مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۳، خرداد ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین هوازی و هیالورونیک اسید بر بیان ژن‌های MYOD و MURF-1 در موش‌های مدل تجربی آرتروز

سید حسن رسولی: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

پروین فرزانگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران. (* نویسنده مسئول) parvin.farzanegi@gmail.com

هاجر عباس زاده: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بررسی راهکارهای تقویت، رشد، بازسازی و مکانیسم‌های درگیر در نوسازی عضلات آسیب‌دیده و یا آتروفی شده در استئوآرتریت زانو می‌تواند به بهبود این بیماری کمک نماید. هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی و هیالورونیک اسید بر بیان ژن‌های MYOD و MURF-1 در موش‌های مدل تجربی آرتروز بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ ۸ هفته‌ای ویستار به ۵ گروه تقسیم شدند که شامل گروه‌های: ۱) کنترل-سالم، ۲) کنترل-بیمار، ۳) بیمار+ تمرین، ۴) بیمار+هیالورونیک اسید، ۵) بیمار+ تمرین+ هیالورونیک اسید بود. استئوآرتریت زانو با روش جراحی در موش‌ها انجام شد. در گروه هیالورونیک اسید، غلظت ۳۰ میکروگرم، یک بار در هفته و به مدت سه هفته دریافت نمودند. موش‌ها در گروه تمرین روی تردمیل حیوانات هفته‌ای پنج بار با سرعت ۱۶ تا ۱۸ متر در دقیقه تمرین می‌کردند. ۴۸ ساعت بعد از اتمام پروتکل، بافت‌های عضله دوقلو ایزوله شدند و بیان ژن‌های MYOD و MURF-1 با روش Real-Time PCR (RT-PCR) اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، در مقایسه با گروه آرتروز، بیان ژن MURF-1 در گروه هیالورونیک اسید، تمرین هوازی و هیالورونیک اسید+تمرین هوازی کاهش معناداری داشت ($p\leq ۰/۰۰۱$). بیان ژن MYOD در مقایسه با گروه بیمار و هیالورونیک اسید، افزایش معناداری در گروه تمرین ($p = ۰/۰۴$)، سالم، هیالورونیک اسید+تمرین مشاهده شد($p\leq ۰/۰۰۱$). گروه هیالورونیک اسید+تمرین نسبت به گروه تمرین افزایش معناداری داشت ($p\leq ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج این مطالعه، هیالورونیک اسید و تمرین ورزشی با شدت متوسط می‌توانند در بیان mRNA فاکتورهای MURF-1، MYOD عضله دوقلو پای آسیب‌دیده مداخله نمایند. از این‌رو ممکن است با مهار آتروفی، نقش مهمی در بهبود عضله سازی در موش‌های مدل استئوآرتریت داشته باشند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی،
هیالورونیک اسید،
استئوآرتریت،
MYOD،
MURF-1

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۳/۰۶

شیوه استناد به این مقاله:

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.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(3):48-58. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The effect of aerobic training and hyaluronic acid on expression of MYOD and MURF-1 genes in experimental arthritis model rats)

Seyed Hassan Rasouli: PhD Candidate, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
Pravin Farzanegi: Associate Professor, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (*Corresponding author) parvin.farzanegi@gmail.com
Hajar Abbaszadeh: Assistant Professor, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background & Aims: Osteoarthritis is the most common joint disease and its main pathological manifestation at the tissue level is local destruction of articular cartilage, which manifests itself in mobile joints by destruction of articular cartilage with new ossification at the surface and periphery of the affected joints (1). Research shows that several factors are involved in the formation of osteoarthritis. These include biochemical or systemic factors (such as genetics, aging, food intake, estrogen intake, bone density, and metabolic syndrome) and biomechanical factors such as muscle weakness, joint stiffness, and joint damage (2). Cell studies report that growth and regeneration of damaged muscle is done by satellite cells (5). Regarding the activation of satellite cells from the off state, studies show multiaxial processes in this field (7). Activation of The Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and a group of chain transcription factors including MURF-1 and myoD lead to the participation of these factors in the stages of myogenic development (5). Most studies on osteoarthritis of the knee joint have focused on the tissue of the knee joint, and the effect of non-surgical methods including hyaluronic acid injection and even exercise in osteoporosis of the knee on satellite cell activity or activation of MRFs and factors of chain transcription loop including myoD, the skeletal muscle involved in the knee joint of patients have not been studied or are difficult to access. The present study sought to answer the question whether hyaluronic acid injection and exercise affect the expression of MURF-1 and myoD genes in the gastrocnemius muscle of experimental osteoarthritis rats.
Methods: In this experimental study, 35 adult 8-week-old male Wistar rats were divided into 5 groups, which included: 1) control-healthy, 2) control-patient, 3) patient + exercise, 4) patient + hyaluronic acid, 5) patient + exercise + hyaluronic acid. Knee osteoarthritis was surgically treated in rats. In the hyaluronic acid group, they received a concentration of 30 micrograms once a week for three weeks. Rats in the exercise group exercised on animal treadmills five times a week at a speed of 16 to 18 m/min. 48 hours after the end of the protocol, gastrocnemius muscle tissues were isolated and the expression of MYOD and MURF-1 genes were measured by Real-Time PCR (RT-PCR).
Results: According to the calculated F value (5.4) and its significance at the level of P = 0.001, there is a significant difference between different groups. Figure 1 shows the expression of MURF-1 gene, a significant decrease in the healthy, exercise, hyaluronic acid, hyaluronic acid + exercise groups, compared with the patient group (p = 0.001). Hyaluronic acid + exercise group had a significant decrease compared to hyaluronic acid and exercise groups (p = 0.001). The expression values of MYOD gene according to the calculated F-value (26.47) and its significance at P = 0.001 level indicate the existence of significant differences between different research groups. Accordingly, in comparison with the patient and hyaluronic acid group, a significant increase was observed in the exercise group (P = 0.04), healthy, hyaluronic acid + exercise (P =

