

بررسی گلیکوزآمینوگلیکان‌های غضروف در روند بازسازی لاله‌ی گوش خرگوش تحت تاثیر تیمار با عصاره‌ی الکلی گیاه یونجه

حسین رفیعی^۱، دکتر جینا خیاطزاده^۲

نویسنده‌ی مسوول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی J.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

دریافت: ۹۰/۱۰/۱۹ پذیرش: ۹۱/۴/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات غضروفی مفاصل از عوامل مهم بیماری‌های اسکلتی است که معمولاً به میزان تولید گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در بافت غضروفی مرتبط هستند. حضور ویتامین‌ها، برخی کانی‌ها و اسیدهای آمینه باعث افزایش روند بازسازی می‌شود. در این تحقیق از گیاه یونجه [*Medicago Sativa(Alfalfa)*]، سرشار از برخی ویتامین‌ها، کانی‌ها و اسیدهای آمینه، جهت التیام غضروف لاله‌ی گوش خرگوش و ارزیابی هیستوشیمیایی تولید گلیکوزآمینوگلیکان‌های (GAGs) ماده‌ی زمینه‌ای (ECM) استفاده شد.

روش بررسی: در موقعیت میانی لاله‌ی گوش ۱۰ راس خرگوش نر (در ۲ گروه تصادفی)، پس از زدن موها و بی‌حسی با لیدوکائین ۱۰ درصد، ۴ سوراخ (قطر ۴ میلی‌متر) ایجاد شد (جمعاً ۸۰ سوراخ). گوش‌های گروه تجربی با عصاره‌ی الکلی گیاه یونجه و گروه کنترل با سرم فیزیولوژی روزانه تیمار موضعی شدند. نمونه‌برداری از بافت در حال ترمیم در روزهای صفر تا ۵۰، برای بررسی‌های هیستوشیمیایی انجام شد. شدت رنگ آلسین بلو با pH برابر ۱ و ۲/۵ (برای GAGs سولفات و کربوکسیله) و همچنین آبی تولوئیدین (دارای واکنش متاکرومازی با GAGs سولفات) در بافت غضروفی گزارش شد.

یافته‌ها: در هر سه رنگ آمیزی هیستوشیمیایی، شدت رنگ غضروف و زمان شروع واکنش به رنگ در سوراخ‌های تیمار نسبت به سوراخ‌های کنترل بیشتر و بسته شدن سوراخ غضروفی گروه تجربی سریع‌تر صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره‌ی یونجه با توجه به حضور برخی ویتامین‌ها و یا اسیدهای آمینه خود، باعث افزایش فعالیت GAGs کندروبلاست‌ها و تشریح گلیکوزآمینوگلیکان‌های اسیدی کربوکسیله و سولفات در ماده‌ی زمینه‌ای و به تبع آن سرعت ترمیم غضروف گردیده است و از این رو احتمالاً گیاه فوق می‌تواند زمینه‌ی مطالعات آینده در مورد اثر التیام بخشی این گیاه و استفاده‌های فارماکولوژیک را فراهم نماید.

واژگان کلیدی: یونجه، ترمیم و بازسازی، غضروف گوش، گلیکوزآمینوگلیکان، خرگوش

مقدمه

بیولوژیکی پیچیده در یک آبشار هماهنگ و موزون برای ترمیم و تعمیر منطقه‌ی آسیب دیده رخ می‌دهد (۱). جانوران ساده توانایی بالایی برای بازسازی دارند، زیرا دسته‌های

ترمیم زخم (Wound Healing) و بازسازی (Regeneration) از فرایندهای طبیعی برخی بافت‌های بدن می‌باشند. هنگامی که بدن زخمی می‌شود یک سری وقایع

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی علوم تکوینی، بخش زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

۲- دکترای زیست شناسی جانوری تکوینی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

GAG اسیدی در مراحل ترمیم بافت غضروف پس از تیمار سوراخ‌های ایجاد شده در گوش خرگوش با عصاره‌ی گیاه یونجه بود.

روش بررسی

تهیه‌ی نمونه‌ی آزمایشگاهی: برای انجام این مطالعه‌ی تجربی، خرگوش‌های نر نژاد نیوزیلندی (۱۰ راس) به وزن تقریبی ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم از موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد تهیه و آزمایش‌ها در بخش حیوانات موسسه با رعایت اصول اخلاقی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. پیش از ایجاد سوراخ، ابتدا موهای اضافی در لاله‌ی گوش توسط کرم موبر برداشته شد، با استفاده از الکل گوش‌ها را ضد عفونی کرده، هر خرگوش در محفظه‌ی مخصوص نگهدارنده، قرار داده شد. سپس گوش‌ها با استفاده از دستگاه پانچ که به همین منظور تهیه شده بود به شکل دایره در موقعیت مدیال و در دو طرف رگ اصلی سوراخ شدند. کل ضخامت لاله‌ی گوش شامل پوست و غضروف میانی، برداشته شد. در هر گوش ۴ سوراخ هر یک به قطر ۴ میلی متر ایجاد شد و لذا جمعاً ۸۰ موضع برای مطالعه فراهم آمد ($N=5$). از بافت پانچ شده به عنوان نمونه شاهد (سالم اولیه) در مقایسه با بافت در حال ترمیم استفاده شد (۸).

