

## Original Article

# Effect of mesenchymal stem cells, hyaluronic acid and aerobic exercise on the expression of Myonectin and Myogenin genes and the production of CD44 protein in the experimental model of knee osteoarthritis

Tajik M<sup>1</sup>, Azarbajani MA<sup>1\*</sup>, Peeri M<sup>1</sup>, Farzanegi P<sup>2</sup>

1- Department of Sport Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

2- Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, I.R. Iran.

Received: 2022/11/11 | Accepted: 2022/12/5

### Abstract:

**Background:** Knee osteoarthritis is associated with damage to ligaments and skeletal muscles around the knee joint. Since inhibiting of atrophy can help to improve this disease; therefore, this study aimed to determine the effect of mesenchymal stem cell (MSCs), hyaluronic acid (HA) and aerobic exercise on the expression of myonectin and myogenin genes and the production of CD44 protein in the quadriceps muscle tissue of osteoarthritis rats.

**Materials and Methods:** Forty-five adult male rats aged 6-8 weeks were placed in 9 groups of 5 including: healthy control, patient control, MSCs, HA, aerobic exercise, MSCs+HA, exercise+HA, exercise+MSCs and exercise+MSCs+HA. Osteoarthritis was induced surgically. Aerobic exercise was done for 8 weeks, 3 sessions a week and at a speed of 16m/min. MSCs were injected at the rate of  $1 \times 10^6$  cells/kg and HA at a concentration of 10mg/ml. Forty-eight hours after completing the protocol, the quadriceps muscle tissue was isolated and the expression of myonectin and myogenin genes was measured by Real-Time PCR and the expression of CD44 protein was measured by immunohistochemistry method.

**Results:** The gene expression of myonectin, myogenin, and CD44 protein expression was significantly increased in aerobic exercise, HA and MSCs groups alone ( $P=0.001$ ) and CD44 in exercise+HA ( $P=0.024$ ). Also, myogenin in exercise+MSCs group ( $P=0.037$ ) and myonectin in exercise+MSCs, exercise+HA ( $P=0.001$ ) and MSCs+HA ( $P=0.012$ ) groups increased significantly.

**Conclusion:** Aerobic exercise, HA and MSCs alone and exercise+MSCs synergistically led to the inhibition of muscle atrophy by increasing the activity of myokines; but exercise+HA play a role in muscle building in osteoarthritis rats.

**Keywords:** Aerobic exercise, Mesenchymal stem cells, Hyaluronic acid, Myonectin and Myogenin, Osteoarthritis

### \*Corresponding Author

Email: m\_azarbajani@iauctb.ac.ir

Tel: 0098 912 317 2908

Fax: 0098 218 880 3071

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, January, 2023; Vol. 27, No 6, Pages 617-628

Please cite this article as: Tajik M, Azarbajani MA, Peeri M, Farzanegi P. Effect of mesenchymal stem cells, hyaluronic acid and aerobic exercise on the expression of Myonectin and Myogenin genes and the production of CD44 protein in the experimental model of knee osteoarthritis. Feyz 2023; 27(6): 617-28.

# بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هیالورونیک اسید و تمرين هوازی بر بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین و ساخت پروتئین CD44 در مدل تجربی استتوآرتریت زانو

محبوبه تاجیک<sup>۱</sup> ، محمدعلی آذربایجانی<sup>۱\*</sup> ، مقصود پیری<sup>۱</sup> ، پروین فرزانگی<sup>۲</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: استتوآرتریت زانو با آسیب لیگاماتی و عضلات اسکلتی اطراف مفصل زانو همراه است. از آنجایی که مهار آتروفی می‌تواند به بهبود این بیماری کمک کند؛ بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، هیالورونیک اسید (HA) و تمرين هوازی بر بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین و ساخت پروتئین CD44 در بافت عضله چهارسر موش‌های استتوآرتریت شده انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، تعداد ۴۵ سر موش صحرابی نر بالغ ۶-۸ هفته‌ای در نه گروه پنجم تابی شامل: کنترل سالم، کنترل بیمار، HA، MSCs، HA + MSCs، HA + MSCs + تمرين + HA + MSCs + تمرين HA + قرار گرفتند. استتوآرتریت به روش جراحی القا شد. تمرين هوازی به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته و با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه صورت گرفت. تزریق MSCs به میزان ۱۰<sup>۶</sup> سلول بر کیلوگرم و HA با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد. ۴۸ ساعت پس از اتمام پروتکل، بافت عضله چهارسر جدا گردید و بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین با روش Real-Time PCR و بیان پروتئین CD44 به روش ایمونوستشیمی اندازه‌گیری شد.

نتایج: بیان ژن‌های میونکتین، میوژنین و بیان پروتئین CD44 در گروه‌های تمرين هوازی، HA و MSCs به تهایی ( $P=0.001$ ) و CD44 در گروه HA + تمرين + افزایش معنی داری داشت ( $P=0.024$ ). همچنین میوژنین در گروه تمرين + MSCs ( $P=0.037$ ) و میونکتین در گروه‌های تمرين + HA + MSCs ( $P=0.012$ ) و HA+MSCs ( $P=0.001$ ) نیز افزایش معنی داری یافت.

نتیجه‌گیری: تمرين هوازی، HA و MSCs به تهایی و تمرين + MSCs به طور سینزیستی با افزایش فعالیت مایوکین‌ها به مهار آتروفی عضله منجر شدند؛ ولی تمرين + HA در عضله‌سازی موش‌های استتوآرتریت شده نفع دارند.

**واژگان کلیدی:** تمرين هوازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هیالورونیک اسید، میونکتین و میوژنین، استتوآرتریت  
\_\_\_\_\_ دوماًنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۴۰۱، صفحات ۶۲۸-۶۱۷

## مقدمه

بر پایه تحقیقات، میوژنین عضوی از خانواده MRF (myogenic regulatory factors) و یک فاکتور basic helix-loop-helix regulatory factors نسخه‌برداری ویژه عضله و بیانگر تمایز سلول‌های ماهواره‌ای است و مطالعات اخیر به ارتباط بین میوژنین و بقای میوفیبریل‌ها اشاره کرده‌اند [۸]. میونکتین، فاکتور دیگری است که در افزایش توده عضلانی نقش دارد [۹]؛ بنابراین ممکن است تحلیل عضلانی با اختلال در بازسازی عضلات همراه باشد [۶]. چندین عامل بیوشیمیایی برای پاتوژن استتوآرتریت در نظر گرفته شده است. CD44 به عنوان پروتئین باندشونده با اسیدهیالورونیک در سطح سلول شناخته می‌شود که بیان آن با آسیب پیشرونده مفصل زانو همراه است [۱۰]. علاوه‌بر عوامل بیوشیمیایی، چندین عامل بیومکانیکی نظری ضعف عضلانی هم در استتوآرتریت نقش دارند [۱۱] و بررسی مکانیسم‌های سلولی - مولکولی بافت عضلانی می‌تواند در راستای درمان این بیماری نقش مهمی ایفا کند. چراکه درد و التهاب ناشی از KOA با کاهش فعالیت و مهار عصبی - عضلانی همراه است که این عوامل می‌توانند در کاهش عملکرد عضله نقش داشته باشند و به تبع آن به کاهش تحرك، ضعف و ناتوانی این افراد منجر گردند [۱۲]. ویژگی‌های التهابی KOA به تغییرات عصبی، مانند مهار رفلکس پیش‌سیناپسی، کاهش فعال شدن

استتوآرتریت زانو (Knee osteoarthritis-KOA) شایع‌ترین بیماری مفصلی است که رباط‌ها و بافت‌های اطراف مفصل زانو از جمله عضلات اسکلتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]. در این بیماران، افزایش التهاب، کاهش توانایی حرکتی و عدم تحرك به‌دبیال بروز درد، به آتروفی سلول‌های عضلانی [۲-۴] و افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با آتروفی عضلانی نظری آتروژن-۱ Muscle RING-finger (Atrogina-1)، MuRF-1 (protein-1)، میوستاتین، ایترولوکین-۱ بتا (IL-1 $\beta$ )، عامل نکروزدهنده توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) و کاهش MyoD میوژنین و میونکتین در بافت عضله موش‌های صحرابی منجر می‌گردد [۶.۵]. از طرفی، ضعف عضله در بیماران استتوآرتریتی با آتروفی تارهای عضلانی همراه است [۷].