Keywords
Aerobic training,
Osteoarthritis,
Hyaluronic acid,
MYOD,
MURF-1

Received: 01/03/2021
Published: 27/05/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

0.001). The hyaluronic acid + exercise group had a significant increase compared to the exercise group (P = 0.001) (Figure 2).

Conclusion: The results of this study show that hyaluronic acid injection in osteoarthritis rats is associated with decreased expression of MURF-1 in gastrocnemius muscles. However, hyaluronic acid has no effect on MYOD expression. This result suggests that hyaluronic acid, by inhibiting MURF-1 expression, has the potential to inhibit skeletal muscle atrophy and, on the other hand, has no role in altering MYOD expression and muscle building. Because MYOD is a key protein in regulating muscle differentiation, it is essential for the initiation of muscle hypertrophy signaling and the activation and proliferation of satellite cells (12). To date, the role of hyaluronic acid in the signaling pathway of muscle building in osteoarthritis has not been studied, but, it is worth noting that the injection of hyaluronic acid into the injured knee joint in the treatment of osteoarthritis, is a collective agreement that has been reported in studies (17,18). Hyaluronic acid is part of the natural composition of cartilage and plays an important role in the viscoelasticity and lubrication of synovial and articular fluid and is one of the physiological factors of cartilage growth (12). Mechanism of action of hyaluronic acid through the number of living chondrocytes, creating repair thickness on the surface of cartilage, prevention of nitric oxide production in synovial and meniscus fluid, inhibition of chondrocyte apoptosis, decreased expression of metalloproteinase-3 (MMP-3) and interleukin-1-beta (IL-1β) in synovial fluid (12). Studies have also reported that the effect of hyaluronic acid on osteoarthritis may be associated with its protective effect on cartilage by inhibiting the expression of PPAR- ϒ gene. In this regard, it is stated that animals treated with hyaluronic acid showed lower expression of PPAR- ϒ than the saline group (19). Therefore, by improving the mobility of the knee joint, the possibility of muscle activity and mediation of the interventions of the muscle building pathway is provided. In the present study, aerobic exercise at 18 m/min was associated with decreased MURF-1 expression and increased MYOD expression in the injured gastrocnemius muscle. Consistent with the results of the present study, eight weeks of endurance training prevented atrophy and reduced rodent muscle volume by inhibiting the expression of the MURF-1 gene (20). A similar result was shown in the study of Agha Ali Nejad et al. In this study, resistance exercise for four weeks in diabetic rats was prevented by inhibiting MURF-1 gene expression of skeletal muscle atrophy (22). Also, in the combined groups of hyaluronic acid and exercise, each of these therapies had a synergistic effect on the expression of MURF-1 gene. Biological factors such as age and inflammatory and metabolic status of the samples seem to affect the signal pathway and markers of atrophy and muscle building, in which there are still many ambiguities, the need for further extensive studies is felt.

According to the results of this study, hyaluronic acid and moderate-intensity exercise can interfere with the expression of MURF-1, MYOD mRNA of the injured gastrocnemius muscle. Therefore, by inhibiting atrophy, they may play an important role in improving muscle building in osteoarthritis rats.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

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.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