تهیه‌ی عصاره‌ی گیاهی: گیاه یونجه در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد (IAUM) با کد هرباریومی با شماره ۹۰۵۰ شناسایی گردید. قسمت‌های هوایی برگ و ساقه‌ی گیاه خرد شده، سپس ۱۵۰ گرم یونجه‌ی خرد شده داخل ظرف شیشه‌ای یک لیتری ریخته شد و به آن ۷۵۰ سی‌سی حلال اتانول ۹۶ درصد، (برای حفظ ماندگاری عصاره) اضافه گردید. درب ظرف شیشه‌ای محکم بسته شد و جهت جلوگیری از حرارت مستقیم، بر روی سه پایه در ظرف شیشه‌ای بزرگ‌تر پر از آب گرم ($20 \pm 32^\circ\text{C}$)، قرار داده شد.

بزرگی از سلول‌های بنیادی (Stem Cell) را در بدن دارند که با مهاجرت به بخش‌های آسیب دیده، ترمیم بافت‌های از دست رفته را موجب می‌شوند (۲). توانایی بازسازی با پیچیدگی جانور نسبت عکس دارد. برای مثال در بسیاری از دوزیستان و سوسمارهای آبی توانایی ترمیم بسیار بالاتر از پستانداران است. گوش خرگوش یکی از محدود بافت‌های بدن پستانداران است که دارای قابلیت ترمیم و بازسازی کامل همه‌ی بافت‌های اولیه می‌باشد (۲۳). در تشکیل بافت غضروفی، تولید و ترشح ترکیبات قندی اسیدی از جمله گلیکوزآمینوگلیکان‌هایی مانند اسید هیالورونیک و کندروئیتین سولفات در ماده بین سلولی (ECM) از مهم‌ترین نشانه‌های تمایز سلول‌های غضروفی (کندروبلاست) است (۴۵). از آنجاکه غضروف لاله‌ی گوش خرگوش شبیه به تیغه‌ی غضروفی سطح مفاصل، بینی و انتهای شکمی دنده‌ها در انسان، از نوع هیالین است (۴)؛ لذا احتمالاً نتایج حاصل از مطالعه‌ی غضروف گوش خرگوش، مدل مناسبی برای تعمیم به انسان است (۶). تاثیر گیاهان و داروهای مختلف بر روند ترمیم گوش خرگوش مطالعه شده است اما تاکنون اثر گیاه یونجه بر روند ترمیم مورد بررسی قرار نگرفته است. در طب سنتی از یونجه برای درمان آرتريت و انباشته شدن آب در بافت‌ها (مثل بیماری ادم) استفاده می‌شود و همچنین این گیاه حاوی مقدار زیادی ویتامین A و C است و کوبیده آن زخم را به سرعت التیام داده، از خونریزی جلوگیری می‌کند (۷). لذا اگرچه تاثیر بسیاری داروها یا ویتامین‌ها بر روند ترمیم غضروف بررسی شده است، اما با توجه به محتویات گیاه یونجه و ارزان بودن آن، در صورت التیام بخش بودن روند ترمیم، به‌عنوان داروی گیاهی مناسب با عوارض جانبی کمتر معرفی خواهد شد. با توجه به کثرت آسیب‌های غضروفی در دنیای امروز و از طرفی ترمیم محدود این بافت که مشکلات اقتصادی و روحی روانی برای بیماران به دنبال دارد، لذا هدف از پژوهش اخیر بررسی هیستوشیمیایی روند ترشح ترکیبات

گلیکوزآمینوگلیکان‌های حاوی بار منفی است. گروه‌های سولفات گلیکوزآمینوگلیکان‌ها مولکول‌های رنگ مورد نظر را جذب می‌کنند. اگر در مجاورت این مولکول در ماتریکس خارج سلولی، GAG با بار منفی بیشتر باشد، جایگاه‌های بیشتری بر روی این مولکول اشغال خواهند شد و در نتیجه شدت رنگ مورد مشاهده در بافت بیشتر خواهد بود و به این ترتیب غضروف رنگ ارغوانی می‌گیرد (خاصیت ماکرومازی). تفاوت در شدت رنگ‌پذیری در ماتریکس به علت تفاوت در فراوانی پروتئوگلیکان‌هاست. حضور رنگ آبی تولوئیدین سبب اتصال این ترکیبات سولفات‌ها به هم شده و آن‌ها را به صورت نوعی پلیمر درآورده که به رنگ ارغوانی در می‌آیند (۹ و ۱۰). مولکول آلسین بلو به حالت محلول با بار مثبت است و قابلیت ترکیب پذیری فوق‌العاده‌ای برای جذب یون منفی دارد. لذا با ازدیاد تعداد مولکول‌های سولفات (برای آلسین در $\text{pH}=1$) و ترکیبات کربوکسیله (برای آلسین در $\text{pH}=2/5$)، شدت رنگ‌پذیری بیشتر خواهد بود (۱۱ و ۱۲).

