



اثر سلول‌های بنیادی و گلوکز آمین بر بیان ژن *BSPII* و سطوح *CPII* در بافت غضروف موش‌های آرتروزی در معرض تمرین تحمل وزن

بابک بی‌نیاز: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

هاجر عباس زاده: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران (* نویسنده مسئول) h.abaszade61@gmail.com

پروین فرزانه‌گی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

تمرین،
گلوکز آمین،
سلول بنیادی،
استئوآرتروز

زمینه و هدف: استئوآرتروز در نتیجه نقص در یک مفصل متحرک پوشیده از غشای سینوویال بوده و با تخریب غضروف هیالین مشخص می‌شود. پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر سلول‌های بنیادی و گلوکز آمین بر بیان ژن *BSPII* و سطوح *CPII* در بافت غضروف موش‌های آرتروزی در معرض تمرین تحمل وزن انجام شد.

روش کار: پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. بدین منظور، تعداد ۷۰ سر موش نر ویستار ۸ هفته‌ای به طور تصادفی به ۱۰ گروه: کنترل-سالم، کنترل-بیمار، تمرین-بیمار، سلول-بیمار، گلوکز آمین-بیمار، سلول-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-گلوکز آمین-بیمار، سلول-تمرین-بیمار، سلول-گلوکز آمین-بیمار تقسیم شدند. استئوآرتروز با آسیب به مینیسک‌ها و غضروف به موش‌های نر القاء شد. برنامه تمرینی شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب با سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود. سلول‌های بنیادی مشتق از استخوان نیز به تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول بر کیلوگرم به موش‌ها تزریق شد. گلوکز آمین به طور خوراکی به میزان ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز به موش‌ها داده شد. بیان ژن *BSPII* به روش *Real time PCR* و سطوح *CPII* بافت غضروف به روش الیزا اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج آزمون ANOVA تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن *BSPII* و سطوح *CPII* بافت غضروف بین گروه‌های پژوهش نشان داد ($p < 0/001$). گروه تمرین+گلوکز آمین+سلول بیشترین کاهش و نزدیک‌ترین مقادیر به سطح گروه کنترل-سالم را در بیان ژن *BSPII* و سطوح *CPII* بافت غضروف داشته است ($p < 0/001$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی، یافته‌ها نشان داد که استئوآرتروز موجب افزایش بیان ژن *BSPII* و سطوح *CPII* بافت غضروف شده و ترکیبی از سلول+گلوکز آمین+تمرین مؤثرتر از تمرین، سلول و گلوکز آمین به تنهایی برای کاهش این شاخص‌ها و بهبود استئوآرتروز زانو در موش‌ها بود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: این مقاله مستخرج از رساله دکتری بابک بی‌نیاز با کد ۲۰۸۲۱۴۲۳۹۸۱۰۰۷ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری و با هزینه شخصی می‌باشد.

شیوه استناد به این مقاله:

Biniiaz B, Abbaszadeh H, Farzanegi P. Effect of stem cells and glucosamine on expression of *BSPII* gene and *CPII* levels in cartilage tissue of arthritis rats exposed to weight bearing exercise. *Razi J Med Sci.* 2020;27(4):49-59.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

Original Article

Effect of stem cells and glucosamine on expression of BSPII gene and CPII levels in cartilage tissue of arthritis rats exposed to weight bearing exercise

Babak Biniaz, PhD Candidate, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Hajar Abbaszadeh, Assistant Professor, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
(*Corresponding author) h.abaszade61@gmail.com

Parvin Farzanegi, Associate Professor, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background: Osteoarthritis is the result of a defect in a movable joint covered by a synovial membrane and is characterized by degeneration of cartilage (1). Concentrations of specific molecules in cartilage and bone that reflect tissue regeneration in the group of patients with osteoarthritis are considered as prognostic factors for joint destruction (2). Among these, proteins such as BSP can be one of these factors. This bone protein stimulates the formation of hydroxyapatite in vitro. BSP binds to hydroxyapatite and contains an RGD integrin binding sequence. It may therefore serve as an adhesive molecule in the cell that allows cells to attach to the extracellular matrix. Another important protein is propeptide C of collagen type (CPII) II. The rate of type II collagen synthesis is directly proportional to the content of CPII in cartilage (3). The present study was performed to investigate the effect of stem cells and glucosamine on BSPII gene expression and CPII levels in cartilage tissue of arthritic rats exposed to weight bearing training.

Methods: This was an experimental study. For this purpose, the number of 70 male wistar rats were randomly divided into two groups: Control-healthy, control-patient, exercise-patient, cell-patient, glucosamine-patient, cell-glucosamine-patient, exercise-glucosamine-patient, cell-exercise-patient, saline-patient, and cell-glucosamine-exercise-patient. Osteoarthritis was induced in male mice with damage to the menisci and cartilage. The training program consisted of 30 minutes of running on a sloping trampoline at a speed of 16 meters per minute. Bone-derived stem cells were also injected into mice at the rate of 1,000,000 cells per kilogram. Glucosamine was given orally to mice at a dose of 250 mg / kg / day. After opening the abdominal cavity, samples of cartilage tissue were taken and frozen at -80 ° C for chemical analysis. CPII tissue levels were assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions (IBEX Montreal, Quebec, Canada). To measure the expression of BSPII gene in cartilage tissue, cartilage samples were homogenized in phosphate buffer (pH 7.0) at 4° C with a homogenizer. Total RNAs were extracted from the cartilage tissue of all mice using the RNX-Plus kit (SinaClon; RN7713C). The ND-1000 Nanodrop spectrophotometer (Thermo Sci., Newington NH) was used to estimate the quantity and quality of the extracted RNAs. The expression of BSPII gene was performed by Real-Time PCR method and the mRNA levels were normalized to the amount of GAPDH mRNA as the reference gene. The amount of Ct was calculated using the formula [Ct = CTBSPII-CTGAPDH]. Then, the gene of expression values were analyzed using the 2- Ct formula. To evaluate the significant changes in each of the research variables, between the different groups, one-way analysis of variance and if a statistically significant difference is observed from Tukey post hoc test was used to determine the location of intergroup differences, significance level was considered for all calculations p<0.05, all statistical operations were performed using GraphPadprism 8 software.