مقدمه

استئوآرتریت یا آرتروز شایع‌ترین بیماری مفصلی است و اصلی‌ترین تظاهر آسیب‌شناسی (پاتولوژی) آن در سطح بافتی، تخریب موضعی غضروف مفصلی است که در مفاصل متحرک به وسیله تخریب غضروف مفصلی همراه با استخوان‌سازی جدید در سطح و حاشیه مفاصل درگیر تظاهر می‌کند (۱). تحقیقات نشان می‌دهد چندین عامل در شکل‌گیری استئوآرتریت نقش دارند. 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 از این دسته هستند (۲). با توجه به ظرفیت‌های پائین غضروف مفصلی در ترمیم خود به خودی و خون‌رسانی بسیار ضعیف این بافت، استراتژی‌های درمانی با چالش و ملاحظات ویژه‌ای مواجه هستند. در این راستا، درک سازوکارهای درون سلولی و مولکولی بافت‌های پیرامون زانو از جمله عضلات اسکلتی ممکن است اطلاعات مفیدی به همراه داشته باشد چرا که درد و التهاب ناشی از استئوآرتریت زانو موجب کاهش فعالیت و مهار عصبی- عضلانی در این افراد می‌شود. از این‌رو، این دو عامل نقش مهمی در کاهش عملکرد عضله دارد و در نهایت، کاهش عملکرد عضله با کاهش تحرک و ضعف افراد همراه می‌شود (۳). مطالعات گزارش دادند در افراد بیمار درد زانو علاوه بر ناپایداری مفصل، با ضعف عضلات درگیر و ناتوانی این بیماران در ارتباط است. همچنین در مطالعه دیگری گزارش شده است میزان ناتوانی در بیمار مبتلا به استئوآرتریت ممکن است با ضعف، تحلیل و یا آسیب عضلات درگیر در ارتباط باشد؛ بنابراین، با توجه به این که یکی از اهداف درمان این بیماران کاهش درد، حفظ تحرک مفصل و به حداقل رساندن ناتوانی در این افراد است (۴)، بررسی راهکارهای تقویت، رشد، بازسازی و مکانیسم‌های درگیر در نوسازی عضلات آسیب دیده و یا آتروفی شده در استئوآرتریت زانو می‌تواند به بهبود این بیماری کمک نماید. مطالعات سلولی گزارش دادند که رشد و بازسازی عضلات آسیب‌دیده توسط سلول‌های ماهواره ای اتفاق می افتد (۵). پس از تولد، تارچه‌های عضلانی با اضافه شدن هسته های فراهم شده توسط سلول های بنیادی به رشد خود ادامه می دهند. در حقیقت، اصلی‌ترین سلول‌های بنیادی عضله اسکلتی سلول های ماهواره‌ای نامیده می‌شوند که از نیم قرن پیش توسط مائورو کشف شد. به سبب موقعیت قرارگیری این سلول ها که بین غشای پایه و غشای پلاسمایی سلول عضلانی، این سلول ها به این نام خوانده می‌شوند. از سوی دیگر، سلول های تک‌هسته‌ای واقع در عضله اسکلتی ویژگی‌های بنیادی بودن یعنی قابلیت نوسازی و تمایز دارند (۶). در حالت طبیعی و در افراد سالم، این سلول‌ها از لحاظ تقسیم میتوزی خاموش هستند. ولی در پاسخ به سیگنال‌های هومئوستازی فیبر عضلانی سلول‌های ماهواره‌ای می توانند برای تولید مایوبلاست ها فعال شوند و در ادامه با تکثیر و تمایز مایوژنیک هسته‌ای، هسته‌های عضلانی را به وجود آورند. در خصوص فعال شدن سلول های ماهواره‌ای از حالت خاموش، بررسی ها نشان‌دهنده فرایندهای چند محوری در این زمینه است (۷). از جمله فعال شدن عوامل تنظیمی عضله سازی (Muscule regulator factors) (MRFs) و گروهی از عوامل حلقه رونویسی زنجیره‌ای شامل myoDوMURF-1 منجر به شرکت این عوامل در مراحل تکامل مایوژنیک می گردند (۵). 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 (۸). برنامه‌های ورزشی منظم با دوز مناسب به پیشگیری از کاهش قدرت عضله و مقاومت در برابر فعالیت‌های روزانه کمک می‌کند و سبب کنترل درد و پیشگیری از کاهش دامنه حرکتی مفصل می‌شود (۹). با وجود محدودیت مطالعات حیوانی و انسانی در خصوص تأثیر تمرینات ورزشی بر متغیرهای درگیر در مسیر سیگنالینگ عضله سازی در استئوآرتریت، مطالعات انسانی نشان داده شده در افراد سالم و جوان فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای با افزایش myoD و Pax-7 با انجام ۱۱ هفته تمرینات مقاومتی (۱۰) و همچنین چهار هفته تمرینات هوازی دویدن (۱۱) افزایش داشته است. مطالعات حیوانی نیز تأثیر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

تمرین بر بازسازی و هایپرتروفی را مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تمرین استقامتی با مهار بیان ژن MURF-1 از کاهش حجم عضلات جوندگان جلوگیری می‌کند (۵). از روش‌های دیگر در خصوص روش‌های درمانی استئوآرتریت که نشان‌دهنده شیوع روش‌های غیرجراحی در سطح وسیعی است، می‌توان به تزریق هیالورونیک اسید (۱۲) اشاره نمود. رئیس السادات (Raeissadat) و همکارانش در سال ۲۰۱۸ به این نتیجه رسیدند که هر دو روش درمانی هم ازن تراپی و هم هیالورونیک اسید در درمان بیماران استئوآرتریتی زانو مؤثر می‌باشد (۱۳). تأثیر هیالورونیک اسید و پرولوتراپی در بیماران استئوآرتریت مورد مطالعه هاشمی و همکاران (۱۳۹۱) قرار گرفت. در این مطالعه تغییرات نمره‌ها نسبت به میزان پایه پس از درمان بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۱۲). بودین و همکاران نیز در مجموع به نظر می‌رسد بیشتر مطالعات انجام یافته در استئوپروز مفصل زانو متمرکز بر بافت مفصل زانو بوده است و تأثیر روش‌های غیر جراحی شامل تزریق هیالورونیک اسید و حتی تمرینات ورزشی در استئوپروز زانو بر فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای یا فعال شدن عوامل تنظیم عضله سازی (MRFs) و عوامل حلقه رونویسی زنجیره ای شامل myoD، عضلات اسکلتی درگیر در مفصل زانوی بیماران مطالعه ای انجام نگرفته و یا دسترسی به آن دشوار است. تحقیق حاضر به دنبال پاسخ این سؤال است که آیا تزریق هیالورونیک اسید و تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های MURF-1 و myoD عضله دوقلو موش های مدل تجربی استئوآرتریت تأثیر دارد؟