متغیرهای مطالعه: طی مطالعه‌ی میکروسکوپی لام‌ها، شدت رنگ غضروف تازه تشکیل شده در هر یک از رنگ آمیزی‌ها، برای گروه تجربی و کنترل بررسی و درجه‌بندی شدت رنگ، مطابق روش گانگ (Gong) (درجه‌بندی ۰ تا ۵) گزارش شد (۱۳). از آنجایی که افزایش شدت رنگ‌های مورد بررسی در بافت غضروفی به دلیل ازدیاد سنتز ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکان اسیدی در ماده بین سلولی بافت غضروف می‌باشد، لذا شدت رنگ مشاهده شده گویای پیشرفت روند سنتز بافت غضروفی و لذا نشانه‌ی روند بهبود آسیب غضروفی است (۱۴ و ۱۵). با توجه به گسسته بودن اطلاعات شدت رنگ، میانه‌ها تعیین شد و آزمون آماری Mann Whitney و Wilcoxon انجام شد. رسم نمودارهای مربوطه نیز صورت گرفت.

مدت زمان استخراج برای عصاره‌های غیرروغنی ۴ تا ۵ ساعت می‌باشد (۷). برای صاف کردن عصاره‌ی به دست آمده، از آبمیوه‌گیری‌های قدیمی (با طلق ژلاتینی) استفاده شد. مخلوط عصاره و گیاه در چند مرحله داخل آبمیوه‌گیری ریخته و تفاله‌ی آن جدا گردید. عصاره‌ی به دست آمده در انکوباتور قرار گرفت و پس از حذف حلال، به صورت پودر خشک در آمد و داخل ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شد. مقادیر لازم برای تیمار موضعی، بلافاصله قبل از کار، در نرمال سالین حل شد (۷).

نحوه‌ی تیمار نمونه‌ها: روی سوراخ‌های تست دو بار در روز و در وقت معینی با عصاره‌ی یونجه و سوراخ‌های کنترل با سرم فیزیولوژی تا ۵۰ روز پس از ایجاد سوراخ تیمار موضعی (توسط سرنگ فیلتردار) شد.

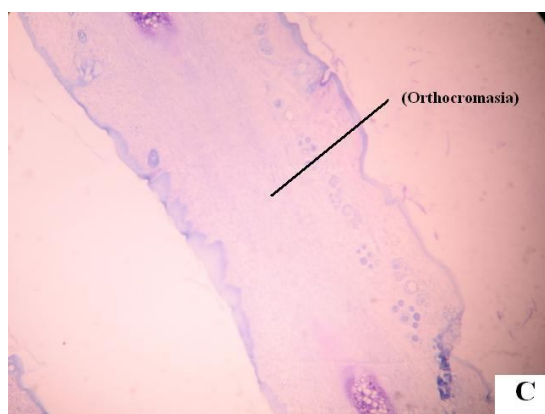
نمونه‌برداری بافتی: پس از ضد عفونی و بی‌حس کردن گوش‌ها، حیوان مجدداً در محفظه‌ی مخصوص قرار داده شد. از دستگاه پانچی با قطر سوراخ به اندازه‌ی ۶ میلی‌متر استفاده شد و گوش خرگوش‌ها در بازه‌های زمانی مشخص پس از ایجاد سوراخ (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز پس از سوراخ) در موقعیت‌های در حال ترمیم مجدداً سوراخ گردید ($N=5$).

تهیه‌ی مقاطع میکروسکوپی: کلیه‌ی بافت‌ها به فیکساتور بوئن انتقال یافته، مراحل مختلف آبگیری با درجات صعودی اتانول، پارافین‌دهی، قالب‌گیری، برش‌گیری با ضخامت ۷ میکرون (توسط دستگاه میکروتوم Leitz ۱۵/۲) انجام گردید. پس از قرارگیری مقاطع روی لام تمیز، آبدهی با درجات نزولی اتانول، رنگ‌آمیزی با آبی تولوئیدین و آلسین بلو $\text{pH} 1$ و $\text{pH} 2/5$ انجام پذیرفت. به کمک رنگ‌آمیزی آلسین بلو و آبی تولوئیدین حضور ترکیبات قندی اسیدی سولفات‌ها و کربوکسیله طی روند ترمیم و بازسازی غضروف مورد بررسی قرار گرفت. آبی تولوئیدین یک مولکول کاتیونی ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}^+$) با قابلیت ترکیب شدن با انواع

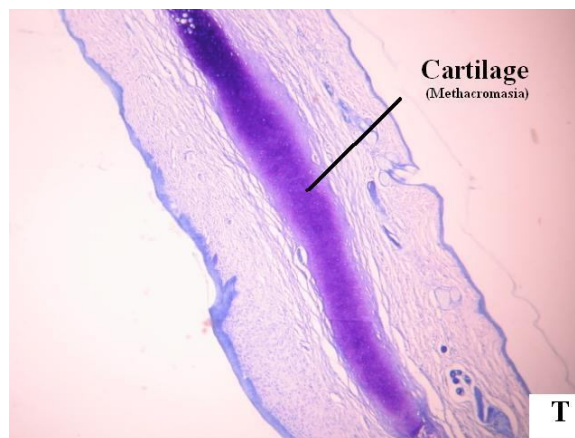
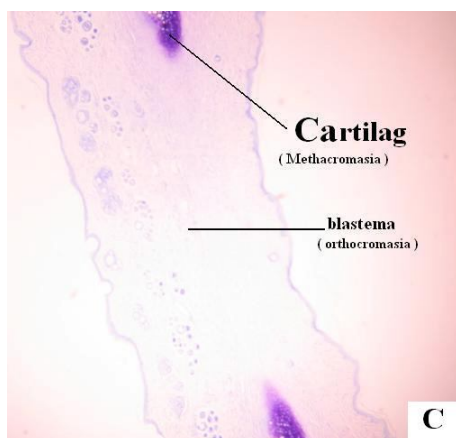
یافته‌ها