Results: The results of analysis of variance for expression of BSPII gene and CPII tissue levels of different groups are shown in Table 1. The calculated F value (60.20, 85.15, respectively) and its significance at the level of p<0.0001, indicate a significant difference between BSPII gene expression and CPII tissue levels between different research groups (Table 1). The highest decrease in BSPII gene expression and CPII tissue levels was observed in the exercise-glucosamine-cell-patient group and the highest increase was observed in the control-patient group (Figs 1 and 2).

Table 1. ANOVA test results for BSPII gene expression and CPII surfaces in the cartilage tissue

P	F	variable
*p <0.0001	60.20	expression of BSPII gene
* p <0.0001	85.15	CPII tissue levels

Significant differences *

Keywords

Exercise,
Glucosamine,
Stem cell,
Osteoarthritis

Received: 14/04/2020

Published: 29/06/2020

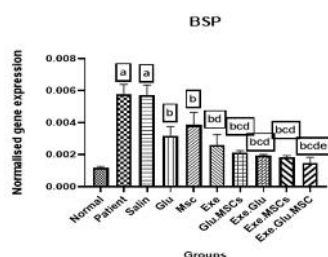


Fig. 1. Comparison of mean BSP gene expression in different research groups.

Normal: Control-healthy, Patient: Control-patient, saline: Saline-patient, Exe: Exercise-patient, MSc: Cell-patient, Glu: Glucosamine-patient, MSc.Glu: Cell-glucosamine-patient, Glu.Exe: Patient-Glucosamine-Exercise, Exe.MSc: Patient-Exercise-Cell, Exe.MSc.Glu: Glucosamine-Exercise-Patient. a: Significance relative to healthy control, b: Significance relative to patient, c: Mean Glucosamine, d: significant relative to cell group, e: significant relative to exercise group.

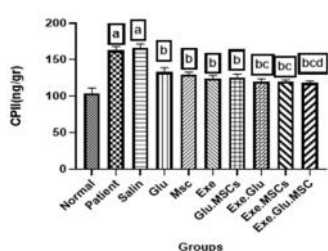


Fig. 2. Comparison of mean CPlI levels in different research groups.

Normal: Control-healthy, Patient: Control-patient, saline: Saline-patient, Exe: Exercise-patient, MSc: Cell-patient, Glu: Glucosamine-patient, MSc.Glu: Cell-glucosamine-patient, Glu.Exe: Patient-Glucosamine-Exercise, Exe.MSc: Patient-Exercise-Cell, Exe.MSc.Glu: Glucosamine-Exercise-Patient. a: Significance relative to healthy control, b: Significance relative to patient, c: Mean You have relative to glucosamine, d: significant relative to cell group.

Conclusion: The results of the present study showed that the expression of BSP gene and CPlI levels of cartilage tissue in the model of osteoarthritis mice increased abnormally. BSP is a bone-specific protein produced by osteoblasts. BSP is specifically enriched between the cartilage-bone phases (3). Propeptide C of type II collagen (CPlI) also acts as procollagen by the activity of a proteinase C and is released to form fibrils. The peptide is released from the cartilage and enters the bloodstream. Therefore, its presence in body fluids is one of the indicators of collagen synthesis in cartilage (3). In the present study, CPlI levels and BSP gene expression were assessed at 8 weeks using an osteoarthritis model and the protective effect of exercise, glucosamine and stem cells. The results of our study showed that glucosamine consumption, stem cell injection, exercise or a combination of them effectively control cartilage depletion in a model of osteoarthritis mice. CPlI levels and BSP gene expression were reduced to normal by combined exercise + cell + glucosamine intervention. These values had the most significant decrease in the combined group compared to the osteoarthritis group. These results suggest that the use of exercise in combination with glucosamine intake and cell injection has a synergistic effect on cartilage protection. In the mouse osteoarthritis model, glucosamine inhibits type II collagen degradation by preserving proteoglycans and enhances type II collagen synthesis in articular cartilage. In addition, glucosamine in the early stages of experimental osteoarthritis has a positive effect on the regeneration, structure and mineralization of bone under cartilage and can increase the production of hyaluronic acid in synovial tissue (16). Overall, the findings showed that osteoarthritis increased the expression of BSP gene and CPlI levels in cartilage tissue and a combination of cell + glucosamine + exercise was more effective than exercise, cell and glucosamine alone to reduce these markers.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Biniiaz B, Abbaszadeh H, Farzanegi P. Effect of stem cells and glucosamine on expression of BSP gene and CPlI levels in cartilage tissue of arthritis rats exposed to weight bearing exercise. *Razi J Med Sci.* 2020;27(4):49-59.

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

مقدمه

اختلالات عضلانی-اسکلتی شایع‌ترین علت ناتوانی مزمن در افراد یک جامعه می‌باشد و در این میان استئوآرتریت از شیوع بالاتری برخوردار است. استئوآرتریت در نتیجه نقص در یک مفصل متحرک پوشیده از غشای سینوویال بوده و با تخریب غضروف هیالین مشخص می‌شود (۱). غلظت مولکول‌های ویژه غضروف و استخوان که منعکس‌کننده نوسازی بافتی در گروه بیماران مبتلا به استئوآرتریت می‌باشد به عنوان عوامل پیش‌آگهی میزان تخریب مفصل در نظر گرفته می‌شود (۲).

