



## اثر یک دوره تمرین و تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان Beclin-1، Mir-155 و mTOR بافت غضروف در رت‌های مدل استئوآرتریت

آزاده نصرت پور: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران  
پروین فرزنانگی: دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران (\*نویسنده مسئول) parvin.farzanegi@iausari.ac.ir  
رضا رضایی شیرازی: استادیار، گروه تربیت بدنی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی،  
سلول‌های بنیادی مزانشیمی،  
استئوآرتریت

**زمینه و هدف:** استئوآرتریت یک بیماری مزمن دژنراتیو غضروف مفصلی و شایع‌ترین نوع آرتریت است. هدف مطالعه حاضر تبیین تاثیر هشت هفته تمرین هوازی با شدت متوسط و تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) بر بیان ژن Beclin-1، Mir-155 و mTOR بافت غضروف آسیب دیده در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت زانو بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ ویستار (با میانگین وزن  $210 \pm 10$  گرم) به طور تصادفی به پنج گروه سالم، استئوآرتریت، استئوآرتریت + تمرین هوازی، استئوآرتریت + سلول‌های بنیادی مزانشیمی و گروه استئوآرتریت + تمرین هوازی + سلول‌های بنیادی مزانشیمی تقسیم شدند. استئوآرتریت به روش جراحی انجام شد. تمرین ورزشی شامل دویدن روی نوارگردان به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته، هر جلسه ۳۵-۴۵ دقیقه و با سرعت ۱۸ متر در دقیقه بود. گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مقدار  $1 \times 10^6$  سلول بنیادی مزانشیمی بر کیلوگرم از طریق تزریق داخل مفصلی زانو دریافت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در وضعیت ۱۲ ساعت ناشتایی نمونه‌های غضروف زانو جدا شد و بیان ژن Beclin-1، Mir-155 و mTOR به روش R-T PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد استئوآرتریت موجب کاهش بیان ژن Beclin-1 و افزایش Mir-155 و mTOR بافت غضروف شد. اما تمرین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مداخله تمرین + سلول‌های بنیادی مزانشیمی این روند معکوس بود ( $P \leq 0.009$ ). همچنین بین گروه‌های تمرین سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تمرین + سلول‌های بنیادی مزانشیمی تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).  
**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج تحقیق پیشنهاد می‌شود افراد مبتلا به استئوآرتریت از تمرین ورزشی با شدت متوسط و سلول بنیادی جهت بهبود بیان ژن‌های اتوفاجی غضروف مفصلی استفاده کنند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

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):102-111.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## 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

**Azadeh Nosratpour:** PhD Student, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad; University, Sari, Iran

**Parvin Farzanegi:** Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad; University, Sari, Iran (\* Corresponding author) [parvin.farzanegi@iausari.ac.ir](mailto:parvin.farzanegi@iausari.ac.ir)

**Reza Rezaeshirazi:** Assistant Professor, Department of Physical Education, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Arthritis defines a large group of diseases primarily affecting the joint. It is the leading cause of pain and disability in adults. Osteoarthritis affecting the knee or hip is the most common form among over 100 types of arthritis and chronic degenerative disease of articular cartilage and the most common type of arthritis. The purpose of the study was to explain the effect of eight weeks of moderate intensity aerobic exercise and mesenchymal stem cell injection (MSCs) on the expression of Beclin-1, Mir-155 and mTOR genes in damaged cartilage tissue in rats with knee osteoarthritis.

**Methods:** In the experimental study, 35 adult male Wistar rats (mean weight  $210 \pm 10$ g) were randomly divided into five healthy groups: osteoarthritis, osteoarthritis+ aerobic exercise, osteoarthritis+ mesenchymal stem cells and osteoarthritis+ exercise group. Aerobic+ mesenchymal stem cells were divided. Osteoarthritis was surgically treated. Exercise consisted of running on a treadmill for eight weeks, five sessions per week, each session lasting 35-45 minutes at a speed of 18 meters per minute. The mesenchymal stem cell group received  $1 \times 10^6$  mesenchymal stem cells per kg by intra-articular injection of the knee. 48 hours after the last training session and at 12 hours of fasting, knee cartilage samples were isolated and the expression of Mir-155, Beclin-1 and mTOR genes measured by R-T PCR.

**Results:** The results of the study showed that there is a significant difference between the effect of training and injection of mesenchymal stem cells on Beclin-1 mRNA levels ( $P < 0.001$ ). The results also showed that there was a significant difference between OA group and healthy control groups ( $P=0.008$ ), MSCs+ OA ( $P=0.009$ ), exercise+ OA ( $P=0.001$ ) and MSCs+ exercise+ OA ( $P=0.001$ ). Also, there was a significant difference between exercise+ OA group ( $P=0.008$ ) and MSCs+ exercise+ OA ( $P=0.002$ ) and MSCs+ OA group. However, there was no significant difference between exercise+ OA and MSCs+ exercise+ OA groups ( $P>0.05$ ). In the present study, it was found that there was a significant difference between groups in the expression of miR-155 groups ( $P<0.001$ ). Also, the difference between OA group and three groups of exercise+ OA ( $P=0.002$ ), MSCs+ OA ( $P=0.001$ ), exercise+ MSCs+ OA ( $P=0.003$ ) was significant. On the other hand, there was a significant difference between exercise+ MSCs+ OA and MSCs+ OA group ( $P=0.008$ ). However, there was no significant difference between the two groups of exercise+ OA and MSCs+ OA ( $P>0.05$ ). The results showed that there was a significant difference between the mean mTOR and mRNA expression of the groups ( $P<0.001$ ). Also, there was a significant difference between OA group and healthy control groups ( $P=0.001$ ), MSCs+ OA ( $P=0.014$ ), exercise+ OA ( $P=0.021$ ) and MSCs+ exercise+ OA ( $P=0.003$ ). Also, there was a significant difference between MSCs+ OA group ( $P=0.022$ ) and MSCs+ OA ( $P=0.002$ ). However, there was no significant difference between OA+ training groups and MSCs+ OA ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The results of the present study showed that beclin-1 expression is one of the signs of differences between healthy chondrocytes and osteoarthritis. Decreased expression of Beclin-1 may be associated with decreased autophagy, mitochondrial damage and chondrocyte apoptosis. However, a mild intensity exercise training period was associated with increased