در مشاهدات میکروسکوپی تیغه‌ی غضروفی جدید، زمان شروع واکنش متاکرومازی (رنگ بنفش در پاسخ به رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین) در نمونه‌ی تجربی نسبت به کنترل سریع‌تر و همچنین شدت رنگ مورد مشاهده بیشتر بود (شکل ۱ و ۲ و نمودار ۱). در غضروف تازه سنتز، افزایش شدت رنگ آلسین بلو (۲/۵ و pH=۱) در گروه تجربی نسبت به کنترل (شکل ۳ و ۴، نمودار ۳ و ۲) مشاهده شد. لذا تفاوت آشکاری در تغییرات هیستوشیمیایی بافت غضروفی در

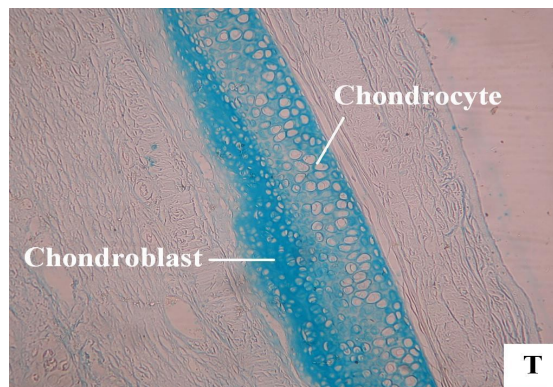
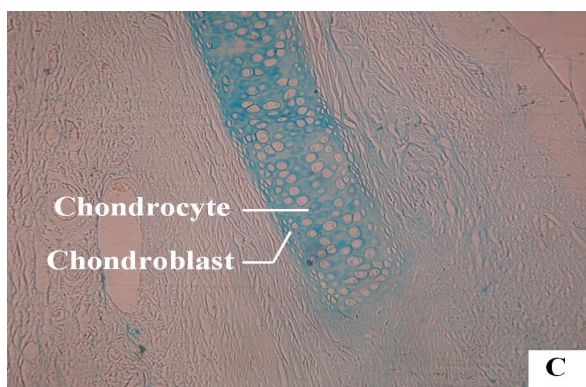
حال ترمیم گروه تجربی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مطابق نمودارها غضروف گروه تجربی، ۳۴ روز پس از ایجاد سوراخ ویژگی‌های غضروف شاهد را به نمایش می‌نهد در حالی که در نمونه‌ی کنترل، تا روز ۴۸ این روند مشاهده نشد (نمودارهای ۱ تا ۳). از آنجا که شدت رنگ مورد مشاهده در مقاطع میکروسکوپی، با غلظت حضور ترکیبات غضروفی مرتبط است، لذا ترمیم تیغه‌ی غضروفی (بهبودی زخم) در گروه تجربی سریع‌تر بود.



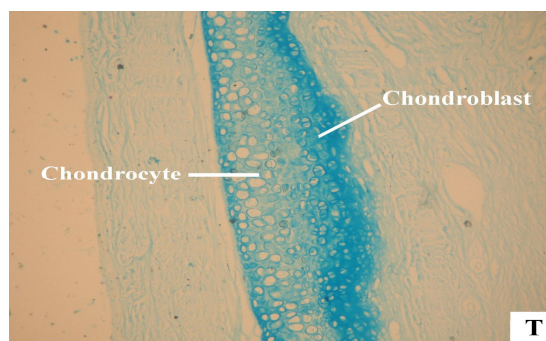
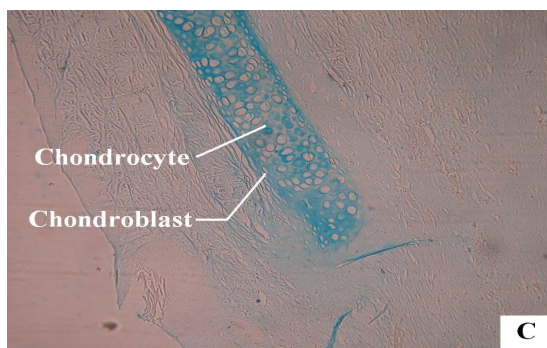
شکل ۱: برش ناحیه‌ی ترمیم غضروف ۱۵ روز پس از ایجاد سوراخ، گروه تجربی (T) با شدت رنگ متوسط (+۳) و گروه کنترل (C) بدون پاسخ (-) (آبی تولوئیدین - درشت نمای ۱۰۰X)