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. موش‌های مورد مطالعه، ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ ۸ هفته‌ای ویستار بودند که تکثیر آن‌ها در مرکز پژوهش دانشگاه آزاد واحد ساری در سال ۱۳۹۸ انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند که شامل گروه‌های: ۱) کنترل-سالم، ۲) کنترل-بیمار، ۳) بیمار+ تمرین، ۴) بیمار+هیالورونیک اسید، ۵) بیمار+ تمرین+ هیالورونیک اسید بود. آزمودنی‌ها در طی مراحل پژوهش، در محیطی با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵±۵۰ درصد به همراه تهویه مناسب نگهداری شدند. غذا و آب مورد نیاز آن‌ها به صورت آزاد در اختیار آنان قرار گرفت. القای استئوآرتریت با روش جراحی برگرفته از مطالعه مالفیت و لیتل (۲۰۱۵) بود. موش‌ها به وسیله کتامین (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلاسین (۳-۵ mg/kg) بیهوش شدند. سپس از زانوی راست یک برش یک سانتی‌متری برای ظاهر ساختن مفصل زانو ایجاد شد. مفصل زانو بلافاصله با جابجایی جانبی استخوان کشکک و لیگامان پتلار باز و یک برش طولی در قسمت مدیال زانو ایجاد شد. جابجایی جانبی پتلا و لیگامان پتلا توسط فورسپس انجام شد و سپس یک برش ناقص در لیگامان صلیبی داخلی بدون آسیب به غضروف مفصلی و دیگر لیگامنت ها ایجاد شد. در نهایت کپسول مفصلی با ۶ بخیه قابل جذب و پوست نیز با ۶ بخیه ابریشمی بسته شد (۱۴). پروتکل تمرینی یک ماه پس از القای استئوآرتریت صورت گرفت. کل دوره تمرین شامل دو مرحله بود. در مرحله اول که مرحله ایجاد آشنایی با محیط پژوهش و نوار گردان بود، به مدت یک هفته موش‌ها، ۴ روز، هر روز به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد بر روی تردمیل فعالیت کردند. مرحله دوم که تمرین اصلی بود، در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۵). در زانوی جراحی شده، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از مبتلا شدن به استئوآرتریت زانو، تزریق ۳۰ میکرولیتر (µL) هیالورونیک اسید با وزن مولکولی ۶۰ تا ۱۲۰ کیلودالتون و ویسکوزیته ۱۶۵۰ کیلودالتون محصول کشور ژاپن (ARTZ-Dispo HA (weight-average molecular weight [MW], 60–120 kDa; viscosity-average MW, 1,650 kDa; Seikagaku, Tokyo, Japan). در گروه‌های مربوطه انجام گرفت (۱۶). 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، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی گرم بازای هر کیلوگرم) و زایلاسین (۵ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن) با نسبت ۵ به ۲ بی هوش و ساکریفایز شدند. سپس عضله دوقلوی پای راست جدا شده پس از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

جدول ۱- مراحل اجرای پروتکل تمرینی

عوامل تمرینی	هفته							
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
سرعت نوار گردان (متر/دقیقه)	۱۶	۱۶	۱۶	۱۷	۱۷	۱۸	۱۸	۱۸
مدت تمرین در هر جلسه (دقیقه)	۲۵	۲۹	۳۲	۳۵	۳۷	۴۰	۴۲	۴۴

شستشو با آب مقطر و توزین وزن، و در دمای ۷۰- فریز شد. تمامی بافت فریز شده پس از پودر شدن (ساییده شدن) در نیتروژن مایع، در بافر پروتئاز (PBS، PH 4.7) هموژنیزه شده سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول در دمای منفی ۸۰ درجه منجمد شدند تا برای آنالیز شیمیایی به روش RT- PCR مورد استفاده قرار گیرد. در فرآیند اندازه گیری mRNA، مقدار ثابتی از محلول هموژنیزه شده بافتی در داخل میکروتیوب RNase free منتقل شد و روی آن یک سی سی ترایزول (شرکت THERMO) 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. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده و اطمینان از عدم آلودگی به DNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ (شرکت THERMO FISHER) 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. همچنین جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA تام، نمونه ها با آنزیم DNase تیمار شد. در روش RT- PCR، با استفاده از دستورالعمل کیت ساخت کشور امریکا (cDNA synthesis kit; Invitrogen, San Diego, CA)، ابتدا cDNA از mRNA استخراج شد و فرایند محصول تکمیل شد. سطوح mRNA متناسب با ژن مرجع و GAPDH، و برآورد سطوح بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta Ct}$ درنظر گرفته شد. در تجزیه و تحلیل توصیفی داده ها، شاخص های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. هم چنین برای بررسی و تغییرات معنی داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معناداری برای تمام محاسبات $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری نیز با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