### Keywords

Continuous Training,  
Interval Training,  
Brain-Derived Neural  
Growth Factor,  
Insulin-Like Growth  
Factor

Received: 05/08/2021

Published: 05/01/2022

expression of Beclin-1. In line with the findings of the present study, Zhang et al. (2019) showed that four weeks of running on treadmill at a gentle speed of 18 m/min increased the expression of beclin-1 factor mRNA in chondrocytes of osteoarthritis model mice.

Another finding of this study was to increase the expression of beclin-1 factor mRNA by mesenchymal stem cell injection. It should be noted that due to the essential role of Beclin-1 in autophagy and being on the axis of accumulation of proteins involved in autophagy in the membranes of autophagy system, increasing changes in Beclin-1 levels with mesenchymal stem cells indicate an increase in autophagy activity in cartilage tissues and chondrocytes. Cell culture media studies showed that optimal level of autophagy maintains stem cell function and strengthens autophagy activation, differentiation and triggering of stem cell signals. In addition, strengthening the autophagy system also prevents stem cell apoptosis. It was also reported that stem cell migration is affected by autophagy and low hand regulation of Beclin-1 is associated with increased levels of caspase-3 and stem cell apoptosis.

In the present study, the progression of knee osteoarthritis was associated with an increase in the expression of MIR-155. However, aerobic training and stem cell injection were associated with decreased expression of MIR-155. The present study is the district research to investigate the effect of aerobic training and stem cells on mir-155 expression. However, in recent years, some studies with different methodology have investigated mesenchymal stem cell interactions, inflammation and MIR-155 and pointed to the role of oxygen free radicals (ROS). Therefore, in the present study, the status of apoptosis and its markers were not measured; reducing the expression of this factor with mesenchymal stem cell and aerobic training may stop the expression of pre-apoptotic proteins.

Another finding of the present study showed that osteoarthritis increased mTORMRNA levels of articular cartilage. This can be indirectly related to lack of optimal autophagy control and progression of apoptosis in chondrocytes. In line with this finding, Ying et al. (2015) showed an increase in the expression of mTORMRNA chondrocytes despite osteoarthritis in human, mouse and dog cartilage, and exercise training used in the present study along with mesenchymal stem cell injection was effective in reducing mTORMRNA levels. Although complex-1 rapamycin (C1-mTOR) is the primary regulator of autophagy in mammals, overexpression of mTORMRNA along with beclin-1 reduction are signs of decreased autophagy capacity and aging. However, protein levels were not measured, the intensity of exercise was mild and moderate and its effects were observed in changing the expression of mTOR along with the increase of Beclin-1. This result may reflect the availability of the necessary ground for autophagy and its inhibition in chondrocytes. Application of moderate intensity training in osteoarthritis that promotes the growth and proliferation of chondrocytes. The progression of osteoarthritis is associated with profound changes in epigenetic control of gene expression and transcription factors, leading to certain changes in target gene expression in the joint tissue by changing the methylation status of the genome.

Overall, the results of this study showed that a moderate-intensity training period, while increasing Beclin-1 levels, reduced the levels of MIR-155 and mTOR. However, in the present study, protein expression of molecules as well as levels of other autophagy factors such as ULK-1 and LC3 were not measured, which is one of the limitations of the present study. Therefore, it is suggested that people with osteoarthritis use moderate-intensity exercise training and stem cell to improve the expression of articular cartilage autophagy genes.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

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):102-111.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

استئوآرتریت، یک بیماری مزمن دژنراتیو غضروف مفصلی و شایع‌ترین نوع آرتریت است که میلیون‌ها نفر از مردم در سراسر جهان تحت تاثیر آن قرار می‌گیرند (۱). بر اساس تحقیقات انجام شده عوامل بیوشیمیایی یا سیستمیک مانند ژنتیک، پیری، مصرف غذا، مصرف استروژن، تراکم استخوان و سندرم متابولیک و عوامل بیومکانیکی مانند ضعف عضلانی، سفتی مفصل و آسیب مفصلی در شکل‌گیری استئوآرتریت نقش دارند (۲). در این بین واکنش کندروسیت‌های غضرفی زانو تحت شرایط استرس محیطی، کانون توجه مطالعات پاتولوژیک استئوآرتریت شده است. در این راستا، نقش تداخلات اتوفآژی و عملکرد میتوکندری کندروسیت‌ها در پاتولوژی استئوآرتریت اجتناب‌ناپذیر است، زیرا کندروسیت‌های غضروف مفصلی می‌توانند مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها را تولید کنند که اجزای اصلی حفظ ساختار و عملکرد غضروف مفصلی بشمار می‌آیند (۳).