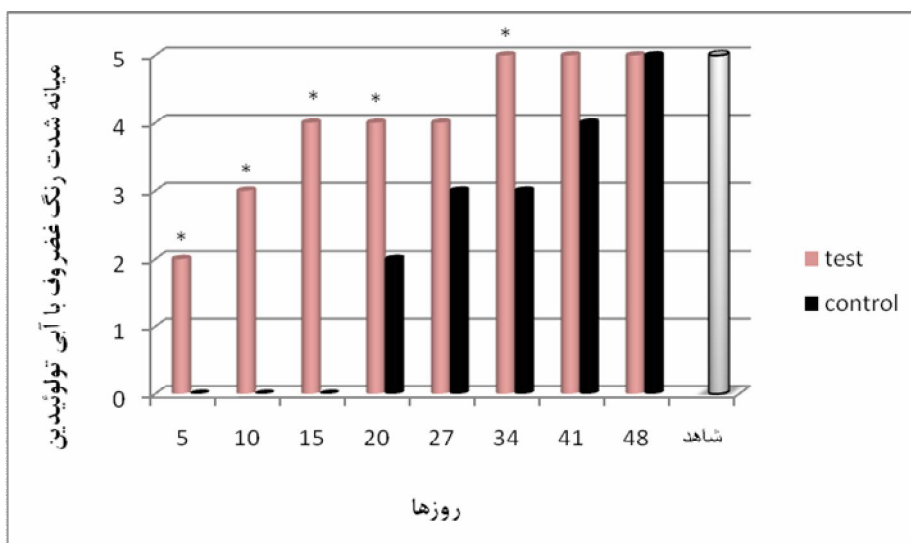
شکل ۲: برش ناحیه‌ی ترمیم غضروف ۲۷ روز بعد از ایجاد سوراخ، گروه تجربی (T) با شدت پاسخ شدید (+۴) و گروه کنترل (C) با پاسخ تاخیری و شدت متوسط (+۳) (آبی تولوئیدین - درشت نمای ۱۰۰X)



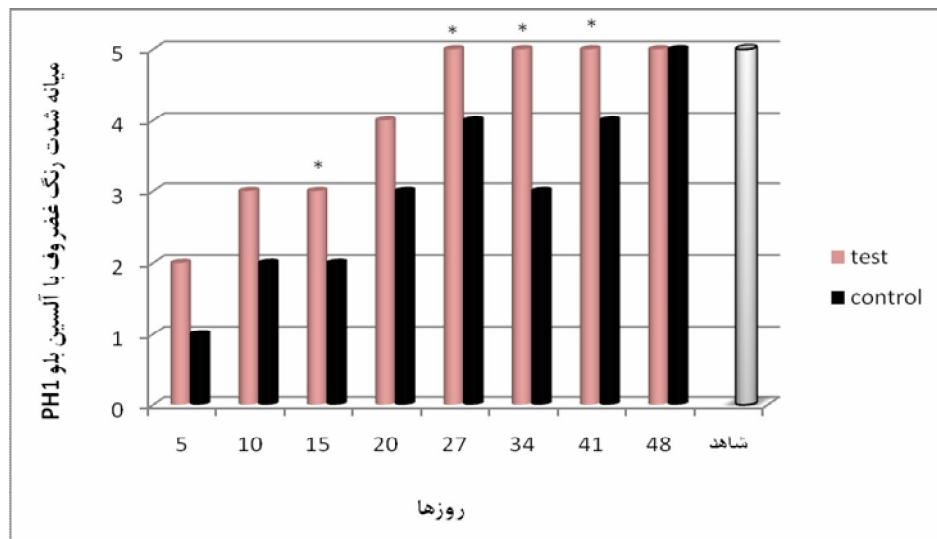
شکل ۳، برش ناحیه‌ی ترمیم غضروف روز ۳۴ پس از ایجاد سوراخ، گروه تجربی (T) با شدت پاسخ شدید (+۵) و گروه کنترل (C) با شدت پاسخ متوسط (+۳) (آلئین بلو ۱ pH - درشت نمایی ۱۰۰X)



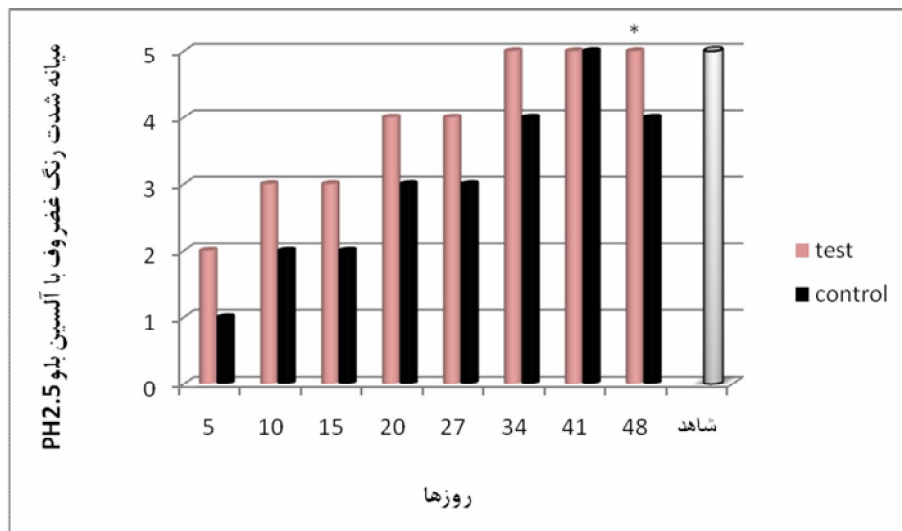
شکل ۴، برش ناحیه‌ی ترمیم غضروف ۳۴ روز بعد از ایجاد سوراخ، گروه تجربی (T) با شدت پاسخ شدید (+۵) و گروه کنترل (C) با شدت پاسخ متوسط (+۳) (آلئین بلو ۲/۵ pH - درشت نمایی ۱۰۰X)