در این میان پروتئین‌هایی مانند BSP می‌تواند از جمله این عوامل باشد. این پروتئین استخوانی تشکیل هیدروکسی آپاتیت را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می‌کند. BSP به هیدروکسی آپاتیت متصل می‌شود و حاوی یک دنباله اتصال اینتگرین RGD است. بنابراین ممکن است به عنوان یک مولکول چسبنده در سلول خدمت کند که اجازه می‌دهد سلول‌ها به ماتریکس خارج سلول وصل شوند. پروتئین مهم دیگر پروپیتید C از کلاژن نوع II (CPII) می‌باشد. میزان سنتز کلاژن نوع II به طور مستقیم متناسب با محتوای CPII در غضروف است (۳).

از طرفی دیگر، برای درمان استئوآرتریت زانو درمان‌های متعددی توصیه شده که سلول‌های بنیادی یکی از این روش‌ها می‌باشد. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی تمایز نیافته با قدرت تقسیم و تمایز به انواع سلول‌ها می‌باشند. این سلول‌ها از قدرت خود تجدیدشوندگی برخوردار می‌باشند و می‌توانند به انواع مختلفی از بافت‌ها مانند چربی، استخوان و تاندون متمایز گردند (۴). در زمینه تاثیر سلول‌های بنیادی بر بیماری استئوآرتریت مطالعات محدودی انجام شده است که به نتایج امیدوار کننده‌ای نیز دست یافته‌اند (۵). در تحقیقی نشان داده شده که فاکتورهای محلول در مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بصورت معناداری سبب تأخیر در شروع آرتریت القا شده توسط کلاژن، کاهش تورم پاها، تخریب استخوان، التهاب مفاصل و شدت علائم بالینی در گروه پیشگیری در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل شده است (۶).

یکی دیگر از روش‌های درمانی که در زمینه کمک به درمان بیماران استئوآرتریت و سایر بیماری‌های مشابه مورد توجه زیادی قرار گرفته مصرف گلوکز آمین است. گلوکز آمین جزو اصلی پرتئوگلیکان بوده و در غضروف مفصلی و مایع سینوویال به صورت طبیعی وجود دارد و نیز محرکی برای ساخت کندروسیت، محافظی برای جلوگیری از تجزیه شدن غضروف و فاکتوری برای تشخیص میزان پرتئوگلیکان ساخته شده توسط کندروسیت‌ها است (۷). محققان گزارش دادند که گلوکز آمین خوراکی باعث کاهش درد و بهبود تحرک شده و هیچ عارضه جانبی در استئوآرتریت انسان نشان نداده است (۸، ۹). ماسین و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که مصرف خوراکی گلوکز آمین در کنترل درد، تورم و بهبود تحرک بیماران استئوآرتریت موثر بوده است (۸). هامد و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی اثر بیوشیمیایی و بالینی گلوکز آمین موضعی و خوراکی در بیماران استئوآرتریت پرداخته که نتایج نشان از تاثیر مثبت آن در جهت بهبود علائم و درد بیماران داشته است (۹).

همچنین نشان داده شده که استئوآرتریت اغلب با داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی یا گلوکز آمین درمان می‌شود. این روش‌های درمانی ممکن است درد را تسکین دهد، اما تأثیر آن‌ها بر متابولیسم غضروف و سینوویوم در بیماران مبتلا به استئوآرتریت بحث برانگیز است. از سوی دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که در افراد دارای استئوآرتریت زانو، انجام ورزش درد را کاهش داده و عملکرد را بهبود می‌بخشد. این اثرات مفید در هردو پروتکل تمرینی قدرتی و استقامتی مشاهده شده است (۳). فلاح محمدی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که مصرف مکمل گلوکز آمین و انجام ورزش با شدت متوسط، هر یک به تنهایی و به صورت ترکیبی می‌تواند نقش مثبتی در بهبود علائم استئوآرتریت زانوی موش صحرایی ایفا نمایند (۱۰). مطالعات روبرت و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که بارگیری حاد به طور موقت باعث افزایش سرمی شاخص‌های مربوط به غضروف می‌شود، که بیشتر وابسته به مدت زمان ورزش است (۱۱). به طور کلی، مطالعات اندکی اثر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و نیز سلول‌های بنیادی بر عوامل مؤثر بر سیالیت

سلول‌های بنیادی نیز از مغز استخوان موش‌های نر نژاد ویستار سالم استخراج شد. سلول‌های بنیادی جدا شده در محیطی با FBS ۲۰ درصد برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. سپس کشت‌ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شد تا سلول‌هایی که نجسبیده‌اند، جدا شدند. در نهایت، سلول‌های بنیادی که بعد از ۳ تا ۴ بار پاساژ شدن به بیش از ۹۰٪ خلوص رسیدند، با هدف تزریق انتخاب شدند. موش‌هایی که در گروه‌های سلول‌های بنیادی بودند، ۱۰×۱ سلول بر کیلوگرم از طریق تزریق داخل مفصلی سلول‌های بنیادی دریافت کردند. پس از اجرای تحقیق تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات (جهت حذف اثرات حاد تمرین و گلوکز آمین و سلول)، با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بیهوش و فدا شدند. پس از شکستن حفره شکمی، نمونه‌های بافت غضروف برداشت شده و در دمای ۸۰- فریز شد تا برای آنالیز شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی سطوح بافتی CPII با روش ELISA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (IBEX Montreal, Quebec, Canada) انجام شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن BSP11 در بافت غضروف نیز، نمونه‌های غضروفی در بافر فسفات (pH 7.0) در دمای ۴ درجه سانتیگراد با هموژنیزه کننده همگن شدند. کل RNA ها از بافت غضروف تمام موش‌ها با استفاده از کیت RNX-Plus (SinaClon, RN7713C) استخراج شد. برای تخمین کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده از روش اسپکتروفتومتر ND-1000 (Thermo Sci., Newington NH) استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo science آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انجام شد و سپس، بیان ژن BSP11 با روش Real-Time PCR انجام شد. سطوح mRNA ها نسبت