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

\* نشانه نویسنده مسئول؛

تهران، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی  
تلفن: ۰۹۱۳۱۷۳۹۰۸ - ۰۲۱۸۸۰۳۰۷۱

پست الکترونیک: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۹/۱۴ تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۰

احتمال وجود دارد که تعامل این عوامل به تقویت، کاهش یا تعدیل اثرات آنها منجر گردد. با توجه به مطالعات اندک و متناقض و بروز بالای KOA و تغییرات عضلانی مرتبط و اهمیت توده عضلانی در این بیماری، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تمرین هوایی، تزریق HA و MSCs بر تغییرات بیان ژن‌های میونکتین و میوزین به همراه ساخت پروتئین CD44 در بافت عضله چهارسر موش‌های صحرایی مبتلا به OA انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه دارای کد اخلاق IR.IAU.REC.1398.33 می‌باشد و تحت نظر کمیته اخلاق واحد دانشگاهی ساری انجام شد. در پژوهش تجربی حاضر، تعداد ۴۵ سر موش صحرایی نر سالم بالغ ۸-۶ هفته‌ای نژاد ویستار، با مانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم خردباری گردید و به حیوان‌خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتقال داده شد. به منظور سازگاری با محیط جدید، موش‌های صحرایی به مدت یک هفته در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. مطابق با مطالعات انجام شده [۲]، حیوانات به صورت تصادفی در ۸ گروه پنج تایی شامل: ۱) کنترل بیمار استئوآرتیتی، ۲) بیمار + MSCs، ۳) بیمار + HA، ۴) بیمار + تمرین هوایی، ۵) بیمار + MSCs + HA، ۶) بیمار + تمرین هوایی + HA، ۷) بیمار + تمرین هوایی + MSCs + HA و ۸) بیمار + تمرین هوایی + MSCs + HA فرار گرفتند. برای بررسی اثرات استئوآرتیت بر متغیرهای تحقیق ۵ سر موش صحرایی نیز در گروه کنترل سالم قرار گرفت. طی انجام مراحل پژوهش، اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید که به دلیل گستردگی کار، مطالعه به صورت تیمی انجام شد. به گونه‌ای که موش‌های صحرایی در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی - تاریکی  $12 \pm 1$  ساعته، رطوبت نسبی  $50 \pm 5$  درصد، به همراه تهویه مناسب و در قفس‌هایی با قابلیت اتوکلاو نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد آزادانه در اختیار آنان قرار گرفت.

القای استئوآرتیت زانو: متعاقب یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، ۴۰ سر موش صحرایی به روش جراحی مورد القای استئوآرتیت قرار گرفتند. برای القای مدل، ابتدا موش‌های صحرایی به وسیله ترکیب کتامین ( $30-50$  میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلazin ( $3-5$  میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهود شدند. زانو به کمک الکل درصد ضدغوفونی گردید و موهای ناحیه مفصل با تیغ تراشیده شد و به وسیله تیغ، یک ناحیه ۱ سانتی‌متری در قسمت داخلی مفصل زانو ایجاد شد. پس از کنار زدن پوست، لیگامان داخلی جانبی، کنار زده شد تا مینیسک داخلی مشاهده شود. سپس، با یک برش به صورت

نورون حرکتی آلفا، آتروفی و کاهش قدرت عضلانی منجر می‌شود. عضله چهارسر ران از عضلاتی است که بیشترین آسیب را در KOA دارد [۱] و ضعف آن تخریب غضروف را تسريع می‌کند [۱۱]. همچنین، محققان عنوان نموده‌اند که مکانیسم اصلی سلولی مولکولی آتروفی عضلانی متعاقب KOA به کاهش سنتز پروتئین، افزایش پروتولیز و نقص بازسازی بافت عضلانی با اختلال در عملکرد سلول‌های ماهواره‌ای وابسته است [۶]. از سویی، سلول‌های تک‌هسته‌ای و بیشگی‌هایی نظری قابلیت نوسازی و تمایز دارند که در پاسخ به سیگنال‌های هوموستازی سلول عضلانی، سلول‌های ماهواره‌ای می‌توانند فعال شوند و با تکثیر و تمایز مایوژنیک هسته‌ای، هسته‌های عضلانی را به وجود آورند [۱۳]. مطالعات، کاهش بیان ژن میوزین را به عنوان شاخص فعال‌شدن سلول‌های ماهواره‌ای در استئوآرتیت گزارش کرده‌اند [۱۴]. با تحلیل سلول‌های بنیادی در استئوآرتیت، نیاز میر این بیماران به روش‌های درمانی بهتر جهت ترمیم و یا مهار تخریب بافت‌های اطراف مفصل احساس می‌شود. در این راستا، سلول‌های بنیادی مژانشیمی (Mesenchymal stem cell-MSCs) علاوه‌بر خاصیت ضدآپوپتوزی و تسريع فرآیند ترمیم [۱۵]، می‌توانند منبع سلولی امیدوارکننده‌ای برای تولید بافت عضلانی جدید ارائه دهند [۱۶]. نتایج مطالعات پیشین حاکی از این است که MSCs با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب تعديل ردوکس سلولی و بهبود متابولیسم بافت عضلانی می‌گردد [۱۷]. همچنین، گزارش شده است که تکثیر سلولی مهم ترین مرحله بازسازی عضله پس از آسیب است و اسیدهیالورونیک (Hyaluronic acid-HA) برای جداشدن فیبروبلاست‌ها از ماتریکس خارج سلولی و میتوز ضرورت دارد. از طرفی، افزایش سطوح سیتوکین‌های پیش‌التهابی و پروتئازها در استئوآرتیت موجب کاهش سطوح HA می‌گردد [۱۸]. تمرین هوایی نیز با افزایش آستانه درد و توانایی حرکتی [۳، ۲]، می‌تواند با حفظ توده عضلانی به افزایش قدرت منجر شود [۱۹]. در این راستا، مطالعات نشان دادند که تمرینات هوایی بیان ژن MuRF-1 از کاهش حجم عضلات جوندگان جلوگیری می‌کند [۲۰]. نتایج مطالعه رسولی و همکاران نشان داد که تمرین هوایی و HA می‌تواند با کاهش بیان ژن MuRF-1 در عضله دوقلوی موش‌های استئوآرتیتی شده به مهار آتروفی عضله منجر شود. با این حال، HA به تنهایی روی عضله سازی اثر معنی‌داری نداشت [۲۱]. این محققان در مطالعه دیگری با بررسی اثرات تمرین هوایی و MSCs بر بیان ژن میوزین در عضله دوقلوی موش‌های استئوآرتیتی شده گزارش کردند که تمرین هوایی + MSCs اثرات مثبت بیشتری در مقایسه با تمرین هوایی و MSCs به تنهایی داشت [۱۴]. بنابراین، این

رسید که جزئیات آن در جدول شماره ۱ ارائه شده است. گفتنی است که برنامه گرم کردن و سرد کردن در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین به مدت ۵ دقیقه لحاظ گردید و این زمان به پروتکل اصلی تمرین افزوده شد [۲۳].

ناقص، پارگی و آسیب در مینیسک ایجاد شد. درنهایت، ناحیه کپسول مفصلی به روش استریل بخیه زده شد [۲۲].