نمودار ۱، مقایسه‌ی میانگین شدت رنگ آبی تولوئیدین در غضروف در حال ترمیم روزهای مختلف در بین نمونه‌های تست و کنترل ($N=5$, $P=0.004$)



نمودار ۲: مقایسه‌ی میانگین شدت رنگ آلسین بلو pH ۱ در غضروف در حال ترمیم در روزهای مختلف در نمونه‌های تست و کنترل ($N=5$, $P=0.004$)



نمودار ۳: مقایسه‌ی میانگین شدت رنگ آلسین بلو pH ۲/۵ در غضروف در حال ترمیم در روزهای مختلف در نمونه‌های تست و کنترل ($N=5$, $P=0.004$)

بحث

یونجه بود (نمودار ۱ تا ۳). افچینیکف نشان داد که با رشد تیغی غضروفی و تمایز کندروسیت‌ها، شدت رنگ آلسین بلو در اطراف کندروسیت‌ها و همچنین ECM بیشتر می‌گردد. در صورت افزودن مواد تسریع کننده‌ی ترمیم غضروف، به‌علت افزایش مقدار ماتریکس و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، تعداد زیادی

نتایج تحقیق حاضر، گویای افزایش سرعت و شدت تولید ترکیبات قندی کربوکسیله و سولفات‌ها (در پاسخ به رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو و تولوئیدین‌بلو) در مراحل ترمیم غضروف سوراخ‌های لاله‌ی گوش خرگوش تحت تاثیر عصاره‌ی گیاه

از مولکول‌های آلسین به این منطقه جذب شده، شدت رنگ ابتدا در اطراف کندروسیت‌ها و پس از مدتی در ECM افزایش می‌یابد (۱۶). با توجه به حضور ترکیبات قندی اسیدی در ECM غضروفی به نظر می‌رسد پاسخ شدید و سریع غضروف در حال ترمیم به آلسین‌بلو و تولوئیدین‌بلو حضور زودتر و بیشتر گلیکوزآمینوگلیکان‌های اسیدی ECM را در جریان رشد تیغه‌ی غضروفی در گروه تیمار با عصاره‌ی یونجه نشان می‌دهد. گیاه یونجه سرشار از ویتامین‌های A, C, E, K و همچنین دارای پروتئین و اسیدهای آمینه لیزین، آرژنین، هیستیدین، آدنین، فنیل آلانین، آسپاراژین و سیستین است. یونجه دارای اسید فسفریک و همچنین منیزیم، آهن و مقدار جزیی ارسنیک و سیلیس است (۷). نتایج تحقیقات متعدد تاثیر ویتامین A, C, E و مشتقات آن‌ها بر رشد غضروف را نشان می‌دهد (۱۷ و ۱۳، ۸، ۵). در بیشتر محیط‌های کشت سلول‌های غضروفی عدم حضور اسید آسکوربیک یا یکی از مشتقات آن، تکثیر، رشد و تمایز سلول‌ها را با شکست مواجه می‌کند؛ هرچند که برخی از مشتقات به علت اثر بهتری که بر روند رشد فیبرهای کلاژن دارند از سایرین موثرترند (۱۸). در تحقیقات آلتاف و همکاران حضور ویتامین C علاوه بر اینکه سبب ثبات و رشد پری کندریوم می‌شود، به شدت فاز تکثیر (Proliferative Phase) را در روند ترمیم غضروف و استخوان کوتاه کرده و سلول‌های بیشتری را در مدت کمتری تولید می‌کند (۱۷). فارل و همکاران دریافتند که داربست کلاژن - گلیکوزآمینوگلیکان (که ویتامین C جز ضروری آن است)، تمایز سلول‌های بنیادی را در طی کندروژنز و استئوژنز پشتیبانی و حمایت می‌کند (۵). لذا شاید مشاهده‌ی بخشی از نتایج التیام بخشی در تحقیق حاضر، هم راستا با یافته‌های فوق، به دلیل حضور این ویتامین در عصاره‌ی یونجه باشد. گالدونس و هالس در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که رتینوئیک باعث تنظیم القای پروتئین GLA ماتریکس (Mgp) و فاکتور ۱۰ تمایزی (Gdf-10) می‌شود که نقش اساسی در کنترل