مفصلی در بیماران مبتلا به استئوآرتریت را در کنار تمرینات ورزشی بررسی کرده‌اند. در این راستا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر سلول‌های بنیادی و گلوکز آمین بر بیان ژن BSP11 و سطوح CPII در بافت غضروف موش‌های آرتروزی در معرض تمرین تحمل وزن انجام شده است.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. بدین منظور تعداد ۷۰ سر موش صحرایی نر ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، از آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب و به طور تصادفی به ۱۰ گروه؛ کنترل-سالم، کنترل-بیمار، تمرین-بیمار، سلول-بیمار، گلوکز آمین-بیمار، سلول-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-گلوکز آمین-بیمار، سلول-تمرین-بیمار، سالین-بیمار، سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار تقسیم بندی شدند. حیوانات در طی پژوهش از غذای پک ساخت شرکت به پرور کرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به وزن کشی هفتگی) تغذیه شدند و به صورت آزاد از طریق بطری‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند. القای استئوآرتریت با روش جراحی برگرفته از مطالعه مالغیت و لیتل (۲۰۱۵) بود. بدین ترتیب که موش‌ها به وسیله کتامین و زایلازین بیهوش شدند. سپس یک برش یک سانتی متری برای ظاهر ساختن مفصل زانو در زانوی راست ایجاد و جابجایی جانبی پتلا و لیگامان پتلا توسط فورسپس انجام شد و بعد از آن یک برش ناقص در لیگامان صلیبی داخلی ایجاد شد (۱۲). یک ماه بعد از عمل جراحی پروتکل تمرینی مطابق با جدول ۱ انجام شد (۱۳).

۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز گلوکز آمین سولفات به صورت گاواژ، یک بار در روز به مدت ۸ هفته به موش‌های گروه‌های گلوکز آمین، داده شد (۱۴).

جدول ۱- مراحل اجرای پروتکل تمرینی

عوامل تمرینی	یک هفته دوره سازگاری	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
سرعت نوار گردان (متر/دقیقه)	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
مدت تمرین در هر جلسه (دقیقه)	۱۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۵۰	۵۰	۵۰

معناداری برای تمام محاسبات $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس برای بیان ژن BSPII و سطوح بافتی CPII گروه‌های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. ارزش F محاسبه شده (۶۰/۲۰، ۸۵/۱۵، به ترتیب) و معنادار بودن آن در سطح $p < 0.0001$ ، بیانگر وجود تفاوت معنی دار بیان ژن BSPII و سطوح بافتی CPII در بین گروه‌های مختلف پژوهش است (جدول ۲). بیشترین کاهش بیان ژن BSPII و سطوح بافتی CPII در گروه تمرین-گلوکزآمین-سلول-بیمار و

به مقدار mRNA GAPDH به عنوان ژن مرجع نرمال شدند. میزان Ct با استفاده از فرمول $Ct = CT_{BSPII} - [CT_{GAPDH}]$ محاسبه شد و به دنبال آن مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول 2^{-Ct} تجزیه و تحلیل شد. توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری هر یک از متغیرهای پژوهش، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح

جدول ۲- نتایج آزمون ANOVA برای بیان ژن BSPII و سطوح CPII در بافت غضروف

متغیر	F	p
بیان ژن BSPII	۶۰,۲۰	$p < 0.0001$ *
CPII	۸۵,۱۵	$p < 0.0001$ *

*: اختلاف معنادار

جدول ۳- Fold change ratio برای بیان ژن BSPII در بین گروه‌های مختلف پژوهش

گروه‌ها	Fold change ratio	Up-/down-regulation	p*
کنترل-بیمار به کنترل-سالم	۴/۹۲۶	Up-regulation	< 0.0001
سالمین-بیمار به کنترل-سالم	۴/۸۶۹	Up-regulation	< 0.0001
گلوکزآمین-بیمار به کنترل-سالم	۲/۷۳۰	Up-regulation	< 0.0001
سلول-بیمار به کنترل-سالم	۳/۲۸۴	Up-regulation	< 0.0001
تمرین-بیمار به کنترل-سالم	۲/۲۰۷	Up-regulation	0.013
سلول-گلوکزآمین-بیمار به کنترل-سالم	۱/۷۹۸	Up-regulation	۰/۰۹۳۳
تمرین-گلوکزآمین-بیمار به کنترل-سالم	۱/۶۴۱	Up-regulation	۰/۳۱۳۳
سلول-تمرین-بیمار به کنترل-سالم	۱/۵۷۷	Up-regulation	۰/۴۵۵۶
سلول-گلوکزآمین-تمرین-بیمار به کنترل-سالم	۱/۲۴۱	Up-regulation	۰/۹۹۴۳
سالمین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۹۸۸	Down-regulation	> 0.9999
گلوکزآمین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۵۵۴	Down-regulation	< 0.0001
سلول-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۶۶۸	Down-regulation	< 0.0001
تمرین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۴۴۸	Down-regulation	< 0.0001
سلول-گلوکزآمین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۳۶۶	Down-regulation	< 0.0001
تمرین-گلوکزآمین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۳۲۳	Down-regulation	< 0.0001
سلول-تمرین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۳۲۱	Down-regulation	< 0.0001
سلول-گلوکزآمین-تمرین-بیمار به کنترل-بیمار	-۰/۲۵۲	Down-regulation	< 0.0001
گلوکزآمین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۵۶۱	Down-regulation	< 0.0001
سلول-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۶۷۵	Down-regulation	< 0.0001
تمرین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۴۵۳	Down-regulation	< 0.0001
سلول-گلوکزآمین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۳۶۹	Down-regulation	< 0.0001
تمرین-گلوکزآمین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۳۳۷	Down-regulation	< 0.0001
سلول-تمرین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۳۲۴	Down-regulation	< 0.0001
سلول-گلوکزآمین-تمرین-بیمار به سالمین-بیمار	-۰/۲۵۵	Down-regulation	< 0.0001