برهم خوردن تعادل در اتوفآژی و تغییر در کندروسیت‌ها، فعال شدن و تفرق‌پذیری آن‌ها، تحت شرایط کاتابولیک خارج سلولی یا تغییرات خودبخودی کندروسیت‌ها، و وضعیت همئوستاتیک بافت غضرفی را متاثر می‌سازد (۴). با این حال مطالعه مسیرهای سیگنالینگ نشان داده‌اند که Beclin-1 یکی از اجزای مهم در شکل‌گیری اتوفآگوزوم در فرایند اتوفآژی است (۵) که می‌تواند تحت تاثیر یا تنظیم پروتئین کیناز فعال شونده AMP (AMPK) و راپامایسین هدف پستانداران (mTOR) قرار گیرد (۶). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که مسیر اتوفآژی در پستانداران توسط مسیرهای متعدد مانند سیگنالینگ mTOR و AMPK کنترل می‌شود. در این زمینه، آغازگرهای اتوفآژی کندروسیت‌ها، مجموعه‌ای از کیناز Unc-51 (ULK) مانند ATG13، FIP200 و ATG101 هستند (۷). تغییرات اتوفآژی که هنگام پیری و آسیب غضروف گزارش شده است، شامل کاهش تعداد و حجم اتوفآگوزوم‌ها و از سوی دیگر با کاهش بیان پروتئین‌های اتوفآژی ULK1، Beclin1 و LC3 6 و بیان بیش از حد mTOR مرتبط است (۸).

همچنین پیشرفت استئوآرتریت با تغییرات عمیق

کنترل اپی ژنتیک بیان ژن و عوامل رونویسی همراه است که منجر به تغییرات مشخصی در بیان ژن هدف در بافت مفصل از طریق تغییر وضعیت متیلاسیون ژنوم می‌شود (۵). از جمله عوامل مداخله‌گر، میکرو RNA‌ها (miRs) یا همان RNAهای کوچک و غیر کدومی اندوژن هستند که قادر به بیان ژن به واسطه کاهش mRNA یا مسدود کردن ترجمه mRNA هستند به طوری که می‌توانند بسیاری از فرآیندهای سلولی، از جمله آپوپتوز، تمایز سلولی و متابولیسم را تعدیل کرده و عدم تنظیم آنها با سرطان و سایر پاتولوژی‌ها، از جمله OA همراه است (۹).

در تحقیقی نشان داده شد با مقایسه توالی ژنوم میکرو RNAهای غضروف طبیعی انسان با غضروف OA، MiR-155 یکی از حساس‌ترین میکرو RNAها در OA است (۱۰). شواهدی که اثر مهار کننده اتوفآژی توسط miR-155 را تأیید نموده‌اند، شامل مشاهداتی هستند که انتقال ترانسفورماتورهای LNA و تقلید miR-155 در T / C28a2 در کندروسیت‌های اولیه انسان، همبستگی منفی بین miR-155 و mRNAهای هدف آن، از جمله ATG3، GABARAPL1، ATG5، FOXO3 و دیگر عوامل وابسته به اتوفآژی از جمله ULK1 و ATG14 را نشان دادند (۱۱). این داده‌ها نشان می‌دهد که miR-155 قادر است فعالیت‌های اتوفآژی را با تنظیم تعدادی از اجزای درگیر در مراحل مختلف اتوفآژی، از مرحله القا تا طویل شدن، تعدیل کند. ضمن آن که miR-155 ممکن است با بیان MAP1LC3، ULK1 و ATG14 و مهار فاکتور رونویسی FOXO3، تحت تاثیر قرار گیرد (۱۲).

اهمیت درمان استئوآرتریت به اندازه‌ای است که از روش‌های مختلف جهت درمان یا کاهش عوارض آن استفاده می‌شود از جمله این روش‌ها می‌توان استفاده از تمرینات بدنی و ورزش (۱۳) و درمان با سلول‌های مزانشیمی یا بنیادی (cells Mesenchymal stem -MSCs) به عنوان راهکارهای موثر غیر جراحی در درمان، کاهش درد و یا بهبود نسبی افراد مبتلا به استئوآرتریت نام برد. در روش درمان با سلول‌های مزانشیمی، این سلول‌ها با مهار TNF- $\alpha$  بر عملکرد مطلوب کندروسیت‌ها در بیماران OA تاثیر می‌گذارد و تولید کلاژن نوع II و دیگر اجزای ضروری غضروف

## روش کار

برای انجام تحقیق تجربی حاضر، ۳۵ سر موش صحرایی نر ویستار ۱۱۰ روزه با محدوده وزنی  $210 \pm 10$  گرم از مرکز انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. دمای اتاق حیوانات ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه شبانه روزی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود. اصول نگهداری حیوانات بر اساس قوانین بین‌المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه (O.19.33.2018 Ethical code) رسید. حیوانات بصورت تصادفی به پنج گروه (7 سر موش) سالم، استئوآرتریت (OA)، OA+ ورزش، OA+ سلول بنیادی مزانشیمی و OA+ ورزش + سلول بنیادی مزانشیمی تقسیم شدند.