کندروژنز و مرگ سلولی دارند (۱۹). در نتایج مطالعات شینگلتون و همکارانش در سال ۲۰۰۶، اسید رتینوئیک به همراه Oncostatin اثر عمیقی بر بازسازی ماتریکس خارج سلولی از دست رفته داشت. این دو ترکیب میزان ماتریکس متالوپروتئاز (MMPs) را تنظیم می‌کنند (۲۰). بارنیل در سال ۲۰۰۶ نشان داد که غلظت زیاد ویتامین A از بیان فنوتیپ‌های متفاوت کندروسیت‌های دنده‌ای در محیط کشت جلوگیری و آن‌ها را یکپارچه می‌کند (۲۱). با وجود این، یو و زینگ در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که کاهش تنظیمی سیگنالی TGF- β /Smad سبب نقش ممانعت کننده‌ی ترانس اسید رتینوئیک بر کندروژنز می‌شود و لذا حضور اسید رتینوئیک بدون حضور فاکتورهای تنظیمی می‌تواند نقش تخریبی موثری بر کندروژنز داشته باشد (۲۲). راسویلر و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه‌ی اثر اسید رتینوئیک بر روی غضروف بیان کردند که شدت کلسیم سیتوسلی تنظیم کننده میزان خروج مواد بین سلولی است (۲۳). ویتامین E یک آنتی اکسیدان قوی قابل حل در چربی از دیگر ترکیبات گیاه یونجه است. این ویتامین در دوزهای بالا در زخم‌های سوختگی موثر است. کیم و همکاران اعلام کردند که ویتامین E برای بهبود اسکارهایی که پس از زخم ایجاد می‌شوند، کاملاً موثر است (۲۴). در سال ۲۰۰۲، ولوکا و همکاران نشان دادند که حضور ویتامین E در مکمل‌های غذایی در بیماران با استئوآرتریت باعث کاهش حجم غضروف زانو (که به طور معمول در این بیماران ایجاد می‌شود) نمی‌شود آن‌ها نتیجه گرفتند که حضور ویتامین E مانع تحلیل غضروف می‌شود (۲۵). ویتامین E یک جز ضروری در پوست است. در سال ۲۰۰۶، خوسال و گلدمن اثبات کردند که کرم ویتامین E می‌تواند از حضور اسکار جلوگیری کند یا آن را به شدت کاهش دهد (۲۶). به نظر می‌رسد در تطابق با یافته‌های فوق شاید حداقل قسمتی از اثرات التیام بخشی گیاه یونجه به دلیل حضور ویتامین‌های A یا E باشد که در این گیاه وجود دارد. از آنجاکه نتایج تحقیق

آبی تولوئیدین (افزایش متاکرومازی) و آلسین بلو با pH برابر ۱ و ۲/۵ احتمالاً گویای افزایش حضور گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و لذا افزایش تشکیل ماده زمینه‌ای غضروف و ترمیم و بازسازی (بهبود) غضروف گوش خرگوش می‌باشد. از آنجا که مشاهدات تحقیق حاضر، تحت تاثیر عصاره‌ی کامل گیاه به‌دست آمده‌است، احتمالاً عوامل متعدد موجود در گیاه (علاوه بر ویتامین‌ها) به‌طور توأم بر مشاهدات اخیر موثر بوده‌اند. لذا به‌نظر می‌رسد با انجام مطالعات بیشتر در آینده (تاثیر هر یک از ترکیبات گیاه پس از خالص سازی، زمینه استفاده‌ی مناسب فارماکولوژیک از این گیاه، در ترمیم زخم و بازسازی غضروف و یا در ساخت بیوماتریکس بافت غضروفی، فراهم شود. در این صورت جنبه‌های درمانی حاصل از کاربرد گیاهان دارویی، احتمالاً از عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای صنعتی برخوردار خواهد بود.

حاضر، حاصل تاثیر توأم کلیه ترکیبات موجود در عصاره‌ی گیاه است، برای درک مکانیسم دقیق تاثیرات فوق، پیشنهاد می‌شود در طرح‌های آینده تاثیر التیام بخشی فراکسیون‌های مختلف موجود در عصاره به‌طور جداگانه و خالص شده مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که احتمالاً عصاره‌ی گیاه یونجه در تحقیق حاضر سبب تولید مقادیر بالای گلیکوزآمینوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی در بافت غضروفی در حال ترمیم شده است، به نظر می‌رسد نقش التیام بخشی عصاره‌ی این گیاه بر ترمیم غضروف از طریق افزایش تولید ترکیبات قندی اسیدی و احتمالاً به‌دلیل حضور ویتامین A، C، E و یا مشتقات آن‌ها در این گیاه باشد. همچنین افزایش شدت رنگ در پاسخ به

References

- 1- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surgery*. 1998; 176: 26S-38S.
- 2- Schnapp E, Kragl M, Rubin L, Tanaka EM. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development*. 2005; 132: 3243-53.
- 3- Morrison JI, Loof S, He P, Simon A. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population, *J Cell Biology*. 2006; 172: 433-40.

- 4- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley R. Basic histology: Appleton & lange, MCGrow hill: USA; 2003.
- 5- Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng*. 2006; 12: 459-68.
- 6- Pribitkin EA, Ambro BT, Bloeden E, O'Hara BJ. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft, *Laryngoscope*. 2004. 114; 9 (Part 2): 1-19.
- 7- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, et al. Nature products from plants. CRC Press: USA; 2006.