*: نشانه معناداری

جدول ۳- ادامه

p*	Up-/down-regulation	Fold change ratio	گروه‌ها
۰/۵۱۱۰	Up-regulation	۱/۲۰۳	سلول-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
۰/۵۹۰۶	Down-regulation	۰/۸۰۸	تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۲۶۴	Down-regulation	۰/۶۵۹	سلول-گلوکز آمین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۴۹	Down-regulation	۰/۶۰۱	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۲۳	Down-regulation	۰/۵۷۸	سلول-تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۰۱	Down-regulation	۰/۴۵۵	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۵۶	Down-regulation	۰/۶۷۲	تمرین-بیمار به سلول-بیمار
*۰/۰۰۰۱	Down-regulation	۰/۵۴۷	سلول-گلوکز آمین-بیمار به سلول-بیمار
*۰/۰۰۰۱	Down-regulation	۰/۴۹۹	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به سلول-بیمار
*۰/۰۰۰۱	Down-regulation	۰/۴۸۰	سلول-تمرین-بیمار به سلول-بیمار
*۰/۰۰۰۱	Down-regulation	۰/۳۷۸	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به سلول-بیمار
۰/۸۵۰۲	Down-regulation	۰/۸۱۵	سلول-گلوکز آمین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۴۷۹۸	Down-regulation	۰/۷۴۳	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۳۳۳۷	Down-regulation	۰/۷۱۴	سلول-تمرین-بیمار به تمرین-بیمار
*۰/۰۱۸۷	Down-regulation	۰/۵۶۲	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۹۹۹۸	Down-regulation	۰/۹۱۲	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
۰/۹۹۸۰	Down-regulation	۰/۸۷۷	سلول-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
۰/۵۰۴۹	Down-regulation	۰/۶۹۰	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
>۰/۹۹۹۹	Down-regulation	۰/۹۶۱	سلول-تمرین-بیمار به تمرین-گلوکز آمین-بیمار
۰/۸۶۷۵	Down-regulation	۰/۷۵۷	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به تمرین-گلوکز آمین-بیمار
۰/۹۴۸۹	Down-regulation	۰/۷۸۷	سلول-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار

*نشانه معناداری

گروه تمرین-بیمار (p=۰/۰۱۸۷؛ fold ۰/۵۶۲) کاهش معنی داری نشان دادند (جدول ۳، شکل ۱). سطوح CPII نیز در تمام گروه‌های گلوکز آمین-بیمار، سلول-بیمار، تمرین-بیمار، گلوکز آمین-سلول-بیمار، تمرین-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-سلول-بیمار و تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش معنی داری نشان داده است (p<۰/۰۰۰۱)؛ جدول ۴). در گروه‌های تمرین-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-سلول-بیمار و تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه گلوکز آمین-بیمار (p=۰/۰۰۲۷، p=۰/۰۰۳۰، p=۰/۰۰۰۵) به ترتیب) کاهش معنی داری داشت. گروه تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه سلول-بیمار (p=۰/۰۱۴۴؛ fold ۱۱/۵۵۰) نیز کاهش معنی داری نشان داد (جدول ۴، شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

استئوآرتریت نوعی اختلال است که مفاصل متحرک را دربرمی‌گیرد و با استرس سلولی و تخریب ماتریکس خارج سلولی مشخص می‌شود (۱۵). تخریب اولیه غضروف مفصلی در استئوآرتریت با از بین رفتن

بیشترین افزایش سطوح آن در گروه کنترل-بیمار مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲). مقادیر بیان ژن BSP11 در تمام گروه‌های گلوکز آمین-بیمار، سلول-بیمار، تمرین-بیمار، گلوکز آمین-سلول-بیمار، تمرین-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-سلول-بیمار و تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه کنترل-بیمار کاهش معنی داری نشان داده است (p<۰/۰۰۰۱)؛ fold ۰/۵۵۴، fold ۰/۶۶۸، fold ۰/۴۴۸، fold ۰/۳۶۶، fold ۰/۳۳۳، fold ۰/۳۲۱، fold ۰/۲۵۲، به ترتیب، جدول ۳). بیان ژن BSP11 در گروه‌های گلوکز آمین-سلول-بیمار، تمرین-گلوکز آمین-بیمار، تمرین-سلول-بیمار و تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه گلوکز آمین-بیمار (p=۰/۰۲۶۴؛ fold ۰/۶۵۹، p=۰/۰۰۴۹؛ fold ۰/۶۰۱، p=۰/۰۰۲۳؛ fold ۰/۵۷۸، p<۰/۰۰۰۱؛ fold ۰/۴۵۵) به ترتیب) کاهش معنی داری داشتند. در گروه‌های تمرین-بیمار، تمرین-سلول-بیمار و تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به گروه سلول-بیمار (p=۰/۰۰۵۶؛ fold ۰/۶۷۲، p<۰/۰۰۰۱؛ fold ۰/۴۸۰، p<۰/۰۰۰۱؛ fold ۰/۳۷۸) و نیز گروه تمرین-گلوکز آمین-سلول-بیمار نسبت به