در تحقیق حاضر القا استئوآرتریت با استفاده از روش جراحی و مطابق مطالعه لامپروپولو-آدامیدو (Lampropoulou-Adamidou) و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد. حیوانات با کتامین (۴۰ mg/kg) و زایلاین (۴ mg/kg) بیهوش شدند. سپس یک برش یک سانتی‌متری از زانوی راست برای ظاهر شدن مفصل زانو ایجاد شد. بلافاصله با باز شدن مفصل زانو و جابجایی جانبی استخوان کشکک و لیگامان کشککی، یک برش طولی در قسمت میانی زانو ایجاد شد. سپس یک برش در لیگامان صلیبی داخلی بدون آسیب به غضروف مفصلی و دیگر لیگامنت‌ها نیز ایجاد شد. در نهایت کپسول مفصلی با ۶ بخیه قابل جذب و پوست با ۶ بخیه ابریشمی بسته شد (۱۹).

برای انجام تمرین هوازی، ابتدا حیوانات یک هفته، ۴ روز در هفته و هر روز به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بر روی نوار گردان با شیب صفر جهت آشناسازی تمرین کردند. برنامه تمرین اصلی به مدت ۲۰ دقیقه با شیب صفر و سرعت ۱۵ متر در دقیقه در هفته اول شروع شده و با رعایت اصل اضافه بار پیشرونده در هفته‌های بعدی، مدت تمرین به ۴۴-۳۴ دقیقه و شدت تمرین به ۱۸-۱۶ متر در دقیقه در هفته هشتم رسید (۸).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از مغز استخوان موش‌های نر نژاد ویستار سالم (۲۲۰-۲۰۰ g)

مفصلی را افزایش می‌دهد (۱۴). سلول‌های مزانشیمی علاوه بر افزایش بیان آگریکان و کلاژن نوع II؛ با تولید و بیان فاکتور TGFβ منجر به کاهش بیان شاخص‌های کاتابولیسی مانند MMP13 و ADAMTS5 نیز می‌شود (۱۵).

از سوی دیگر، با توجه به اینکه بیماری استئوآرتریت یک بیماری پیش‌رونده و تخریب‌کننده مزمن است و باعث ایجاد بسیاری از ناتوانی‌ها در فرد می‌شود، فعالیت ورزشی منظم جزء جدایی‌ناپذیر در خود درمانی استئوآرتریت زانو به حساب می‌آید (۱۶).

هرچند تحقیقات در خصوص تداخلات سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمرینات ورزشی در مسیر سیگنالینگ اتوفاژی کندروسیت‌های غضرفی در استئوآرتریت زانو، بسیار محدودند، اما ارتباط فعالیت بدنی و miR-155 در برخی مطالعات نشان داده شده است (۱۷) همین رابطه ژنگ و همکاران اثر چهار هفته تمرین دویدن ۱۸ متر بر دقیقه بصورت ۵ بار در هفته، بر اتوفاژی کندروسیت‌ها در موش‌های صحرایی مدل OA را بررسی کرده و نتیجه گرفتند وضعیت اتوفاژی و افزایش و بیان Beclin-1 در نقاط مختلف غضرفی کاهش یافت (۸). در تحقیق دیگری یان (Yan) و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی تاثیر تزریق داخل مفصلی سلول‌های مزانشیمی در کلاژن‌های شکننده ایجاد کننده آرتروز پرداخته و بهبود نسبی همراه با کاهش فاکتور نکروز دهنده آلفا (TNF-α)، اینترفرون گاما و افزایش IL-10 را نشان دادند (۱۸).

با توجه به محدودیت مطالعات و منابع در دسترس، پرسش‌های زیادی در مورد ساز و کار اصلی اثر تزریق سلول بنیادی مزانشیمی و تمرینات بدنی بر فاکتورهای Beclin-1، miR-155 و mTOR در کندروسیت‌ها از یک طرف و اهمیت یافتن روش مناسبی جهت درمان استئوآرتریت محقق در صدد پاسخگویی به این سوال است که آیا تمرین هوازی و تزریق سلول بنیادی در مسیر سیگنالینگ کنترل اتوفاژی در کندروسیت‌های زانو تاثیر دارد یا خیر؟

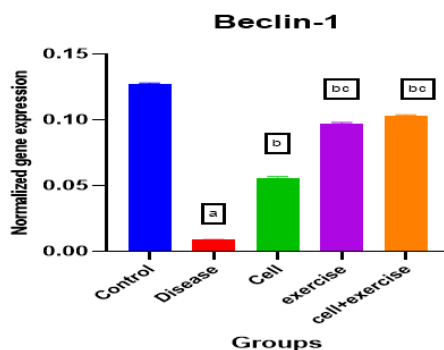
و برآورد سطوح بیان ژن با فرمول  $-\Delta Ct - 2$  در نظر گرفته شد.