**پروتکل تمرینی:** ۳ هفته پس از جراحی، برنامه اصلی تمرین هوایی با ۳۰ دقیقه دویدن بر نوار گردان بدون شب با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه در هفته اول آغاز شد و به تدریج در هفته هشتم به ۵۰ دقیقه

جدول شماره ۱- پروتکل تمرینی در طول ۸ هفته

تکرار (روز در هفته)	مدت تمرین در هر جلسه (دقیقه)	سرعت (متر / دقیقه)	سازگاری	عوامل تمرینی
۳	۳	۱۶	۱۶	۸ هفته
۳	۳	۵۰	۱۶	۷ هفته
۳	۳	۵۰	۱۶	۶ هفته
۳	۳	۳۰	۱۶	۵ هفته
۳	۳	۳۰	۱۶	۴ هفته
۳	۳	۳۰	۱۶	۳ هفته
۳	۳	۳۰	۱۶	۲ هفته
۳	۳	۳۰	۱۶	۱ هفته

QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. سپس، به مخلوط هموژن شده ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. در ادامه، محصول در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (شرکت Eppendorff) شد. قسمت محتوی RNA برداشته شد و با ایزوپروپانول به نسبت ۱ به ۰/۵ مخلوط گردید و سپس در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه رها شد و مجدداً در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پلت حاوی RNA در اتانول شسته شد و در ۲۰ میکرولیتر آب RNAs-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸-۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعريف شد. سنتز cDNA با استفاده از Thermo fisher pروتکل شرکت سازنده انجام یافت. از آنجایی که برای سنتز cDNA باید مقدار RNA هر یک از نمونهها برابر و یکسان باشد، بنابراین حجم مشخصی از نمونه با توجه به غلظت محلول RNA برداشت شد. مطابق با پروتکل کیت، پس از افزودن حجم معینی از RNA که عاری از DNA است، پرایمر هگزامر تصادفی به هر نمونه اضافه گشت. برای dNTP با غلظت ۱ میلی مولار، آنزیم ترانس کرپتاز معکوس ۲۰۰ واحد و بافر ۵X استفاده شد. در نهایت، نمونهها برای سنتز cDNA در دستگاه PCR قرار گرفتند. سپس cDNA سنتز شده به عنوان الگویی برای واکنش Real Time-PCR و بررسی میزان پیان ژن‌ها استفاده شد.

Real Time-PCR: جهت اندازه گیری سطوح پیان ژن میونکتین و میوژنین بافت عضله چهارسر از روش Real Time-PCR استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از SYBER Green PCR master mix Applied (Real Time-PCR Biosystems Step One, USA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. در مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل

MSCs:MSCs مشتق از مغز استخوان از شرکت هیستوژنوتک (تهران، ایران) خریداری شد. MSCs از موش‌های صحرایی نر سالم نژاد ویستان با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استخراج شد. زمانی خریداری شد که به بیش از ۱۰ درصد خلوص در پاساژ ۴ رسیده بود. MSCs با غلظت  $1 \times 10^6$  سلول بر کیلو گرم به صورت داخل مفصلی به زانوی جراحی شده موش‌های گروه‌های سلول درمانی، تزریق شد [۱۹]. تزریق HA: گروه‌های Hyalgan® HA sodium hyaluronate; Fidia Farmaceutici S.p.A., (AbanoTerme, Italy) را در دوره ریکاوری و به صورت تزریق درون مفصلی دریافت نمودند [۲۴].

استخراج بافت: پس از اتمام پژوهش، تمامی حیوانات با رعایت شرایط مشابه و به دنبال ۱۲-۱۴ ساعت ناشتاپی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات، با استفاده از ترکیب کتابین (۶۰ میلی گرم بر کیلو گرم) و زایلазین (۵ میلی گرم بر کیلو گرم) بیوهش و قربانی شدند. سپس، عضله چهارسر زانوی جراحی شده به دقت استخراج شد و پس از شستشو با آب مقطر در دمای ۷۰ درجه فریز گردید. بافت فریز شده پس از پودرشدن در نیتروژن مایع، در بافر فسفات سالین (PBS, PH=7.4) هموژنیزه شد و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و در دمای -۸۰ درجه و به منظور استفاده در مرحله بعدی پژوهش، منجمد شد.

اندازه گیری بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین عضلانی استخراج RNA و سنتز cDNA: یک روز قبل از نمونه برداری، پروتکل تمرینی پایان یافت. استخراج RNA کل از عضله چهارسر موش‌های صحرایی با استفاده از کیت QIAzol (Qiagen, Germany) Lysis Reagent به روش دستی و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. بدین منظور، ۵۰ میلی گرم بافت عضله چهارسر برای استخراج RNA کل به نسبت ۱ به ۱۰ در

دما بین استفاده شده شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه با تکرار ۴۰ چرخه بود. نمودار ذوب، جهت بررسی صحت واکنش‌ها و نمودار استاندارد برای بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم شد و با استفاده از نسبت بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین به ژن مرجع محاسبه گردید. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن‌های مذکور از فرمول  $\Delta\Delta^{CT}$  ۲ استفاده شد.

۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر آغازگر جلویی، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی، ۷ میکرولیتر آب Depc (Diethylpyrocarbonate) و ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین بود، هر واکنش به صورت تکراری (Duplicate) صورت گرفت. طراحی آغازگرها مطابق با اطلاعات بانک ژنی NBCI و توسط شرکت پیشگام (Iran) صورت گرفت. در جدول شماره ۲ توالی و طول محصول استفاده شده ارائه شده است. از GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. برنامه

جدول شماره ۲- توالی و طول محصول آغازگرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی آغازگر (۵'-۳')	طول محصول (جفت باز)
GAPDH	5'-GGATGAGAGCAAGAGAGAG-3' 5'-ATGGTATTGGAGAGAGAAGGAGGG-3' برگشتی	۱۵۱
میونکتین	5'-GGC AAG CTC TGG AAA GCA AGG-3' 5'-AGA GCA ACC CAG GAG TCA TTC AG-3' برگشتی	۱۵۹
میوژنین	5'-CGCAGGCTCAAGAAAGTGAA-3' 5'-GTGCTCAATGTACTGGATGG-3' برگشتی	۱۲۰

روش‌های آماری: برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون‌های آماری Shapiro-Wilk (جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها)، Independent samples t-test (جهت تعیین اثر القای OA بر پیامدهای مورد مطالعه در دو گروه بیمار استئوآرتیتی و کنترل سالم)، Three-way analyze of variance (برای تعیین اثر تعاملی تمرین هوازی، هیالورونیک اسید و سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تأثیر جداگانه هر یک بر شاخص‌های مورد مطالعه) و آزمون تحقیقی Bonferroni (جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی) استفاده شد. کلیه نتایج به صورت Mean  $\pm$  SEM بیان شد و در سطح معنی‌داری  $P \leq 0.05$  با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### نتایج

نتایج بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین: نتایج آزمون Shapiro-Wilk حاکی از توزیع طبیعی داده‌ها بود. نتایج آزمون t مستقل در جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که القای استئوآرتیت زانو، بیان ژن‌های میونکتین و میوژنین بافت عضله چهارسر را به طور معنی‌داری کاهش داد ( $P = 0.001$ ). جهت درک بهتر، نمودارهای Three-way analyze of variance نشان داد که تمرین ( $\mu = 0.723$ ) شماره‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. به علاوه، نتایج آزمون  $F = 104/368$ ،  $P = 0.001$ ، MSCs ( $F = 0.642$ )،  $P = 0.001$  و HA ( $F = 71/939$ )،  $P = 0.001$  افزایش بیان ژنی میونکتین و تمرین ( $\mu = 0.620$ )،  $P = 0.001$

