoid Arthritis and Reverses Changes of Serum Metabolic Profile in Collagen-Induced Arthritic Rats. *Journal of Inflammation Research*. 2021;14:6685.
 13. Wahba MG, Messiha BA, Abo-Saif AA. Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(9):1705-15.
 14. Kim D-k, Nishida H, An SY, Shetty AK, Bartosh TJ, Prockop DJ. Chromatographically isolated CD63+ CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(1):170-5.
 15. Meurot C, Martin C, Sudre L, Breton J, Bougault C, Rattenbach R, et al. Liraglutide, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, exerts analgesic, anti-inflammatory and anti-degradative actions in osteoarthritis. *Scientific reports*. 2022;12(1):1-15.
 16. He X, Huang L, Qiu S, Yin X, Shen Y, Wu Y, et al. β -Endorphin attenuates collagen-induced arthritis partially by inhibiting peripheral pro-inflammatory mediators. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(4):4014-8.
 17. Song Z, Wang J, Su Q, Luan M, Chen X, Xu X. The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2021;87:521-8.
 18. Hsiao H-B, Wu J-B, Lin W-C. Anti-arthritis and anti-inflammatory effects of (-)-epicatechin-3-O- β -d-allopyranoside, a constituent of *Davallia formosana*. *Phytomedicine*. 2019;52:12-22
 19. Sabry M, Mostafa S, Kamar S, Rashed L, Estaphan S. The cross-talk between matrix metalloproteinase-9, RANKL/OPG system and cardiovascular risk factors in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Plos one*. 2021;16(10):e0258254.

20. Infante M, Padilla N, Alejandro R, Caprio M, Della-Morte D, Fabbri A, et al. Diabetes-Modifying Antirheumatic Drugs: The Roles of DMARDs as Glucose-Lowering Agents. *Medicina*. 2022;58(5):571.
21. Strehl C, Bijlsma JW, De Wit M, Boers M, Caeyers N, Cutolo M, et al. Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: viewpoints from an EULAR task force. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75(6):952-7..
22. Wang M, Dai T, Li S, Wang W. Eugenol suppresses the proliferation and invasion of TNF- α -induced fibroblast-like synoviocytes via regulating NF- κ B and COX-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022.
23. Huang X, Liu Y, Lu Y, Ma C. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *International immunopharmacology*. 2015;26(1):265-71.
24. Magalhães CB, Casquilho NV, Machado MN, Riva DR, Travassos LH, Leal-Cardoso JH, et al. The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2019;259:30-6.
25. Abd El Motteleb DM, Selim SA, Mohamed AM. Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *Journal of immunotoxicology*. 2014;11(3):238-45.
26. Yeh J, Hsu J, Hong Y, Wu J, Liang J, Wu B, et al. Eugenolol and glyceryl-isoegenol suppress LPS-induced iNOS expression by down-regulating NF- κ B AND AP-1 through inhibition of MAPKS and AKT/I κ B α signaling pathways in macrophages. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2011;24(2):345-56.
27. de Paula Porto M, Da Silva GN, Luperini BCO, Bachiega TF, de Castro Marcondes JP, Sforcin JM, et al. Citral and eugenol modulate DNA damage and pro-inflammatory mediator genes in murine peritoneal macrophages. *Molecular biology reports*. 2014;41(11):7043-51.
28. Stojanovic S, Stamenkovic B, Stoimenov TJ, Nedovic J, Zivkovic V, Despotovic M, et al. Association of tumor necrosis factor- α (G-308A) genetic variant with matrix metalloproteinase-9 activity and joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. 2017;36(7):1479-85.
29. Oliviero F, Scanu A, Ramonda R, Frallonardo P, Sfriso P, Dayer JM, et al. IL-1 β and IL-8 are scavenged by the hexadecylamide derivative of hyaluronic acid: A new mechanism. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2015;103(9):2823-9.
30. Magyari L, Varszegi D, Kovesdi E, Sarlos P, Farago B, Javorhazy A, et al. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World journal of orthopedics*. 2014;5(4):516.