از آمار تو صیفی (میانگین و انحراف استاندارد) و آمار استنباطی (آزمون‌های شپيرو و یلک، تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی) با استفاده از نرم‌افزار spss/21 در سطح معنی‌داری  $\alpha \leq 0.05$  برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

### یافته‌ها

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بین تاثیر تمرین و تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سطوح Beclin-1 mRNA تفاوت معناداری وجود دارد ( $P < 0.001$ ). همچنین نتایج آزمون تعقیبی نشان داد، بین گروه OA با گروه‌های کنترل سالم ( $P = 0.008$ )، OA + MSCs ( $P = 0.009$ )، ورزش + OA ( $P = 0.001$ ) و OA + MSCs ورزش ( $P = 0.001$ ) تفاوت معناداری وجود داشت. همچنین بین گروه ورزش + OA ( $P = 0.008$ ) و OA + MSCs ورزش ( $P = 0.002$ ) با گروه OA + MSCs تفاوت معناداری وجود داشت. اما بین گروه‌های ورزش + OA و OA + MSCs ورزش تفاوت معناداری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۱).

در تحقیق حاضر مشخص شد تفاوت معناداری بین گروه‌ها در بیان miR-155 گروه‌ها وجود دارد ( $P < 0.001$ ). همچنین تفاوت میان گروه OA با سه گروه تمرین + OA ( $P = 0.002$ )، OA + MSCs ( $P = 0.001$ )، تمرین + OA + MSCs ( $P = 0.003$ ) معنادار



نمودار ۱- مقایسه میانگین سطوح Beclin-1 mRNA بین گروه‌ها

بیهوش شده با کتامینو زایلاسین استخراج شد. روش کشت با تراکم پائین سلولی بود. در این رابطه، سلول‌ها با تراکم ۶ تا ۵۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. پس از پر شدن نسبی سطح ظرف کشت، پاساژ صورت گرفت و مراحل فوق تا پاساژ ۴ که مجموعه خالصی از سلول‌هاست تکرار گردید. MSCs جدا شده در محیطی با DMEM با FBS ۲۰٪ در طول یک شبانه روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت‌ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شدند تا سلول‌های نجسبیده جدا شوند. MSCs بعد از ۴ بار پاساژ شدن، به خلوص بالای ۹۰٪ رسیدند و به بافت هدف (مفصل زانوی راست) تزریق شدند. برآورد شد موش‌هایی که در گروه MSCs بودند،  $1 \times 10^6$  سلول MSCs بر کیلوگرم دریافت کردند (۲۰).

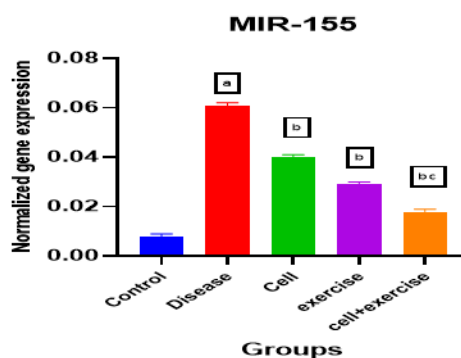
۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین ( $40 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $4 \text{ mg/kg}$ ) بیهوش شدند. سپس بافت غضروف به دقت جدا و پس از شستشو با آب مقطر و اندازه‌گیری وزن، در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شده و در بافر پروتئاز (pH 4.7, PBS) هموژنیزه شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفوژ شدند. در فرآیند اندازه‌گیری mRNA، مقدار ثابتی از محلول هموژنیزه شده بافتی در داخل میکروتیوب RNasefree منتقل شد و روی آن یک سی سی ترایزول اضافه شد. برای جداسازی RNA از فاز پروتئین و DNA حدود ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به داخل هر میکروتیوب اضافه و برای رسوب RNA از ایزوپروپانول استفاده شد. غلظت RNA بدست آمده بین ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود که برای اطمینان از خلوص آن، محصول بدست آمده روی آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA تام، نمونه‌ها با آنزیم DNase تیمار شدند. در روش RT-PCR، با استفاده از دستورالعمل کیت ساخت کسور امریکا (cDNA synthesis kit; Invitrogen, San Diego)، استخراج cDNA، mRNA و فرایند محصول تکمیل شد. سطوح mRNA متناسب با ژن مرجع و GAPDH،

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیان mRNA فاکتور Beclin-1 در اثر استئوآرتریت زانو کاهش یافت. تحقیقات نشان داده‌اند که مقدار بیان Beclin-1 یکی از نشانه‌های اختلاف کندروسیت‌های سالم و استئوآرتریت است. به عبارت دیگر سطح بیان Beclin-1 در استئوآرتریت کاهش می‌یابد (۱۰). کاهش بیان Beclin-1 ممکن است با کاهش اتوفژی، آسیب میتوکندری و آپوپتوز کندروسیت‌ها در ارتباط باشد (۱۰) با این وجود، یک دوره تمرین ورزشی با شدت ملایم با افزایش بیان Beclin-1 کندروسیت‌ها همراه شد. همسو با یافته تحقیق حاضر ژانگ و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند چهار هفته دویدن روی نوارگردان، با سرعت ملایم ۱۸ متر در دقیقه باعث افزایش بیان mRNA فاکتور Beclin-1 در کندروسیت‌های موش‌های مدل استئوآرتریت شد (۸).