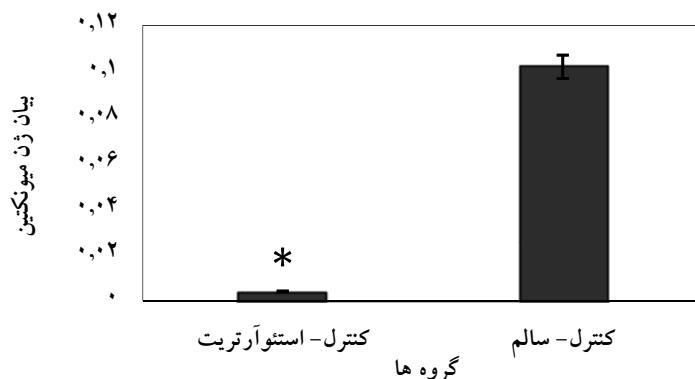
اندازه‌گیری بیان پروتئین CD44: جهت اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین CD44 از روش ایمونوھیستوشیمی استفاده شد. در ابتدا نمونه‌ها با قرارگیری در فرمالین ثبت شدند. پس از دپارافینه کردن، بافت‌ها در محلول TBS به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس مقدار ۳ لاندا تریتون ۱۰۰X به ۹۹۷ لاندا PBS اضافه شد و تریتون ۰/۳ درصد به دست آمد و نمونه‌ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شستشو داده شدند. بهمنظور بازیابی آنتی ژن بر روی نمونه‌ها اسید کلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه و برای خشی‌سازی اسید بافر بورات به مدت ۵ دقیقه اضافه گردید و مجدداً نمونه‌ها با PBS شسته شدند. پس از استفاده از تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه بهمنظور نفوذپذیر کردن غشای سلول‌ها، محلول دویاره با PBS شستشو داده شد. در ادامه، سرمه بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه اضافه گردید. سپس آنتی بادی اولیه ریقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به نمونه اضافه شد و یکشب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس بافت‌ها ۴ بار در PBS شستشو داده شدند و به نمونه آنتی بادی ثانویه ضد موش با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه گردیدند. سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انتقال نمونه‌ها از انکوباتور به اتاق تاریک و شستشو برای ۳ بار، به آن‌ها Z ده DAPI زده شد. در مرحله آخر، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Labomed, USA) و با لنز ۴۰۰ برای تأیید مارکرها مورد بررسی قرار گرفتند. گفتنی است که سطوح CD44 بر حسب درصد در بافت عضله و توسط متخصص پاتولوژی اندازه‌گیری شد.

$F=6/913, P=0/012, \mu=0/147$  MSCs+HA و  $F=27/808$  بهطور سینترزیستی به افزایش معنی دار بیان ژن میونکتین منجر شد. در حالی که افزایش سطوح بیان ژن میوزنین تنها در گروه تمرین + MSCs  $F=4/648, P=0/037, \mu=0/104$  معنی دار بود. با این حال، تمرین  $P=0/028, \mu=0/028$  (MSCs + HA + HA) بر بیان ژن میونکتین و همچنین تعامل تمرین + HA  $F=1/133, \mu=0/022$  (MSCs + HA)  $F=1/246, P=0/030, \mu=0/022$  (MSCs + HA) و تمرین  $P=0/087, \mu=0/087$  (MSCs + HA)  $F=3/835, P=0/057$  بر بیان ژن میوزنین در بافت عضله چهارسر موش های صحرایی مبتلا به KOA معنی دار نبود (نمودارهای شماره های ۳ و ۴).

( $F=48/109, P=0/001, \mu=0/546$ ) MSCs ( $F=65/394, \mu=0/210$ ) HA ( $F=10/651, P=0/002$ ) بر افزایش بیان ژن میوزنین معنی دار بودند. با توجه به این که عامل تمرین در دو سطح انجام تمرین و عدم تمرین، تزریق HA و سلول درمانی نیز در دو سطح تزریق و عدم تزریق در نظر گرفته شد؛ بنابراین، نتایج آزمون Bonferroni نشان داد که بیان ژن میونکتین به طور معنی داری در گروه های تمرین، HA به تنهایی ( $P=0/001$ ) و همچنین بیان ژن میوزنین در گروه های TMRN ( $P=0/001$ ) و HA ( $P=0/002$ ) به تنهایی بیشتر از گروه کنترل بیمار بود. در گروه های تیمار ترکیبی، تعامل تمرین + HA ( $P=0/001, \mu=0/001$ )، تمرین + MSCs ( $F=16/410, P=0/001, \mu=0/010$ )، تمرین +

جدول شماره ۳- نتایج آزمون t مستقل بر بیان ژن های میونکتین، میوزنین

P	t	df	$\bar{X} \pm SD$	گروه	شاخص
0/001	5/48	10	$0/001 \pm 0/004$	استئوآرتربیت	Myonectin
			$0/043 \pm 0/102$	سالم	
0/001	12/81	10	$0/003 \pm 0/006$	استئوآرتربیت	Myogenin
			$0/015 \pm 0/091$	سالم	



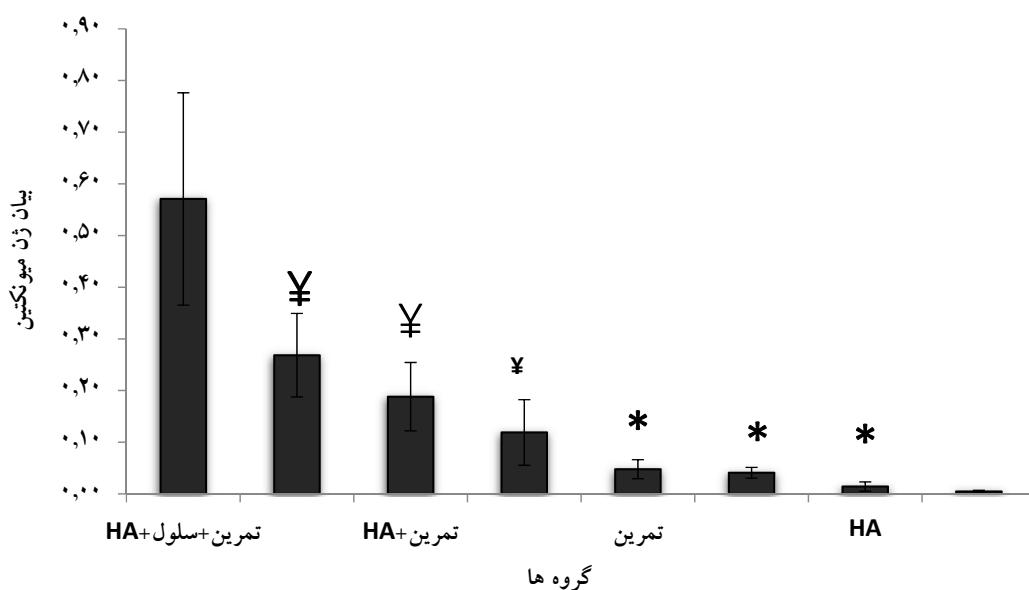
نمودار شماره ۱- مقایسه بیان ژن میونکتین در گروه کنترل سالم و بیمار