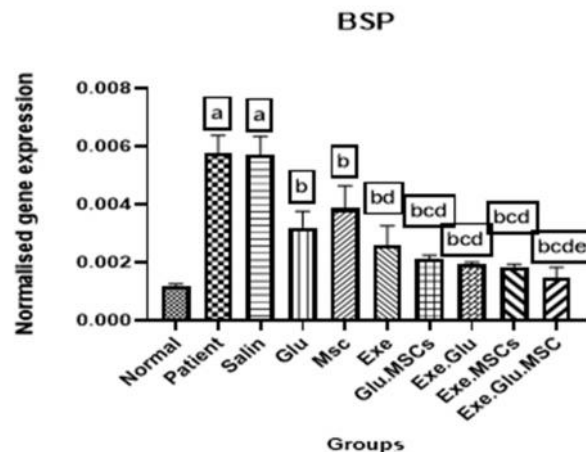
جدول ۴- مقایسات دوگانه برای میانگین سطوح CPII (ng/gr) در بین گروه‌های مختلف پژوهش

p*	افزایش/کاهش	اختلاف میانگین	گروه‌ها
<۰/۰۰۰۱	افزایش	۵۸/۷۶۰	کنترل-بیمار به کنترل-سالم
<۰/۰۰۰۱	افزایش	۶۲/۰۲۰	سالمین-بیمار به کنترل-سالم
<۰/۰۰۰۱	افزایش	۲۸/۶۸۰	گلوکز آمین-بیمار به کنترل-سالم
<۰/۰۰۰۱	افزایش	۲۵/۳۱۰	سلول-بیمار به کنترل-سالم
*<۰/۰۰۰۱	افزایش	۱۹/۵۱۰	تمرین-بیمار به کنترل-سالم
*<۰/۰۰۰۱	افزایش	۲۱/۵۱۰	سلول-گلوکز آمین-بیمار به کنترل-سالم
*۰/۰۰۰۴	افزایش	۱۵/۳۴	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به کنترل-سالم
*<۰/۰۰۰۳	افزایش	۱۵/۴۷۰	سلول-تمرین-بیمار به کنترل-سالم
*<۰/۰۰۱۸	افزایش	۱۳/۷۶۰	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به کنترل-سالم
*۰/۹۸۴۲	افزایش	۳/۲۵۶	سالمین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۰/۱۰۰	گلوکز آمین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۳/۴۷۰	سلول-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۹/۲۶۰	تمرین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۷/۲۷	سلول-گلوکز آمین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۲/۴۳	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۳/۳۱۰	سلول-تمرین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۵/۰۲۰	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به کنترل-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۳/۳۵۰	گلوکز آمین-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۳۶/۷۲۰	سلول-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۲/۵۲۰	تمرین-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۰/۵۳۰	سلول-گلوکز آمین-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۶/۶۹۰	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۶/۵۶۰	سلول-تمرین-بیمار به سالمین-بیمار
*<۰/۰۰۰۱	کاهش	۴۸/۲۸۰	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به سالمین-بیمار
۰/۹۸۰۱	کاهش	۳/۳۷۰	سلول-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
۰/۱۰۳۶	کاهش	۹/۱۶۸	تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
۰/۳۶۵۹	کاهش	۷/۱۷۶	سلول-گلوکز آمین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۲۷	کاهش	۱۳/۳۴۰	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۳۰	کاهش	۱۳/۲۱۰	سلول-تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
*۰/۰۰۰۵	کاهش	۱۴/۹۲	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به گلوکز آمین-بیمار
۰/۶۵۵۹	کاهش	۵/۷۹۸	تمرین-بیمار به سلول-بیمار
۰/۹۵۶۷	کاهش	۳/۸۰۶	سلول-گلوکز آمین-بیمار به سلول-بیمار
۰/۰۵۶۰	کاهش	۹/۹۶۸	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به سلول-بیمار
۰/۰۶۳۰	کاهش	۹/۸۴۰	سلول-تمرین-بیمار به سلول-بیمار
*۰/۰۱۴۴	کاهش	۱۱/۵۵۰	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به سلول-بیمار
۰/۹۹۹۶	افزایش	۱/۹۹۲	سلول-گلوکز آمین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۹۲۵۹	کاهش	۴/۱۷۰	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۹۳۸۰	کاهش	۴/۰۴۲	سلول-تمرین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۶۶۴۸	کاهش	۵/۷۵۶	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به تمرین-بیمار
۰/۵۷۷۰	کاهش	۶/۱۶۲	تمرین-گلوکز آمین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
۰/۶۰۴۹	کاهش	۶/۰۳۴	سلول-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
۰/۲۶۶۶	کاهش	۷/۷۴۸	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-بیمار
>۰/۹۹۹۹	افزایش	۰/۱۲۸	سلول-تمرین-بیمار به تمرین-گلوکز آمین-بیمار
>۰/۹۹۹۹	کاهش	۱/۵۸۶	سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار به تمرین-گلوکز آمین-بیمار
۰/۹۹۹۹	کاهش	۱/۷۱۴	سلول-تمرین-بیمار به سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار

*نشانه معناداری

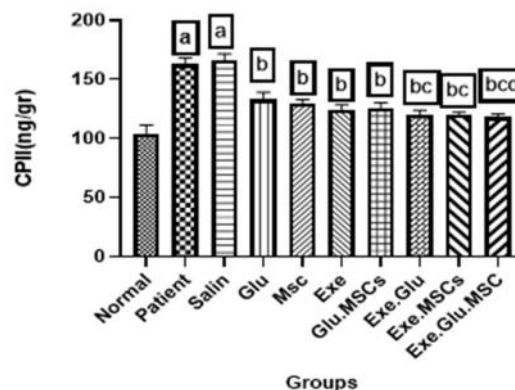
کلاژنولیز انجام می‌شود. بنابراین، اولین رویداد در استئوآرتریت یا آسیب غضروف مفصلی، انتشار

گلیکوز آمینو گلیکان‌ها ((Glycosaminoglycan(GAG)) از سطح غضروف مفصلی شروع می‌شود و به دنبال آن



شکل ۱- مقایسه میانگین بیان ژن BSP در گروه‌های مختلف پژوهش

Normal: کنترل-سالم، Patient: کنترل-بیمار، Saline: سالین-بیمار، Exe: تمرین-بیمار، Msc: سلول-بیمار، Glu: گلوکز آمین-بیمار، Glu.Msc: سلول-گلوکز آمین-بیمار، Exe.Glu: تمرین-گلوکز آمین-بیمار، Msc.Exe: سلول-تمرین-بیمار، Glu.Msc.Exe: سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار. a: معنی داری نسبت به کنترل سالم، b: معنی داری نسبت به بیمار، c: معنی داری نسبت به گلوکز آمین، d: معنی داری نسبت به گروه سلول، e: معنی داری نسبت به گروه تمرین.