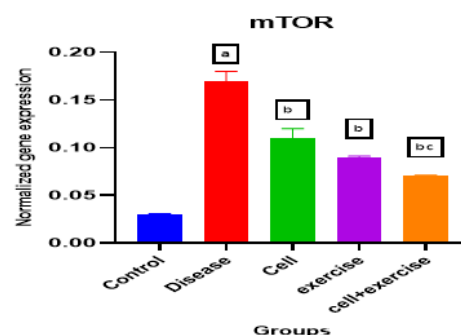
در رابطه با یافته تحقیق حاضر می‌توان عنوان کرد که انواع تحریکات مکانیکی سبب پاسخ فیزیولوژیکی مختلف می‌شود (۲۱). به دلیل وجود سنسورهای حساس به استرس مکانیکی، کندروسیت‌ها می‌توانند سنتر ماتریکس خارج سلولی را در پاسخ به استرس مکانیکی افزایش دهند (۲۲). هرچند سازوکار اصلی اثر تمرینات ورزشی بر بیان mRNA فاکتور Beclin-1 ناشناخته مانده است، ولی بنظر می‌رسد سیگنال‌های سنسورهای مکانیکی نقش مهمی در تنظیم آسیب غضروف و بازسازی آن دارند (۲۳).

یافته دیگر تحقیق حاضر، حاکی از افزایش بیان mRNA فاکتور Beclin-1 با تزریق سلول بنیادی مزانشیمی بود. قابل ذکر است با توجه به نقش اساسی Beclin-1 در اتوفژی و قرارگیری در محور تجمع پروتئین‌های درگیر در اتوفژی در غشای فاگوفورهای سیستم اتوفژی (۹)، تغییرات افزایشی سطوح Beclin-1 با وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی (۲۴)، نشان دهنده افزایش فعالیت اتوفژی در بافت غضروفی و کندروسیت‌ها است. مطالعات محیط کشت سلولی نشان داد که سطح بهینه اتوفژی سبب حفظ عملکرد سلول بنیادی می‌شود (۲۵) و فعال شدن اتوفژی، تمایزپذیری



نمودار ۲- مقایسه میانگین سطوح miR-155 در بین گروه‌ها

a: اختلاف نسبت به گروه کنترل سالم، b: اختلاف نسبت به گروه OA، c: اختلاف نسبت به گروه OA+ MSCs



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطوح mTOR mRNA در بین گروه‌ها

بود. از طرف دیگر اختلاف بین تمرین +MSCs + OA با گروه OA+MSCs معنادار بود. اما بین دو گروه تمرین + OA و OA+MSCs تفاوت معناداری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۲).

نتایج نشان داد تفاوت معناداری بین میانگین بیان mTOR mRNA گروه‌ها وجود داشت ( $P < 0.001$ ). همچنین بین گروه OA با گروه‌های کنترل سالم OA+MSCs ( $P = 0.001$ )، تمرین + OA ( $P = 0.014$ )، تفاوت معناداری وجود داشت. همچنین اختلاف بین گروه OA+MSCs + تمرین + OA ( $P = 0.003$ ) و OA+MSCs ( $P = 0.021$ ) معنادار بود. اما بین گروه‌های تمرین + OA+MSCs ( $P = 0.022$ ) معنادار بود. اما بین گروه‌های تمرین + OA و OA+MSCs تفاوت معناداری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۳).

بطور بحث‌انگیزی فعالیت mTOR را متوقف نماید و مستقل از نقش mTOR در کاهش فعالیت اتوفازای نقش داشته باشد. از سوی دیگر، اثربخشی MIR-155 ممکن است از طریق بخش تشکیلاتی mTORC2 که ریکتور (Rictor) نامیده می‌شود، اعمال شود (۹). در این راستا، MIR-155 قادر به فسفریله نمودن AKT است که در اینصورت بخش mTORC1 فعال می‌شود (۴۶).

یافته دیگر تحقیق حاضر نشان داد، استئوآرتریت، سطوح mTORMRNA غضروف مفصلی را افزایش داد. این افزایش می‌تواند بطور غیرمستقیم به عدم کنترل بهینه اتوفازای و پیشرفت آپوتوز در کندروسیت‌ها مرتبط باشد. همسو با این یافته ینگ و همکاران (۲۰۱۵) افزایش بیان mTORMRNA کندروسیت‌ها با وجود استئوآرتریت در غضروف انسان، موش و سگ را نشان دادند تمرین ورزشی بکار رفته در تحقیق حاضر همراه با تزریق سلول بنیادی مزانشیمی، در کاهش سطوح mTORMRNA موثر بوده است. با وجود آنکه کمپلکس-۱ (p107/p130INK4) تنظیم‌کننده اولیه در راه اندازی اتوفازای در پستانداران است (۳۴)، بیان بیش از حد mTORMRNA به همراه کاهش Beclin-1 از نشانه‌های کاهش ظرفیت اتوفازای و پیری است. اما، در تحقیق حاضر سطوح پروتئینی اندازه‌گیری نشد، شدت تمرین ملایم و متوسط بود و آثار آن در تغییر بیان mTOR به همراه افزایش Beclin-1 مشاهده شد. این نتیجه ممکن است فراهم بودن زمینه لازم برای اتوفازای و مهار آن در کندروسیت‌ها را انعکاس دهد. بکارگیری تمرین با شدت متوسط در استئوآرتریت که سبب رشد و تکثیر کندروسیت‌ها گردد (۸).