\* نشانه کاهش معنی دار بیان ژن مذکور نسبت به گروه کنترل سالم



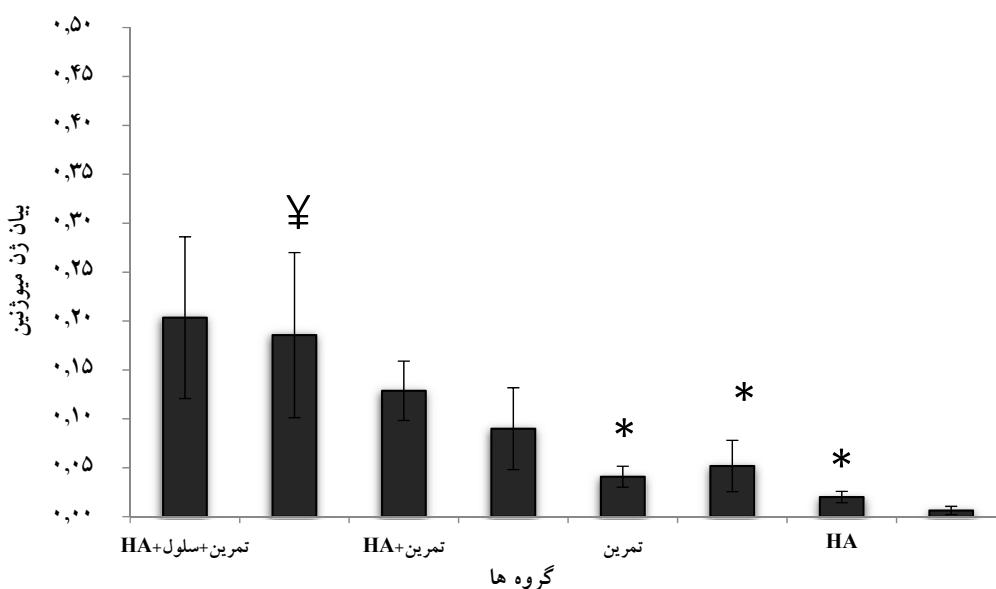
نمودار شماره ۲- مقایسه بیان ژن میوزنین در گروه کنترل سالم و بیمار

\* نشانه کاهش معنی دار بیان ژن مذکور نسبت به گروه کنترل سالم



نمودار شماره ۳- تغییرات بیان ژنی میونکتین در گروه‌های مختلف موردمطالعه در بافت عضله چهارسر موش‌های صحرایی. اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

\* نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه KOA و ¥ نشانه اثر تعاملی معنی دار بر افزایش بیان ژن میونکتین



نمودار شماره ۴- تغییرات بیان ژنی میوژنین در گروه‌های مختلف موردمطالعه در بافت عضله چهارسر موش‌های صحرایی. اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

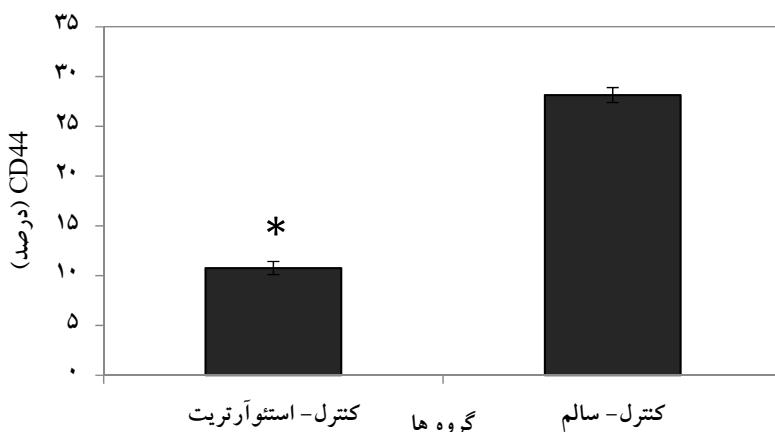
\* نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه KOA و ¥ نشانه اثر تعاملی معنی دار بر افزایش بیان ژن میوژنین

$P=0.001$ ,  $\mu=0.862$ ,  $F=913/749$  و HA ( $P=0.001$ ,  $\mu=0.001$ ,  $F=250/757$ ) بر افزایش سطوح این پروتئین معنی دار بود. با توجه به این که عامل تمرین در دو سطح انجام تمرین و عدم تمرین، تزریق HA و سلول درمانی نیز در دو سطح تزریق و عدم تزریق در نظر گرفته شد؛ بنابراین، نتایج آزمون Bonferroni نشان داد که بیان CD44 به طور معنی داری در گروه‌های تمرین، MSCs و HA

نتایج بیان پروتئین CD44: نتایج آزمون t مستقل در جدول شماره ۴ نشان داد که در اثر القای استئوا آرتیت، بیان CD44 در بافت عضله چهارسر به طور معنی داری کاهش یافت ( $P=0.001$ ). جهت درک بهتر نمودار شماره ۵ ارائه شده است. نتایج آزمون Three-way analyze of variance نیز نشان داد که اثر تمرین MSCs ( $F=1356/970$ ,  $P=0.001$ ,  $\mu=0.971$ )

تمرین + MSCs ( $F=0.672$ ,  $P=0.417$ ,  $\mu=0.017$ ) اثر تعاملی معنی داری بر بیان CD44 نداشتند. تعامل HA + MSCs ( $F=0.383$ ,  $P=0.778$ ,  $\mu=0.019$ ) و تمرین + HA+MSCs ( $F=0.535$ ,  $P=0.391$ ,  $\mu=0.010$ ) نیز اثر معنی داری بر بیان CD44 نداشت (نمودار شماره ۵). تغییرات بیان این پروتئین با رنگ آمیزی ایمونوہیستوشیمی توسط میکروسکوپ فلورسنت در گروه های مختلف مورد مطالعه در شکل شماره ۱ ارائه شده است.

به تنهایی بیشتر از گروه کنترل بیمار بود ( $P=0.001$ ). تعامل تمرین CD44 + HA ( $F=5.518$ ,  $P=0.024$ ,  $\mu=0.121$ ) موجب افزایش CD44 شد، با وجودی که هم تمرین و هم HA در مقایسه با گروه کنترل موجب افزایش قابل توجه بیان این پروتئین شدند؛ بنابراین هم زمانی تمرین و HA توانست بیشتر از اثر تک تک هر یک بیان CD44 را افزایش دهد. به گونه ای که اثر تمرین و HA بر میزان بیان CD44 در گروه تمرین اثر آگونیستی داشت. با وجودی که بیان CD44 در گروه تمرین بیشتر از گروه تمرین و نیز MSCs به تنهایی بود، اما