یافته‌ها

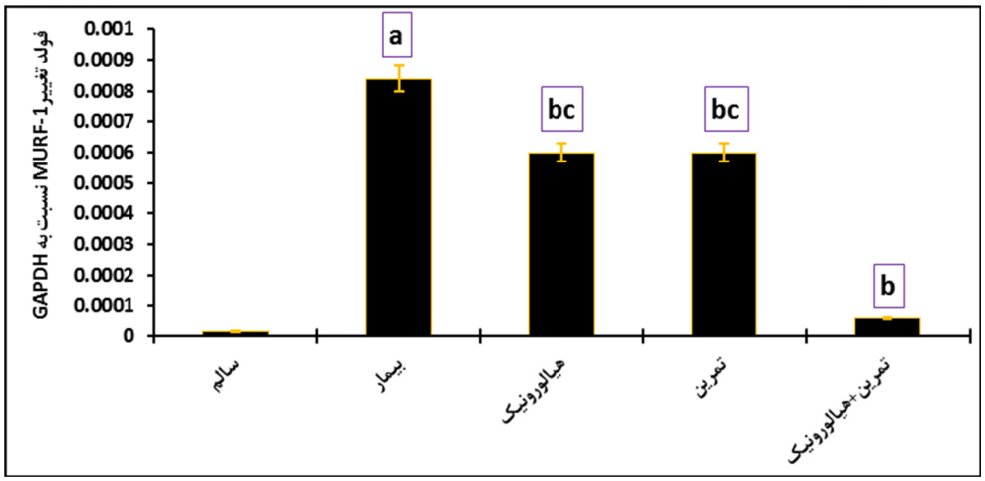
با توجه به ارزش F محاسبه شده (۵/۴) و معنادار بودن آن در سطح p=۰/۰۰۱ تفاوت معنی دار در بین گروه‌های مختلف وجود دارد. در نمودار ۱ میزان بیان ژن MURF-1، کاهش معناداری در گروه سالم، تمرین، هیالورونیک اسید، هیالورونیک اسید+ تمرین، در مقایسه با گروه بیمار، نشان می‌دهد (p =۰/۰۰۱). گروه هیالورونیک اسید+تمرین نسبت به گروه‌های هیالورونیک اسید و تمرین کاهش معناداری داشت (p =۰/۰۰۱).

مقادیر بیان ژن MYOD نیز با توجه به ارزش F محاسبه شده (۲۶/۴۷) و معنادار بودن آن در سطح p=۰/۰۰۱ بیانگر وجود تفاوت معنی دار در بین گروه‌های مختلف پژوهش است. براین اساس، در مقایسه با گروه بیمار و هیالورونیک اسید، افزایش معناداری در گروه تمرین (p =۰/۰۴)، سالم، هیالورونیک اسید+تمرین مشاهده شد (p =۰/۰۰۱). گروه هیالورونیک اسید+تمرین نسبت به گروه تمرین افزایش معناداری داشت (p =۰/۰۰۱) (نمودار۲).

بحث

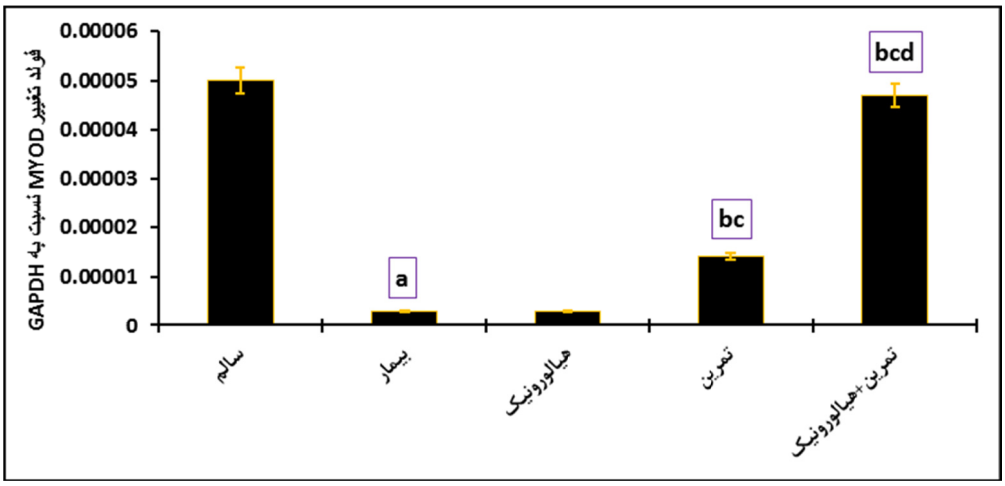
یافته‌های این پژوهش نشان داد تزریق هیالورونیک اسید در موش‌های مدل استئوآرتریت با کاهش بیان MURF-1 عضله دوقلو پای آسیب‌دیده همراه شد. با این وجود، هیالورونیک اسید بر بیان MYOD تاثیری نداشت. این نتیجه درواقع بیانگر این مطلب است که

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]



a: نسبت به گروه سالم، b: نسبت به گروه بیمار، c: نسبت به گروه تمرین+هیالورونیک.