از طرف دیگر پیشرفت استئوآرتریت با تغییرات عمیق کنترل اپی ژنتیک بیان ژن و عوامل رونویسی همراه است که منجر به تغییرات مشخصی در بیان ژن هدف در بافت مفصل از طریق تغییر وضعیت متیلاسیون ژنوم می‌شود (۵). سطوح برخی از عوامل مداخله‌گر ژنی در پژوهش حاضر اندازه‌گیری نشد که امکان داشت نتایج این تحقیق را دستخوش تغییر نمایند. یکی از سازوکار احتمالی درگیر در استئوآرتریت، تنظیم بالادست اتوفازای با اثر مهاری بر گلوکوکورتیکوئیدها و آپوتوز

و به راه افتادن سیگنال‌های سلول بنیادی را تقویت می‌کند (۲۶). علاوه بر آن، تقویت سیستم اتوفازای از آپوتوز سلول‌های بنیادی نیز جلوگیری می‌کند (۲۷). همچنین گزارش شد مهاجرت سلول‌های بنیادی تحت تاثیر اتوفازای قرار می‌گیرد و تنظیم پائین دست Beclin-1 با افزایش سطوح کاسپاز-۳ و آپوتوز سلول‌های بنیادی همراه می‌شود (۲۸).

در تحقیق حاضر، پیشرفت استئوآرتریت زانو با افزایش بیان MIR-155 همراه بود. اما، تمرین هوازی و تزریق سلول بنیادی با کاهش بیان MIR-155 همراه شد. تحقیق حاضر اولین پژوهشی است که تاثیر تمرین هوازی و سلول‌های بنیادی بر بیان MIR-155 را بررسی نموده است. با وجود این، در سال‌های اخیر برخی از تحقیقات با مدل‌های مختلف تداخلات سلول‌های بنیادی مزانشیمی، التهاب و MIR-155 را بررسی و به نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) اشاره نموده‌اند (۲۹، ۳۰). به عنوان مثال جیرونلا (Gironella) و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند بیان بالای MIR-155 در برخی از بافت‌ها مانند پانکراس در بهبود وضعیت آپوتوز نقش دارد (۳۱). بنابراین هرچند که در تحقیق حاضر، وضعیت آپوتوز و نشانگرهای مربوط به آن اندازه‌گیری نشد، کاهش بیان این فاکتور با سلول بنیادی مزانشیمی و تمرین هوازی، ممکن است بیان پروتئین‌های پیش آپوتوزی را متوقف سازد. بنابراین انجام مطالعات گسترده‌تری در این زمینه لازم است.

مخالف با یافته تحقیق حاضر فیش و همکاران (۲۰۱۴) تنظیم بالادست (Upregulation) MIR-155 غضروفی در اثر استئوآرتریت را گزارش کردند (۳۲). اکثر گزارشات در خصوص تاثیر MIR-155 در اتوفازای بر نقش سیگنالی mTOR تاکید دارند (۳۳). همچنین بر اساس تحقیقات انجام شده، MIR-155 در تنظیم پائین دست (Downregulation) اتوفازای در استئوآرتریت با میانجی‌گری چندین ATGs شامل ULK1، FOXO3، ATG3، ATG5، ATG14 و... شرکت می‌کند (۱۷). گزارش شد بیان بیش از اندازه MIR-155 با کاهش LC3-1 همراه شد که عنصری ضروری در تشکیل اتوفازوزوم‌ها است. همچنین، MIR-155 ممکن است



## References

1. Musumeci G, Aiello FC, Szychlinska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6093-112.
2. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):16-21.
3. Li YS, Xiao Wf, Luo W. Cellular aging towards osteoarthritis. *Mechanisms Ageing Dev*. 2017;162:80-4.
4. Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):88-92.
5. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-40.
6. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPAR $\gamma$  deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheumat Dis*. 2015;74(3):569-78.
7. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J, Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res*. 2016;26(9):1021-32.
8. Zhang X, Yang Y, Li X, Zhang H, Gang Y, Bai L. Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *Int J Mol Med*. 2019;43(1):336-44.
9. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-01.
10. Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco F, Lotz M. 188 Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage and its aging-related loss in linked with cell death and osteoarthritis and cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:109.
11. Kim J, Guan KL. Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: roles of mTORC1 and AMPK. Taylor & Francis; 2011.
12. Holla S, Kurowska-Stolarska M, Bayry J, Balaji KN. Selective inhibition of IFNG-induced autophagy by Mir155-and Mir31-responsive WNT5A and SHH signaling. *Autophagy*. 2014;10(2):311-30.
13. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
14. Vonk L, van Dooremalen S, Liv N, Klumperman J, Coffey P, Saris D, Lorenowicz M. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular

کندروسیت هاست (۳۵). در برخی از تحقیقات، استئوآرتریت الفائی با منوسدیم یورات انجام شده است که افزایش اتوفاژی، با مرگ کندروسیت‌ها همراه شد. همچنین قابل تامل است که از یک سو، نتایج بحث انگیز در خصوص اتوفاژی، ارتباط فعالیت اتوفاژی و مرگ سلول‌های کندروسیت است که به فاکتورهایی مانند سن، درجات آسیب و نوع اتوفاژی درگیر وابستگی دارد (۳۶)، از سوی دیگر، نقش دوگانه اتوفاژی مورد مطالعه در تحقیقات مختلف در نوع سلول و بافت‌های درگیر و همچنین نوع تحریک ایجاد شده می‌تواند نتایج مختلفی را رقم زند (۳۷).