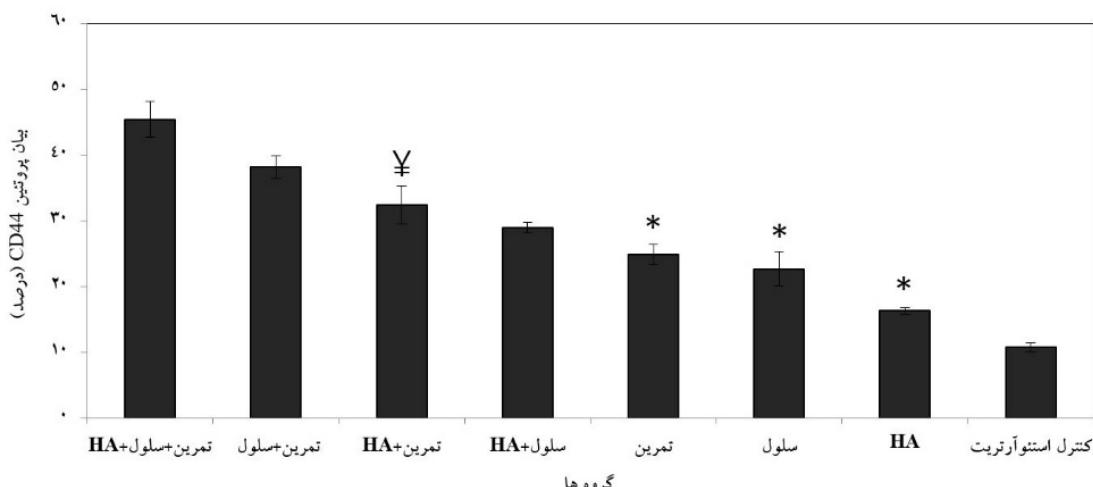


نمودار شماره ۵- مقایسه بیان پروتئین CD44 در گروه کنترل سالم و بیمار

\* نشانه کاهش معنی دار بیان CD44 نسبت به گروه کنترل سالم

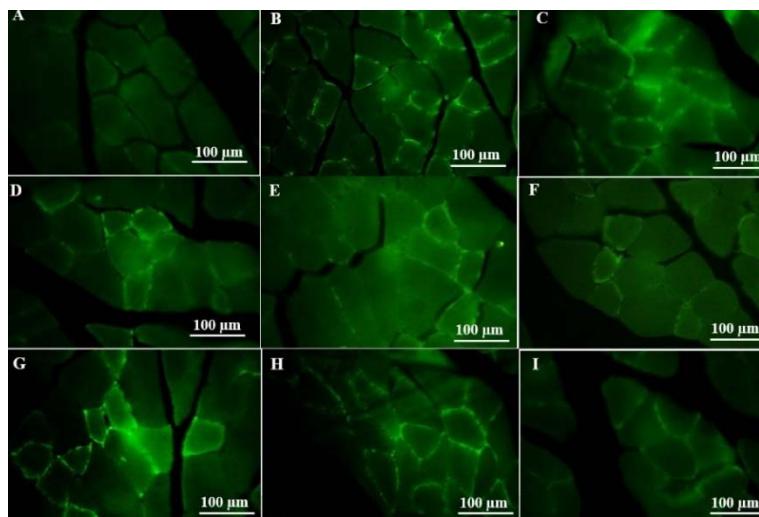
جدول شماره ۴- نتایج آزمون  $t$  مستقل بر بیان پروتئین CD44

شاخص	گروه	میانگین	انحراف استادارد	df	$t$	$P$
CD44	استثنآرتیت سالم	۱۰/۷۷	۰/۶۶	۱۰	۴۲/۲۱	۰/۰۰۱



نمودار شماره ۶- تغییرات بیان پروتئین CD44 در گروه های مختلف مورد مطالعه در بافت عضله چهارسر موش های صحرابی. اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

(\*) نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه KOA و ¥ نشانه اثر تعاملی معنی دار بر افزایش بیان CD44.



شکل شماره ۱- بیان پروتئین CD44 در بافت عضله چهارسر با رنگ آمیزی ایمونوھیستوشیمی و بزرگنمایی  $\times 400$  در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. A: گروه کنترل بیمار B: گروه تمرین هوایی + سلول درمانی C: گروه تمرین هوایی + هیالورونیک اسید + سلول درمانی D: گروه سلول درمانی E: گروه هیالورونیک اسید + سلول درمانی F: گروه تمرین هوایی G: گروه تمرین هوایی H: گروه کنترل سالم I: گروه هیالورونیک اسید.

این مایوکین‌ها را می‌توان به عنوان اهداف درمانی در نظر گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوایی، تزریق HA و MSCs به تهابی بیان ژن‌های میونکتین، میوژنین و بیان پروتئین CD44 را به طور معنی‌داری در عضله چهارسر موش‌های صحرایی مدل KOA افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای همسو با نتایج پژوهش حاضر، بیان ژن و پروتئین میونکتین عضلانی، متعاقب تمرینات هوایی در موش‌های صحرایی افزایش یافت [۲۷]. در مطالعه‌ای دیگر، تزریق HA از طریق گیرنده CD44 به بازسازی میسیک بیماران مبتلا به استئوآرتربیت زانو منجر شد [۲۸]. رسولی و همکاران نیز با بررسی اثر یک دوره تمرین هوایی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته و تزریق درون‌مفصلی MSCs با غلظت  $10^6$  سلول بر کیلوگرم بیان کردند که بیان ژن‌های Pax7 و میوژنین در عضله دوقلوی موش‌های صحرایی مبتلا به KOA افزایش یافت [۱۴]. محققان در پژوهش دیگری بیان کردند که تمرین هوایی به تهابی می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های MyoD و MuRF-1 و درنتجه مهار آتروفی، در بهبود عضله‌سازی موش‌های مبتلا به KOA نقش مهمی را ایفا کند؛ با این حال، تزریق HA به رغم داشتن پتانسیل مهار آتروفی با کاهش بیان ژن MuRF-1، تغییری در بیان MyoD و عضله‌زاپی + ایجاد نکرد [۲۱]. همچنین در مطالعه حاضر، تعامل تمرین هوایی + HA بر افزایش بیان پروتئین CD44 معنی‌دار بود. در مطالعه‌ای همسو با پژوهش حاضر، حق‌جو و همکاران گزارش کردند که به تهابی اثر معنی‌داری بر استئوکلینین و آکالین فسفاتاز بافت استخوان در موش‌های مبتلا به KOA نداشت؛ ولی، تعامل تمرین هوایی + HA به افزایش این دو متغیر منجر گردید که در تضاد با

## بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات تمرین هوایی همراه با تزریق داخل‌مفصلی HA و MSCs بر بیان ژن‌های میونکتین، میوژنین و میزان بیان پروتئین CD44 در بافت عضله چهارسر موش‌های صحرایی مدل KOA انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ایجاد مدل استئوآرتربیتی با کاهش بیان ژن‌های میونکتین، میوژنین و بیان پروتئین CD44 در بافت عضله چهارسر همراه شد. با توجه به مطالعات انجام شده، در اثر بروز استئوآرتربیت میزان درد، افزایش [۲] و بهدلیل کاهش حرکت [۳]، فشار مکانیکی لازم برای تحريك مسیرهای سنتز پروتئین در عضله کاهش می‌یابد [۲۵]. این یافته با مطالعات قبلی در این زمینه [۱۴، ۱۰، ۶] همسو است. ممکن است کاهش بیان میوژنین در عضله حیوانات استئوآرتربیتی شده تاحدودی مکانیسم‌های دخیل در آتروفی عضلانی ناشی از استئوآرتربیت را توضیح دهد. علاوه بر این، آتروفی عضلانی با افزایش مزمن سیتوکین‌های التهابی همراه است و ضعف عضله در استئوآرتربیت بیانگر عدم تعادل در سنتز پروتئین میوفیبریلار و پروتئولیز است. در شرایط طبیعی سلول‌های بنیادی میوژنیک در پاسخ به آسیب عضله، توانایی بازسازی را به عضلات اسکلتی بالغ ارائه می‌دهند [۲۶]. حضور میوژنین به منظور فعالسازی مؤثر ژن‌های موردنیاز جهت تمایز نهایی میوبلاست‌ها و سنتز بیشتر آن‌ها به میوفیبرهای موجود برای ترمیم عضله ضرورت دارد. چراکه در غیاب این مایوکین، عوامل تنظیمی نظیر MyoD به دلیل اختلال در تمایز سلول‌های ماهواره‌ای، قادر به عضله‌سازی نیستند [۶]. با توجه به نتایج این پژوهش و نیز پاتولوژی ضعف عضلانی در استئوآرتربیت،