شکل ۲- مقایسه میانگین سطوح CPII در گروه‌های مختلف پژوهش

Normal: کنترل-سالم، Patient: کنترل-بیمار، Saline: سالین-بیمار، Exe: تمرین-بیمار، Msc: سلول-بیمار، Glu: گلوکز آمین-بیمار، Glu.Msc: سلول-گلوکز آمین-بیمار، Exe.Glu: تمرین-گلوکز آمین-بیمار، Msc.Exe: سلول-تمرین-بیمار، Glu.Msc.Exe: سلول-گلوکز آمین-تمرین-بیمار. a: معنی داری نسبت به کنترل سالم، b: معنی داری نسبت به بیمار، c: معنی داری نسبت به گلوکز آمین، d: معنی داری نسبت به گروه سلول.

از کلاژن نوع (CPII) نیز، توسط فعالیت یک پروتئیناز C، به عنوان پروکلاژن ایفای نقش می‌کند و به سمت تشکیل فیبریل رها می‌شود. پروپیتید از غضروف آزاد و وارد گردش خون می‌شود. بنابراین حضور آن در مایعات بدن یکی از شاخص‌های سنتز کلاژن در غضروف است (۳). در مطالعه حاضر سطوح CPII و بیان ژن BSPII در ۸ هفته با استفاده از یک مدل استئوآرتریت و اثر محافظت کننده تمرین، گلوکز آمین و سلول بنیادی ارزیابی شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که مصرف گلوکز آمین، تزریق سلول‌های

گلیکوآمینوگلیکان‌ها است که نقش مهمی در حفظ عملکرد مفصلی دارند. در نتیجه، نشانگرهای اولیه آسیب غضروف مفصلی یا تغییرات استئوآرتریت ممکن است در بین محصولات متابولیک گلیکوآمینوگلیکان یافت شود (۱۶). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن BSPII و سطوح CPII بافت غضروف در مدل موش‌های آرتروزی افزایش غیرطبیعی دارد. BSP یک پروتئین مخصوص استخوان است که توسط استئوبلاست تولید می‌شود. BSP به طور خاص در بین فاز غضروف-استخوان غنی می‌شود (۳). پروپیتید C نیز

کردند که موش‌ها پس از مزانشیمال تراپی بهتر می‌توانند بر روی پای مبتلا به استئوآرتریت تحمل وزن داشته باشند (۲۱). استفاده از سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های مزانشیمی نه تنها بر ساختار مفصل آسیب دیده تأثیر دارد، بلکه جنبه‌های ضدالتهابی داشته و سیستم ایمنی را تعدیل می‌کند. سلول‌های بنیادی دو ویژگی مهم دارد که آن‌ها را از انواع دیگر سلول‌ها جدا می‌کند. این سلول‌ها، سلول‌هایی غیرتخصصی هستند و قدرت باز سازی و احیای خودشان را از طریق تقسیم سلولی دارا می‌باشند و دیگر اینکه این سلولها تحت شرایط آزمایشگاهی به سلول‌هایی با کارکرد تخصصی تبدیل می‌شوند (۲۲). یانگ و همکاران نشان دادند که مکانیسم تأثیر سلولهای بنیادی در درمان بالینی آسیب دیدگی زانو، یک مکانیسم ضد التهابی است که سبب بهبود تمایز سلولی می‌شود (۲۲). در مقابل کرسستینگ و همکاران رابطه بین بارگیری مفصل زانو، تغییر در حجم غضروف و غلظت نشانگرهای سرمی را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که فعال سازی عضلات اصلی ترین پارامتر مکانیکی مربوط به تغییرات غضروف است (۲۳). به طور کلی، یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که استئوآرتریت به شدت با افزایش بیان ژن BSPHII و سطوح CPII بافت غضروف همراه است. در مقابل، اثر درمانی ترکیبی از سلول+گلوکزآمین+تمرین مؤثرتر از تمرین، سلول و گلوکزآمین به تنهایی برای بهبود استئوآرتریت زانو در موش‌ها بود. شایان ذکر است که در مطالعه حاضر مسیرهای سیگنالینگ درگیر در ترمیم غضروف اندازه‌گیری نشده است، از اینرو، اندازه‌گیری این مسیرها می‌تواند به ارزیابی دقیق‌تر میزان ترمیم غضروف در وضعیت استئوآرتریت کمک کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مسئولان آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به دلیل همکاری‌های لازم سپاسگزاری می‌نمایند.
تأییدیه اخلاقی: این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات و استفاده از آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تأیید شده است (شماره مجوز تصویب: IR.IAU.REC.1398.32).