تحقیقات متعددی اثر تمرینات ورزشی را بر بیومارکرهای التهابی و درمان استئوآرتریت بررسی کرده و نشان دادند که تمرینات ورزشی به صورت معنی‌داری بیان IL-10 را هم در درون مفصل و هم در پری سینویال در بیماران مبتلا به استئوآرتریت افزایش می‌دهد (۳۷). در تحقیق دیگری نیز مشخص شد که تمرینات ورزشی باعث بهبود بیان ژن IL-10 در غضروف مفصلی موش‌های مبتلا به آرتروز زانو می‌شود (۳۶). افزایش بیان و تولید IL-10 در طول ورزش امکان دارد به دلیل مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر TNF- $\alpha$ ، IL-8 و IL-6 باشد که متعاقب آن در بهبود نسبی این بیماری نقش ایفا می‌کند (۳۷). بنابراین بهبود وضعیت اتوفاژی با کاهش فاکتورهای التهابی در اثر تمرینات ورزشی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است اتفاق افتد.

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد یک دوره تمرین با شدت متوسط ضمن افزایش سطوح Beclin-1، سبب کاهش سطوح MIR-155 و mTOR شد. هرچند در پژوهش حاضر، بیان پروتئینی مولکول‌ها و همچنین سطوح فاکتورهای دیگر اتوفاژی از جمله ULK-1 و LC3 اندازه‌گیری نشد که از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود افراد مبتلا به استئوآرتریت از تمرین ورزشی با شدت متوسط و سلول بنیادی جهت بهبود بیان ژن‌های اتوفاژی غضروف مفصلی استفاده کنند.

- vesicles promote human cartilage regeneration. *J Extracell Vesicles*. 2018;7:207-207.
15. Ruiz M, Toupet K, Fonteneau G, Maumus M, Jorgensen C, Noel D. Transforming growth factor beta induced, a new player in the therapeutic effect of mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26:S38-9.
16. Focht BC, Garver MJ, Lucas AR, Devor ST, Emery CF, Hackshaw KV, et al. A group-mediated physical activity intervention in older knee osteoarthritis patients: effects on social cognitive outcomes. *J Behav Med*. 2017;40(3):530-7.
17. Rocha B, Rodrigues AR, Tomada I, Martins MJ, Guimarães JT, Gouveia AM, et al. Energy restriction, exercise and atorvastatin treatment improve endothelial dysfunction and inhibit miRNA-155 in the erectile tissue of the aged rat. *Nutr Metab*. 2018;15(1):28.
18. Yan M, Liu X, Dang Q, Huang H, Yang F, Li Y. Intra-articular injection of human synovial membrane-derived mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis: assessment of immunomodulatory capacity in vivo. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
19. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, Liakou C, Triantafillopoulos IK, Dontas I, Papaioannou NA. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthopaed Surg Traumatol*. 2014;24(3):263-71.
20. Asadi S, Farzanegi P, Azarbayjani MA. Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF- $\alpha$  in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. *Soc Determ Health*. 2018;4(3):162-70.
21. Grad S, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. *Clin Orthopaed Relat Res*. 2011;469(10):2764-72.
22. Harvey LA, Brosseau L, Herbert RD. Continuous passive motion following total knee arthroplasty in people with arthritis. *Cochrane Data Syst Rev*. 2014;(2).
23. Yang Y, Wang Y, Kong Y, Zhang X, Zhang H, Gang Y, Bai L. Mechanical stress protects against osteoarthritis via regulation of the AMPK/NF $\kappa$ B signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):9156-67.
24. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae JS, Ha HJ, Lee PH. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase  $\beta$ -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*. 2014;10(1):32-44.
25. Oliver L, Hue E, Priault M, Vallette FM. Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(15):2779-88.
26. Sbrana FV, Cortini M, Avnet S, Perut F, Columbaro M, De Milito A, Baldini N. The role of autophagy in the maintenance of stemness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(6):621-33.
27. Sanchez CG, Penforis P, Oskowitz AZ, Boonjindasup AG, Cai DZ, Dhule SS, et al. Activation of autophagy in mesenchymal stem cells provides tumor stromal support. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):964-72.
28. Li W, Yang Y, Ba Z, Li S, Chen H, Hou X, et al. MicroRNA-93 regulates hypoxia-induced autophagy by targeting ULK1. *Oxid Med Cell Long*. 2017.
29. Teramura T, Onodera Y. Stem cell depletion by inflammation-associated miR-155. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(1):17.
30. Wu X, Wang Y, Yu T, Nie E, Hu Q, Wu W, et al. Blocking MIR155HG/miR-155 axis inhibits mesenchymal transition in glioma. *Neuro-oncology*. 2017;19(9):1195-205.
31. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceed Natl Acad Sci*. 2007;104(41):16170-5.
32. Fisch K, Akagi R, Alvarez-Garcia O, Teramura T, Muramatsu Y, Saito M, et al. Integrative Omics Profiling Reveals Dysregulated Novel Pathways Mediated By microRNAs and DNA Methylation in Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66.
33. Wan G, Xie W, Liu Z, Xu W, Lao Y, Huang N, Zhang Y. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. *Autophagy*. 2014; 10(1):70-9.
34. Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*. 2017;61(6):565-84.
35. Liu N, Wang W, Zhao Z, Zhang T, Song Y. Autophagy in human articular chondrocytes is cytoprotective following glucocorticoid stimulation. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2166-72.
36. Hwang HS, Yang CM, Park SJ, Kim HA. Monosodium urate crystal-induced chondrocyte death via autophagic process. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):29265-77.
37. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Canad J Physiol Pharmacol*. 2010;88(3):285-95.