میوزنیک در عضلات آسیب دیده و تحریک مهاجرت سلول‌های ماهواره‌ای را فراهم می‌کند [۳۱]. به نظر می‌رسد تغییرات مایوکین‌ها متعاقب تمرينات استقامتی وابسته به طول دوره تمرين باشد؛ به گونه‌ای که ۶ هفته، ۳ ماه و ۱۲ ماه تمرين ورزشی موجب افزایش سنتز پروتئین‌های عضلانی، فعال شدن مسیرهای هایپرترووفی و بهبود متابولیسم استخوان در بیماران پس از تشخیص OA شد [۳۲]. همچنین، تمرينات ورزشی و MSCs به طور سینزیستی از مسیرهای مشترک AKT، mTOR/PI3K/AMPK، MRFs، MyoD، میوزنیک، MRF4 و فعال‌سازی سنتز پروتئین و افزایش بیان پروتئین‌های تنظیم‌کننده میوزنیک (MRFs) مانند MYF5، MyoD، MRF4 و MRF5 از مسیر افزایش بیان پروتئین PAX7 موجب فعال‌سازی ایتنگرین‌هایی همچون CD44 و CD34 سطح غشای سلول می‌شود [۳۳، ۳۴]. و این امر به تمایز میوزنیک در سلول منجر می‌گردد [۳۵]. به طوری که در مطالعات پیشین، تمرين هوایی + MSCs موجب افزایش Beclin-1، mTOR و mTOR تعديل 155 Mir-155 در بافت غضروف موش‌های صحرایی مبتلا به KOA گردید [۳۵]. ممکن است تعامل تمرين هوایی + MSCs در سیتوکین‌ها کمتر از مایوکین‌ها تحت تأثیر قرار بگیرد. به طوری که مطالعه اسدی و همکاران نشان داد که تمرين هوایی و MSCs به تنهایی موجب افزایش IL-10 و TNF- $\alpha$  کاهش گردید؛ ولی این دو مداخله اثر تعاملی نداشتند [۳۶]. تعامل تمرين هوایی + HA + MSCs در این زمینه مطالعات محدودی وجود دارد. با این حال، مطالعات پیشین اثر سینزیستی این سه مداخله را در فعال‌سازی استنبولاست غضروف در موش‌های صحرایی مبتلا به KOA نشان داده‌اند که در تضاد با این یافته است. معنی دار نبودن تأثیر تعاملی آن‌ها را می‌توان به زمان تزریق MSCs، نوع و تعداد سلول‌ها، روش‌های کشت، دوز و طول دوره MSCs، تداخلات دارویی، نوع و طول دوره تمرين نسبت داد [۲۹]. چراکه ممکن است تعامل بین سازگاری‌های حاصل از نوع تمرينات و پاسخ‌های سلولی به آسیب عضلانی مرتبط با محرك‌های انقباضی، تعیین‌کننده جهت و مقدار تغییرات میوزنین باشد. از طرفی، ممکن است با توجه به ضرورت HA برای جداسدن فیبروبلاست‌ها از ماتریکس خارج سلولی و میتوز [۱۸]، افزایش سطوح سیتوکین‌های پیش‌التهابی و پروتازها در استنبولاست به کاهش سطوح HA منجر گردد. با وجود نقش هر یک از مداخلات مذکور در درد و التهاب، احتمال همپوشانی دوز ضددردی این مداخلات با دوز مؤثر بر عملکرد حرکتی نیز وجود دارد. به علاوه، تزریق بیش از حدّ محلول و سلول‌های زیاد بدلیل محدود بودن فضای مفصل زانو، می‌تواند اثرات نامطلوبی مانند درد مفصل و

این یافته است [۲۹]. به نظر می‌رسد که HA وابسته به دوز مصرفی است و از طریق افزایش گیرنده‌های ایتنگرینی در ماتریکس خارج سلولی نظیر CD44 به سنتز پروتئین و فعالیت‌های مکانیکی می‌باشد و شود. این گیرنده ایتنگرینی وابسته به فشارهای مکانیکی می‌باشد و موجب فعال‌سازی مسیرهای بیولوژیکی و سنتز پروتئین در سلول می‌گردد. با این حال، ممکن است از مسیرهای بیش فعال کردن سیستم ایمنی اثرات متفاوتی را اعمال کند. هرچند نقش HA در مسیر سیگنانلینگ عضله‌سازی در استنبولاست مورد بررسی قرار نگرفته است؛ ولی، بررسی‌ها نشان می‌دهد که تزریق HA با مهار آپوپتوز، ترویج مهاجرت سلولی و تسريع تکثیر سلولی، به صورت بالقوه از طریق مسیر CD44 و گیرنده PI3K/MAPK، به بازسازی مینیسک در بیماران استنبولاستی منجر می‌شود [۲۸]. در تضاد با این یافته، Zhang و همکاران نشان دادند که HA نمی‌تواند بر بیان ژن CD44 تأثیر بگذارد و ممکن است بیان بالای این ژن در استنبولاست ترتیب نتیجه افزایش سطح HA سینوویت OA نباشد [۳۰]. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که محیط غنی از گلیکوز‌آمینو گلیکان در تعامل با MSCs و مداخله‌هایی که به سنتز پروتئین منجر می‌شوند، می‌توانند به تمایز سلولی بینجامند؛ در حالی که تزریق HA در مطالعه حاضر به تعديل اثر تمرين و MSCs منجر گردید. همسو با نتایج مطالعه رسولی و همکاران [۱۴]، یافته مهم این مطالعه اثر سینزیستی تمرين + MSCs بر مسیرهای میوزنیک بود. بافت عضلانی، توانایی منحصر به فردی برای بازسازی در پاسخ به آسیب یا بیماری دارد و ترمیم آن بر روی سلول‌های ماهواره‌ای تک‌توان متکی است. شواهد متعددی نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی موجود در عضله می‌توانند از بازسازی عضلات اسکلتی حمایت کنند. چراکه سلول‌های بنیادی دارای پتانسیل شرکت در میوزنر و تمایز به سلول‌های مزودرمی نظیر میوبلاست‌ها هستند. علاوه‌بر این، MSCs پتانسیل رگزایی دارند که با تمایز مستقیم به سلول‌های اندوتیال و یا حمایت از سلول‌های عصبی برای تولیدمثل عروقی که برای عملکرد مناسب عضلات حیاتی هستند؛ به رگزایی کمک می‌کنند. به علاوه، ممکن است ویژگی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی این سلول‌ها روند التهابی را در محل انتشار سلول‌های بنیادی مهار کند. از طرفی، مشخص شده است که دژنراسیون عضلانی، التهاب مزمن را در پی دارد که با تولید فعال TNF- $\alpha$  با نفوذ در ماکروفاژهای M1 همراه است. MSCs پتانسیل تبدیل ماکروفاژهای التهابی نوع M1 را به فنوتیپ M2 دارند که برای بهبود و بازسازی عضلات و اعصاب اسکلتی موردنیاز است. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که انتشار موضعی MSCs به عضله، یک حمایت محیطی برای پیش‌سازهای میوزنیک، تامیل به تقویت سلول‌های بنیادی

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تمرین هوازی، HA و MSCs به تنهایی و تعامل تمرین هوازی + MSCs به طور سینرژیستی با افزایش فعالیت مایوکین‌ها به مهار آتروفی عضله چهارسر موش‌های صحرایی متلاش به KOA منجر می‌شوند. هرچند HA موجب تعدیل اثر تمرین هوازی و MSCs گردید، ولی ممکن است تمرین هوازی + HA باعث عضله‌سازی گردد. بنابراین، طول دوره، زمان و دوز تزریقی در کنار این دو مداخله به پژوهش‌های بیشتری نیاز دارد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی تشکر و قدردانی می‌شود.