بنیادی، انجام تمرین و یا ترکیبی از آن‌ها به طور مؤثری کاهش غضروف را در مدل موش‌های استئوآرتریت کنترل می‌کند. مقادیر CPII و بیان ژن BSPHII با مداخله ترکیبی تمرین+سلول+گلوکزآمین به سمت نرمال کاهش یافت. این مقادیر در گروه ترکیبی بیشترین کاهش معنادار را نسبت به گروه استئوآرتریت داشته است. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از تمرین به همراه مصرف گلوکزآمین و تزریق سلول اثر هم افزایی در محافظت از غضروف ایجاد می‌کند. در مدل استئوآرتریت موش، گلوکزآمین با حفظ پروتوگلیکان‌ها، تخریب کلاژن نوع II را مهار کرده و سنتز کلاژن نوع II در غضروف مفصلی را تقویت می‌کند. علاوه بر این، گلوکزآمین در مراحل اولیه استئوآرتریت تجربی تأثیر مثبتی روی نوسازی، ساختار و معدنی شدن استخوان زیر غضروف دارد و می‌تواند تولید اسید هیالورونیک بافت سینوویال را افزایش دهد (۱۶). برخی مطالعات به نقش تجویز گلوکزآمین در کاهش درد مفصلی در بیماران دچار استئوآرتریت زانو اشاره کرده اند (۱۷). تجویز گلوکزآمین با نقشی که در تولید غضروف و پرولیفراسیون کندروسیت‌ها و ساخت کلاژن دارد، از ایجاد درد جلوگیری کرده و توزیع نابرابر نیرو را بر بخش‌های مختلف مفصلی از بین می‌برد (۱۸)، لذا انتظار می‌رود با تجویز آن سبب کاهش درد مفصلی گردد. کوبینگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ درمان استئوآرتریت تجربی در اسب‌ها را با روش‌های درمانی استیل-N، سولفات سدیم، گلوکزآمین استیل-N، و هیالورون سدیم بررسی نمودند و نتایج نشان داد که استئوآرتریت موجب غلظت گلیکوزآمینوگلیکاکها می‌شود. بین روش‌های مختلف پژوهش تفاوتی وجود نداشت (۱۷). همسو با یافته‌های ما گیبس و همکاران (۲۰۱۵) بهبود افراد استئوآرتریت را به دنبال تزریق درون مفصلی پیوند مغز استخوان استروم و پلاسمای غنی از پلاکت همراه با تمرینات ورزشی نشان دادند (۱۹). لی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که درمان به وسیله سلول‌های بنیادی منجر به ترمیم غضروف آسیب دیده در موش‌ها می‌شود (۲۰). همچنین بوول و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به بررسی میزان توزیع درد در موش‌های آرتروزی بعد از تزریق سلول‌های بنیادی به زانوی مبتلا پرداختند و مشاهده

References

- Zhang W, Moskowitz R, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(9):981-1000.
- Lamprecht ED, Williams CA. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012.
- Petersen SG, Saxne T, Heinegard D, Hansen M, Holm L, Koskinen S, et al. Glucosamine but not ibuprofen alters cartilage turnover in osteoarthritis patients in response to physical training. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(1):34-40.
- García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, García Castro J, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(10):1453-68.
- Saei A, Hadjati J. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161(4):293-303.
- Nezafat Firizi M, Faramarzi M, Mousavi T, Entezami K, Sharifi A. Role of mesenchymal stem cells-secreted factors in prevention of collagen-induced arthritis in rats. *J North Khorasan Univ.* 2015;7(2):419-32.
- Reginster J, Bruyere O, Fraikin G, Henrotin Y. Current concepts in the therapeutic management of osteoarthritis with glucosamine. *Bull Hosp Jt Dis.* 2005;63(1/2):31.
- Mohsin M. Effects of glucosamine sulfate on primary knee osteoarthritis. *Al Ameen J Med Sci.* 2008;1(1):42-9.
- Hammad YH, Magid HR, Sobhy MM. Clinical and biochemical study of the comparative efficacy of topical versus oral glucosamine/chondroitin sulfate on osteoarthritis of the knee. *Egy Rheumatol.* 2015;37(2):85-91.
- Fallah MM, Daneshmandi H, Hajizadeh MA, Mirkarimpur SH. Effect of Aerobic Exercise with and without Quercetin Supplementation on Rat's Knee Osteoarthritis. *J Appl Exerc Physiol.* 2014. 2013; 9(18): 27-42.
- Roberts HM, Law RJ, Thom JM. The time course and mechanisms of change in biomarkers of joint metabolism in response to acute exercise and chronic training in physiologic and pathological conditions. *Eur J Appl Physiol.* 2019;119(11-12):2401-20.
- Malfait AM, Little CB. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):225.
- Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, Liakou C, Triantafillopoulos IK, Dontas I, et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2014;24(3):263-71.
- Wen ZH, Tang CC, Chang YC, Huang SY, Hsieh SP, Lee CH, et al. Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(9):1192-202.
- Ren G, Krawetz RJ. Biochemical Markers for the Early Identification of Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther.* 2018;22(6):671-82.
- Ohnishi A, Osaki T, Matahira Y, Tsuka T, Imagawa T, Okamoto Y, et al. Evaluation of the chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on a rabbit ACLT model using serum biomarkers. *J Vet Med Sci.* 2012:12-0240.
- Koenig TJ, Dart AJ, McIlwraith CW, Horadagoda N, Bell RJ, Perkins N, et al. Treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses using an intravenous combination of sodium pentosan polysulfate, N-acetyl glucosamine, and sodium hyaluronan. *Vet surg.* 2014;43(5):612-22.
- Arti HR, Azemi ME. Comparing the effect of glucosamine and glucosamine with alendronate in symptomatic relieve of degenerative knee joint disease: a double-blind randomized clinical trial study. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2012;7(3):87.
- Gibbs N, Diamond R, Sekyere EO, Thomas WD. Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series. *J Pain Res.* 2015;8:799.
- Li M, Luo X, Lv X, Liu V, Zhao G, Zhang X, et al. In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):160.
- van Buul G, Siebelt M, Leijts M, Bos P, Waarsing J, Kops N, et al. Mesenchymal stem cell therapy in a rat model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20:S275.
- Yang X, Zhu TY, Wen LC, Cao YP, Liu C, Cui YP, et al. Intraarticular injection of allogenic mesenchymal stem cells has a protective role for the osteoarthritis. *Chin Med J.* 2015;128(18):2516.
- Kersting UG, Stubendorff JJ, Schmidt MC, Brüggemann G-P. Changes in knee cartilage volume and serum COMP concentration after running exercise. *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(10):925-34.