نمودار ۱- مقایسه میانگین بیان MURF-1 در عضله دوقلو پای آسیب دیده



a: نسبت به گروه سالم، b: نسبت به گروه بیمار، c: نسبت به گروه هیالورونیک، d: نسبت به گروه تمرین

نمودار ۲- مقایسه میانگین بیان MYOD در عضله دوقلو پای آسیب دیده

هیالورونیک اسید از یک سو، با مهار بیان MURF-1، پتانسیل مهار آتروفی در عضله اسکلتی را به نمایش گذاشته است و از سوی دیگر، نقشی در تغییر بیان MYOD و عضله زایی نداشته است. چرا که MYOD یک پروتئین کلیدی در تنظیم تمایزپذیری عضله است و وجود آن برای شروع سیگنالینگ هایپرتروفی عضلانی و فعال شدن و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای ضروری است (۱۲). تاکنون، نقش هیالورونیک اسید در مسیر سیگنالینگ عضله سازی در استئوآرتریت مورد مطالعه قرار نگرفته است، ولی، شایان ذکر است تزریق هیالورونیک اسید در داخل مفصل زانوی آسیب‌دیده در درمان استئو آرتریت، مورد توافق جمعی است که در مطالعات گزارش شده است (۱۷، ۱۸). هیالورونیک اسید جزئی از ترکیب طبیعی غضروف است و نقش مهمی در خاصیت ویسکوالاستیسیته و لوبریکانت مایع سینوویال و مفصل دارد و یکی از فاکتورهای فیزیولوژیک رشد غضرف بشمار می‌آید (۱۲). مکانیسم اثر هیالورونیک اسید از طریق تعداد کندروسیت های زنده، ایجاد ضخامت ترمیم در سطح غضروف، پیشگیری از تولید نیتریک اکساید در مایع سینوویال و مینیسک، مهار آپوپتوز کندروسیت ها، کاهش بیان متالوپروتئیناز-۳ (MMP-3) و اینترلوکین-یک-بتا(IL-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

1β) در مایع سینوویال است (۱۲). همچنین مطالعات گزارش دادند تأثیر هیالورونیک اسید در استئوآرتریت ممکن است با اثر محافظتی آن بر غضروف همراه با مهار بیان ژن PPAR-γ همراه باشد. در این ارتباط بیان شد که در حیواناتی که تحت درمان با هیالورونیک اسید بودند، در مقایسه با گروه سالین، بیان کمتری از PPAR-γ را نشان دادند (۱۹). بنابراین با بهبود جنبش پذیری مفصل زانو، احتمال فعالیت عضلات درگیر و میانجیگری مداخله گرهای مسیر عضله سازی فراهم می‌شود. در پژوهش حاضر تمرین ورزشی هوازی بصورت ۱۸ متر بر دقیقه با کاهش کاهش بیان MURF-1 و افزایش بیان MYOD عضله دوقلو پای آسیب‌دیده همراه شد. همراستا با نتیجه پژوهش حاضر، هشت هفته تمرین استقامتی با مهار بیان ژن MURF-1 از آتروفی و کاهش حجم عضلات جوندگان جلوگیری نموده است (۲۰). کاظمی و سلامان (۱۳۹۸) نشان دادند که چهار هفته تمرین اینتروال با شدت بالا با کاهش بیان ژن MURF-1 در عضلهٔ بازکنندهٔ طویل انگشتان پای موش‌های مسن می‌شود (۲۱). نتیجه مشابهی در مطالعه آقاعلی نژاد و همکاران نشان داده شد. در این مطالعه، تمرین مقاومتی در مدت چهار هفته در موش‌های صحرایی دیابتی شده، با مهار بیان ژن MURF-1 از آتروفی عضلات اسکلتی جلوگیری شده است (۲۲). همچنین در گروه‌های ترکیبی هیالورونیک اسید و تمرین ورزشی، هر یک از درمان های یاد شده اثر هم افزایی در بیان ژن MURF-1 داشته است. بنظر می‌رسد عوامل بیولوژیکی مانند سن و وضعیت التهابی و متابولیکی حاکم بر نمونه ها مسیر سیگنالی و نشانگرهای آتروفی و عضله سازی را متاثر سازند که در این زمینه هنوز ابهامات زیادی وجود داشته، نیاز به مطالعات گسترده بیشتر احساس می‌شود. در این ارتباط می‌توان به برخی از مطالعات اشاره نمود. چن و همکاران (۲۰۱۹) الگوی تغییرات سیگنالی در مسیر آتروفی و هایپرتروفی در موش‌های صحرایی چهار، هشت و ۱۶ ماهه در پاسخ به یک دوره محدودیت کالری ۱۴ هفته ای را وابسته به سن دانست. در این مطالعه پاسخ AKT, mTOR, S6K 4EBP1 ,FOXO3a, atrogin, MuRF1, در سنین مختلف در وضعیت محدودیت کالری یکسان نبود (۲۳). از سوی دیگر، برخی مطالعات نشان دادند که سازوکارهای درگیر در مسیر آتروفی عضلات اسکلتی به التهاب سیستمی و نشانگرهای التهابی وابسته است (۲۴). بنابراین، افزایش سطوح سایتوکین های کاتابولیکی و فیبروزی در وضعیت التهاب سیستمی افزایش می یابد (۲۵). سایتوکین های پیش التهابی مختلف و عوامل مشتق از تومورها مسیرهای پائین دست P38MAPK و NF-κB را فعال نمایند که بعنوان میانجیگر آتروفی عضلات شناخته می‌شوند (۲۶). فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) نیز از طریق مسیرp38mapk و NF-κB بیان لیگازهایMuRF1 را در عضلات اسکلتی افزایش می‌دهد (۲۷). در یک مطالعه کارآزمایی بالینی، هلمارک (Helmark) و همکارانش نشان دادند که تمرینات ورزشی به صورت معنی داری بیان IL-10 را هم در درون مفصل و هم در پری سینویال را در بیماران مبتلا به استئوآرتریت افزایش می‌دهد (۲۸). همسو با آن ها روجاز اورتگا (Rojas-Ortega) و همکاران نشان دادند که تمرینات ورزشی باعث بهبود بیان ژن IL-10 در غضروف مفصلی موش‌های مبتلا به آرتروز زانو می‌شود (۲۹). افزایش بیان و تولید IL-10 در طول ورزش امکان دارد به دلیل مهار تولید سایتوکاین های پیش التهابی نظیر TNF-α، IL-8 و IL-6 باشد که متعاقب آن منجر به بهبود درمان بیماری می‌شود (۲۸). مطالعات نشان دادند که تحریکات مکانیکی، سیگنال‌های قویتری در جهت جلوگیری از بیان ژن فاکتورهای التهابی در کندروسیت ها ارسال می کنند (۳۰). علاوه برآن، نشان داده شد که تمرینات ورزشی با کاهش فاکتورهای التهابی مانند IL-1B می‌توانند در بایوژنز میتوکندری و بهینه نمودن همئوستاز انرژی کندروسیت ها نقش داشته باشند. به نظر می‌رسد که عوامل متعدد مانند نوع ورزش، شدت بیماری و مدت تمرین ممکن است در بهبود بیماری نقش داشته باشد و باید بیشتر در نظر گرفته شود. بنابراین ممکن است بهبود وضعیت التهابی ناشی از تمرینات با شدت متوسط در پژوهش حاضر، در بهبود و مهار شرایط آتروفی عضلات درگیر در استئوآرتریت زانو نقش داشته باشد. بخوبی پذیرفته شده است که انواع تحریکات مکانیکی سبب پاسخ فیزیولوژیکی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