- 8- Kamrava SK, Farhadi M, Rezvan F, et al. The histological and clinical effects of 630 nanometer and 860 nanometer low-level laser on rabbits' ear punch holes. *Lasers Med Sci. Springer-Verlag London Ltd.* 2008; 24: 949-54.
- 9- Carson FL. *Histotechnology. A self-instructional text.* Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1997.
- 10- Zhang L, Williams M, Poh CF, et al. Toluidine blue staining identifies high-risk primary oral premalignant lesions with poor outcome. *Cancer Res.* 2005; 65: 8017-21.
- 11- Whiteman P. The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes. *Biochem J.* 1973; 131: 343-50.
- 12- Adebawale AO, Cox DS, Liang Z, Eddington ND. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. *J Am Nutr Assoc.* 2000; 3: 37-44.
- 13- Gong H, Wen YE. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. *Exp Eye Res.* 1997; 64: 587-95.
- 14- Volpi N, Maccari F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. *Electrophoresis.* 2002. 23; 4060-6.
- 15- Terry DE, Chopra RK, Ovenden J, Anastassiades TP. Differential use of alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: application to proteoglycans and a highmolecular- weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes. *Anal. Biochem.* 2000. 285; 211-9.
- 16- Ovchinnikov D. Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2003; 16: 171-3.
- 17- Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU, Johnstone B. Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mate.* 2006; 9: 64-9.
- 18- Ibold Y, Lübke C, Pelz S, et al. Effect of different ascorbate supplementations on in vitro cartilage formation in porcine high-density pellet cultures. *Tissue Cell.* 2009; 41: 249-56.
- 19- Galdones E, Hales BF. Retinoic acid receptor gamma-induced misregulation of chondrogenesis in the murine limb bud in vitro. *Toxicol Sci.* 2008; 106: 223-32.
- 20- Shingleton WD, Jones D, Xu X, Cawston TE, Rowan AD. Retinoic acid and oncostatin M combine to promote cartilage degradation via matrix metalloproteinase-13 expression in Bovine but not human chondrocyte. *Rheumatol J.* 2006; 45: 958-965.
- 21- Barnhill JG, Fye CL, Williams DW, Reda DJ, Harris CL, Clegg DO. Chondroitin product selection for the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial. *J Am Pharm Assoc (Wash DC).* 2006; 46: 14-24.
- 22- Yu Z, Xing Y. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF- β /Smad signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 22: 28-38.

- 23- Rasweiler JJ, Cretekos CJ, Behringer RR. Alcian blue staining of cartilage of short-tailed fruit bat (*Carollia perspicillata*). *Cold Spring Harbor protocols*. 2009; 1: 130-41.
- 24- Kim JE, Shklar G. The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. *Periodontol J*. 1983; 54: 305-8.
- 25- Wluka AE, Stuckey S, Brand C, Cicuttini FM. Supplementary vitamin E does not affect the loss of cartilage volume in knee osteoarthritis: a 2 year double blind randomized placebo controlled study. *Rheumatol J*. 2002; 29: 2585-91.
- 26- Khoosal D, Goldman R. Vitamin E for treating children's scars. Does it help reduce scarring. *Can Fam Physician*. 2006; 52: 855-6.

Cartilage Glycosaminoglycans in Wound Healing of the Pinna in Rabbits by *Medicago Sativa* Extract

Rafiei H¹, Khayatzaheh J²

¹Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

²Dept. of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Khayatzaheh J, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.

E-mail: J.khayatzaheh@mshdiau.ac.ir

Received: 9 Jan 2012

Accepted: 9 Jul 2012

Background and Objective: Articular cartilage abnormalities are important factors of skeletal disorders and usually are related to glycosaminoglycans synthesis in the cartilage tissue. Presence of some vitamins, amino acids, and minerals increases cartilage regeneration. In this study, *Medicago sativa* (Alfalfa), which is high in some vitamins, amino acids and minerals, was used for cartilage healing of the pinna in rabbits, and glycosaminoglycans (GAGs) of the extracellular matrix (ECM) were investigated histochemically.

Materials and Methods: Four holes (4-mm in diameter each) were punched in the medial portion of each pinna of 10 New Zealand male rabbits (randomly divided into 2 groups), after shaving the hair and anesthetization by 10% lidocaine (total of 80 holes). The ears of the experimental group were treated by alcoholic extract of *M. sativa*, while the control group was treated by normal saline daily. Samples of regenerating tissue from day 0 through day 50 after the punch were prepared for microscopic studies. A color intensity of Alcian blue in pH 1 for sulfated molecules and in pH 2.5 for carboxylated GAGs and toluidine blue (that has a metachromatic reaction with sulfated GAGs) were considered.

Results: In all 3 histochemical staining methods, an early high-color intensity of cartilage was observed in the treated group compared with the control. Furthermore, the closure of the cartilage hole in the treated group happened faster.

Conclusion: It seems that the *M. sativa* extract, probably because of its vitamin and amino acid composition, increases chondroblasts activity for secretion of carboxylated and sulfated GAGs in ECM, which leads to a faster cartilage wound healing. Therefore, the plant extract provides a good candidate for future studies on its potential role in wound healing and pharmacological applications.

Keywords: *Medicago sativa* (Alfalfa), Wound healing, Pinna Cartilage, Glycosaminoglycan, Rabbit