### References:

- [1] Terracciano C, Celi M, Lecce D, Baldi J, Rastelli E, Lena E, et al. Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int* 2013; 24(3): 1095-100.
- [2] Abdizadeh L, Peeri M, Matinhomaee H. The effect of aerobic exercise, ozone and mesenchymal stem cells on pain threshold changes in osteoarthritis rats. *Feyz* 2022; 26(3): 247-55. [in Persian]
- [3] Abdizadeh L, Azarbajani MA, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise, mesenchymal stem cells (MSCs) and ozone therapy on anxiety and depression like behaviors caused by induction of osteoarthritis in rats. *Razi J Med Sci* 2021; 28(1): 12-22. [in Persian]
- [4] Kunz RI, Coradini JG, Silva LI, Bertolini GR, Brancalhão RM, Ribeiro LF. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(10): 842-9.
- [5] Cunha JE, Barbosa GM, Castro PA, Luiz BL, Silva AC, Russo TL, et al. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Sci Rep* 2019; 9(1): 63-66.
- [6] Silva JM, Alabarse PV, Teixeira VD, Freitas EC, de Oliveira FH, Chakr RM, et al. Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLOS One* 2018; 13(4): 966-82.
- [7] Taniguchi M, Fukumoto Y, Kobayashi M, Kawasaki T, Maegawa S, Ibuki S, et al. Quantity and quality of the lower extremity muscles in women with knee osteoarthritis. *Ultra Med Biol* 2015; 41(10): 2567-74.
- [8] Meadows E, Flynn JM, Klein WH. Myogenin regulates exercise capacity but is dispensable for skeletal muscle regeneration in adult mdx mice. *PLoS One* 2011; 6(1): 161-84.
- [9] Lee JH, Jun HS. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. *Front Physiol* 2019; 10(42): 1-9.
- [10] Zhang FJ, Luo W, Gao SG, Su DZ, Li YS, Zeng C, et al. Expression of CD44 in articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2013; 23(6): 1186-91.
- [11] Roos EM, Herzog W, Block JA, Bennell KL. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(1): 57-63.
- [12] Blazek AD, Nam J, Gupta R, Pradhan M, Perera P, Weisleder NL, et al. Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage. *Osteoarthr Cartil* 2016; 24(7): 1210-22.
- [13] Morgan JE, Zammit PS. Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 2010; 316(18): 3100-8.
- [14] Rasouli SH, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Effect of an Exercise Training Course and Bone Marrow-Derived Stem Cell injection on Pax7 and Myogenin Expression in a Rat Model of Arthritis. *Mljgoums* 2020; 14(6): 41-7.
- [15] Leach JK, Whitehead J. Materials-directed differentiation of mesenchymal stem cells for tissue engineering and regeneration. *ACS Biomate Sci Eng* 2018; 4(4): 1115-27.
- [16] Bitto FF, Klumpp D, Lange C, Boos AM, Arkudas A, Bleiziffer O, et al. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a newly developed neurotised AV-loop model. *Biomed Res Int* 2013; 1(1): 1-11.
- [17] Najar M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Mesenchymal stromal cell immunology for efficient and safe treatment of osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8(1): 567-813.

التهاب ایجاد کند؛ بنابراین ممکن است تزریق‌های متعدد به کاهش این اثرات منجر گردد که می‌تواند مشوفی برای مطالعات آنی باشد. با توجه به اثر تعدیل کننده HA و مشخص نبودن نقش آن در مسیر سیگنالیگ عضله‌سازی در استتوآرتربیت و نیز تأثیرات متفاوت این مداخله بر سیستم ایمنی، عدم اندازه‌گیری سیتوکین‌های التهابی و بررسی تغییرات سیستم ایمنی از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد که علت عدم بررسی، کمبود بودجه پژوهش بوده است. به علاوه، سیناپس‌های شیمیابی بین نورون حرکتی و فیرهای عضلانی با واسطه استیل کولین رخ می‌دهد؛ بنابراین، ممکن است تغییرات در اتصالات عصبی - عضلانی یا گیرندهای نیکوتین استیل کولین که با انقباض عضلانی مرتبط هستند، با ضعف عضلانی و آتروفی در KOA همراه باشد؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آنی این تغییرات به همراه مسیر سیگنالیگ سنتز پروتئین در بافت عضلانی بررسی گردد.

- [18] Feng Q, Zhu M, Wei K, Bian L. Cell-mediated degradation regulates human mesenchymal stem cell chondrogenesis and hypertrophy in MMP-sensitive hyaluronic acid hydrogels. *PLoS One* 2014; 9(6): 1-7.
- [19] Tajik M, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. Effects of Endurance Training, Hyaluronic Acid and Stem Cell Treatments on the Quadriceps Muscle Fiber Count: Study on the Knee Osteoarthritis Rats. *Thrita* 2020; 9(1): 1-7. [in Persian]
- [20] Behzad B, ASGARI A. The Interactive role of exercise and satellite cells in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *Ebnesina* 2015; 4(49): 47-63. [in Persian]
- [21] Rasouli SH, Farzanegi P, Abbaszadeh H. The effect of aerobic training and hyaluronic acid on expression of MYOD and MURF-1 genes in experimental arthritis model rats. *Razi J Med Sci* 2021; 28 (3): 48-58. [in Persian]
- [22] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *JMNI* 2001; 1(4):363-76.
- [23] Liu SS, Zhou PU, Zhang Y. Abnormal expression of key genes and proteins in the canonical Wnt/β-catenin pathway of articular cartilage in a rat model of exercise-induced osteoarthritis. *Mol Med Rep* 2016; 13(3): 1999-2006.
- [24] Jimbo S, Terashima Y, Teramoto A, Takebayashi T, Ogon I, Watanabe K, et al. Antinociceptive effects of hyaluronic acid on monoiodoacetate-induced ankle osteoarthritis in rats. *J Pain Res* 2019; 12(1): 191-200.
- [25] Pisters MF, Veenhof C, Van Dijk GM, Dekker J, Avoidance of activity and limitations in activities in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a 5 year follow-up study on the mediating role of reduced muscle strength. *Osteoarthr Cartil* 2014; 22(2): 171-7.
- [26] Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Dev* 2015; 142(9): 1572-81.
- [27] Rabinovich-Nikitin I, Kirshenbaum LA. Exercise-induced myonectin protects against ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* 2018; 123(12): 1264-6.
- [28] Murakami T, Otsuki S, Okamoto Y, Nakagawa K, Wakama H, Okuno N, et al. Hyaluronic acid promotes proliferation and migration of human meniscus cells via a CD44-dependent mechanism. *Connect Tis Res* 2019; 60(2): 117-27.
- [29] Haghjoo M, Azarbayjani MA, Peeri M, Hosseini SA. Effect of training, hyaluronic acid, and mesenchymal stem cell therapies on osteocalcin gene expression in cartilage tissue of rats with knee osteoarthritis. *Gene Cell Tissue* 2019; 6(4): 1-6. [in Persian]
- [30] Zhang FJ, Gao SG, Cheng L, Tian J, Xu WS, Luo W, et al. The effect of hyaluronic acid on osteopontin and CD44 mRNA of fibroblast-like synoviocytes in patients with osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Int* 2013; 33(1): 79-83.
- [31] Klimczak A, Kozlowska U, Kurpisz M. Muscle stem/progenitor cells and mesenchymal stem cells of bone marrow origin for skeletal muscle regeneration in muscular dystrophies. *Arch Immunol Ther Exp* 2018; 66(5): 341-54.
- [32] Jørgensen SL, Bohn MB, Aagaard P, Mechlenburg I. Efficacy of low-load blood flow restricted resistance EXercise in patients with Knee osteoarthritis scheduled for total knee replacement (EXKnee): protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open* 2020; 10(10): 343-76.
- [33] Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Cierny MA, Brzoska E. Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Dev Bio* 2020; 104 (1): 93-104.
- [34] Haddadpour Z, Abbaszadeh H, Farzanegi P. Effect of Three Therapeutic Methods of Exercise, Ozone, and Stem Cells on the MEF2C Expression and Myostatin Levels in Femoral Muscle Tissue of the Osteoarthritis Rats. *Horizon Med Sci* 2020; 26(3): 260-75. [in Persian]
- [35] Nosratpour A, Farzanegi P, RezaeeShirazi R. The effect of exercise training And injection Mesenchymal Stem Cells on gene expression of Beclin-1, Mir-155 and mTOR of articular cartilage tissue in rats model of osteoarthritis. *Razi J Med Sci* 2022; 28(10): 102-11. [in Persian]
- [36] Asadi S, Farzanegi P, Azarbayjani MA. Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF-α in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. *SDH* 2018; 4(3): 162-70. [in Persian]