مختلف می‌شود (۳۱) و فعالیت‌های مناسب ورزشی با سودمندی هایی مانند کاهش درد و بهبود جنبش پذیری در استئوآرتریت به همراه است (۳۲). از سوی دیگر، به دلیل وجود سنسورهای حساس به استرس مکانیکی، کندروسیت ها نیز در شرایط آنابولیک قرار گرفته، می‌توانند سنتز ماتریکس خارج سلولی را در پاسخ به استرس مکانیکی افزایش دهند (۳۳). یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی تأثیر تمرینات ورزشی بر بازسازی عضلات و مهار آتروفی عضلات، ممکن است به بهبود وضعیت متابولیکی و فراهمی گلوکز در بافت عضله اسکلتی مرتبط باشد. نشان داده شد افزایش گلوکز خارج سلولی حتی به میزان پنج درصد، با افزایش IGF-1 و IGF-2 در مزانشیال سلولی و TGFB1 در سلول‌های تک‌هسته‌ای و PDGF-B (فاکتور رشد بی مشتق از پلاکت) در سلول‌های مزانشیال و اندوتلیال، bFGF در فیبروبلاست ها و CTGF (فاکتور رشد باقت نرم) در برخی سلول‌ها می‌شود (۳۴). همچنین گزارش شده است که فراهمی گلوکز در سلول‌های منونوکلئال خون، از پیشرفت عملکرد مخرب اینترلوکین ها از جمله IL-2، IL-6 و IL-10جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر، پاسخ سلولی به افزایش، فراهمی و تماس گلوکز سریع است و میزان DNA مربوط به تولید فاکتورهای رشدی سرعت می گیرد (۳۵).

نتیجه‌گیری

در مجموع، این پژوهش نشان داد که ترکیبی از روش درمانی هیالورونیک اسید و تمرینات ورزشی با شدت متوسط اثر نسبتا مثبتی را در تنظیم نشانگرهای مسیر سیگنالینگ عضله سازی و آتروفی عضله دوقلو مانند بیان mRNA فاکتورهای MURF-1 و MYOD در موش‌های مدل استئوآرتریت زانو اعمال می‌کند. از محدودیت های تحقیق حاضر عدم اندازه گیری سطوح پروتئینی بود، از این‌رو، اندازه گیری سطوح پروتئینی در کنار بیان ژن در مطالعات بعدی می‌تواند به درک بهتر مسیرهای سیگنالینگ درگیر در عضله سازی یا آتروفی عضلات درگیر زانوی آسیب‌دیده در وضعیت استئوآرتریت منجر شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مسئولان آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به دلیل همکاری های لازم سپاسگزاری می نمایند.

تأییدیه اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات و استفاده از آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تایید شده است (شماره مجوز تصویب:IR.IAU.REC.1398.33).

References

1. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 2011;23(5):492.
2. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). Osteoarthr Cartil. 2013; 21(1):16-21.
3. 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.
4. Shayesteh Aza M, Kariminasab MH, Sajjadi Saravi M, Shafiei SE, Daneshpoor SM, Hadian A, et al. Relationship between Pain and Disability Levels of Patients with Knee Osteoarthritis and Muscle Weakness, Deformity and Radiographic Changes. J Maz Univ Med Sci. 2012;21(86):85-92. [In Persian]
5. Bazgir B, Asgari A. The Interactive role of exercise and satellite cells in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. EBNESINA. 2015;16 (4) :47-63. [In Persian]
6. 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.
7. Morgan JE, Gross JG, Pagel CN, Beauchamp JR, Fassati A, Thrasher AJ, Di Santo JP, Fisher IB, Shiwen X, Abraham DJ, Partridge TA. Myogenic cell proliferation and generation of a reversible tumorigenic phenotype are triggered by preirradiation of the recipient site. J Cell Biol. 2002;157(4):693-702.
8. Wallace IJ, Worthington S, Felson DT, Jurmain RD, Wren KT, Maijanen H, Woods RJ, Lieberman DE. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. Proc Natl Acad Sci. 2017;114(35):9332-6.
9. Carvalho NA, Bittar ST, Pinto FR, Ferreira M, Sitta RR. Manual for guided home exercises for osteoarthritis of the knee. Clinics. 2010;65(8):775-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

80.
10. Hanssen KE, Kvamme NH, Nilsen TS, Rønnestad B, Ambjørnsen IK, Norheim F, Kadi F, Hallen J, Drevon CA, Raastad T. The effect of strength training volume on satellite cells, myogenic regulatory factors, and growth factors. Scand J Med Sci Sports. 2013;23(6):728-39.
11. Oishi Y, Tsukamoto H, Yokokawa T, Hirotsu K, Shimazu M, Uchida K, Tomi H, Higashida K, Iwanaka N, Hashimoto T. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. J Appl Physiol. 2015;118(6):742-9.
12. Hashemi SM, Madadi F, Razavi S, Nikooseresht M, Kiyabi FH, Nasiripour S. Intra-articular hyaluronic acid injections Vs. dextrose prolotherapy in the treatment of osteoarthritic knee pain. Tehran Uni Med J. 2012;70(2):119-25. [In Persian]
13. Raeissadat SA, Rayegani SM, Forogh B, Abadi PH, Moridnia M, Dehgolan SR. Intra-articular ozone or hyaluronic acid injection: which one is superior in patients with knee osteoarthritis? A 6-month randomized clinical trial. J Pain Res. 2018;11:111.
14. Malfait AM, Little CB. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 2015;17(1):225.
15. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, Liakou C, Triantafillopoulos IK, Dontas Iet al. Useful animal models for the research of osteoarthritis. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2014;24(3):263-71.
16. Jimbo SH, Terashima Y, Teramoto A, Antinociceptive effects of hyaluronic acid on monoiodoacetate-induced ankle osteoarthritis in rats. J Pain Res. 201912: 191–200.
17. Petrella RJ, DiSilvestro MD, Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Arch Intern Med. 2002;162(3):292-8.
18. Bunyaratavej N, Chan KM, Subramanian N. Treatment of painful osteoarthritis of the knee with hyaluronic acid. Results of a multicenter Asian study. J Med Assoc Thai. 2001;84 Suppl 2:S576-81.
19. Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. Front Vet Sci. 2019;6:192.
20. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science. 2001;294(5547): 1704-1708.
21. Kazemi A, Barbat S. The Effect of High Intensity Interval Training on Gene Expression of MuRF1 and TRAF6 in Extensor Digitorum Longus (EDL) Muscle of Aged Mice. J Sports Biol Sci. 2019;11(2):225-237. [In Persian]
22. Panahi S, Agha-Alinejad H, Gharakhanloo R, Fayazmilani R, Hedayati M, Safarzadeh A, Zarkesh M. The Effect of 4 Weeks Resistance Training on Murf1 Gene Expression and Muscle Atrophy in Diabetic Wistar Rats. Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv. 2016;38(2):6-13. [In Persian]
23. Chen CN, Liao YH, Tsai SC. Age-dependent effects of caloric restriction on mTOR and ubiquitin-proteasome pathways in skeletal muscles. Geroscience. 2019;41(6):871-880.
24. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat Rev Immunol. 2011;11(9):607.
25. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. Curr Opin Support Palliat Care. 2009;3(4):263-8.
26. Zapata JM, Lefebvre S, Reed JC. Targeting TRAfs for therapeutic intervention. InTNF Receptor Associated Factors (TRAFs). Springer NY 2007;pp. (188-201).
27. Adams V, Mangner N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S, et al. Induction of MuRF1 is essential for TNF-α-induced loss of muscle function in mice. J Mol Biol. 2008;384(1):48-59.
28. Helmark IC, Mikkelsen UR, Børglum J, Rothe A, Petersen MC, Andersen O, Langberg H, Kjaer M. Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. Arthritis Res Ther. 2010;12(4):R126.
29. Rojas-Ortega M, Cruz R, Vega-López MA, Cabrera-González M, Hernández-Hernández JM, Lavalle-Montalvo C, et al. Exercise modulates the expression of IL-1β and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats. Pathol Res. Pract 2015;211(6):435-43.
30. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reprod Biomed. 2004;8(6):616-27.
31. Grad S, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. Clin Orthop Relat Res. 2011;469(10):2764-72.
32. Barbour KE, Hootman JM, Helmick CG, Murphy LB, Theis KA, Schwartz TA, et al. Meeting physical activity guidelines and the risk of incident knee osteoarthritis: A population-based prospective cohort study. Arthritis Care Res. 2014;66(1):139-46.
33. Harvey LA, Brosseau L, Herbert RD. Continuous passive motion following total knee arthroplasty in people with arthritis. Cochrane Database Syst Rev. 2014;(2).
34. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]

factor and other genes in human mesangial cells. J Biol Chem. 1999;274(9):5830-4.

35. Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M. Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. Diabetes. 1996;45(4):507-12.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-09-02]