COMPLEMENTARY MEDICINE JOURNAL
Volume 14, Issue 3, Autumn 2024
https://cmja.arakmu.ac.ir/

Research Article

Investigating the Effects of Aerobic Training and Stem Cell Therapy on the Expression of TNFα Gene and MMP13 Protein in Knee Cartilage Tissue in Male Rats of Osteoarthritis Model

Hamidreza Sharifi[1], Zaher Etamad[2*], Kamal Azizbeigi[2], Parvin Farzanegi[3]

[1] PhD Candidate in Exercise Physiology, Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[2] Assistant Professor in Exercise Physiology, Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[3] Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

*** Corresponding author:** Zaher Etemad, Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. Email: zetemad2002@yahoo.com

DOI: 10.32592/cmja.14.3.57

How to Cite this Article:
Sharifi H R, Etamad Z, Azizbeigi K, Farzanegi P. Investigating the Effects of Aerobic Training and Stem Cell Therapy on the Expression of TNFα Gene and MMP13 Protein in Knee Cartilage Tissue in Male Rats of Osteoarthritis Model. *Complement MedJ*. 2024;14(3): 57-66. DOI: 10.32592/cmja.14.3.57

Received: 30 May 2024
Accepted: 04 Nov 2024

Keywords:
Endurance training
Exercise
Mesenchymal stem cells
Stem cell injection
Therapeutic interventions

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Exercise and stem cell therapy have promising effects on the management of osteoarthritis. Tumor necrosis factor-α (TNFα) and matrix metalloproteinase-13 (MMP13) are two important factors related to joint inflammation and cartilage destruction. The present study examines the effects of aerobic training and stem cell injection on the expression of the TNFα gene and MMP13 protein in knee cartilage tissue in male rats with osteoarthritis.

Materials and Methods: In the present experimental study, 25 rats were randomly divided into healthy, osteoarthritis, osteoarthritis-exercise, osteoarthritis-stem cell, and osteoarthritis-stem cell-exercise groups and received interventions based on the group name. Endurance training was performed for eight weeks (5 sessions/week, 30-50 minutes/session, and at a speed of 16 meters/minute) on a non-inclined treadmill. Mesenchymal stem cells (1x106 cells/kg) were injected once to the respective groups. Forty-eight hours after the last training session, cartilage tissue was removed and sent to the laboratory. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used to determine the difference between groups. All calculations were done with SPSS software, and the significance level was considered as $P \leq 0.05$.

Results: TNFα gene expression was higher in the osteoarthritis group than in the healthy group (P=0.027). There was no other significant difference in TNFα gene expression between the groups. MMP13 protein expression was higher in osteoarthritis (P=0.001), osteoarthritis-exercise (P=0.003), osteoarthritis-stem cell (P=0.011), and osteoarthritis-stem cell-exercise (P=0.001) groups than in the healthy group. MMP13 protein expression in osteoarthritis-exercise (P=0.001), osteoarthritis-stem cell (P=0.001), and osteoarthritis-stem cell-exercise (P=0.001) groups was lower than the osteoarthritis group. There was no other significant difference in the expression of MMP13 protein between the groups.

Conclusion: Endurance training and stem cell therapy have a positive role in modulating MMP13 protein expression, which supports the potential of these two interventions to improve osteoarthritis.

Copyright © 2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

Osteoarthritis is a degenerative joint disease that affects millions of people worldwide. It is characterized by the gradual breakdown of cartilage in the joints, leading to pain, stiffness, and loss of function. Osteoarthritis is characterized by progressive degeneration of articular cartilage and ligaments, as well as chronic synovitis and abnormal bone remodeling (Sellam and Berenbaum, 2010).

While there are several treatment options for osteoarthritis, there is still a great need for more effective and long-lasting interventions. Recent research has shown that regular aerobic activity and stem cell therapy may have promising effects on osteoarthritis management.

Tumor necrosis factor-α (TNFα) is involved in various physiological and pathological processes, including regulation of immune cells, apoptosis (programmed cell death), and granuloma formation (Jang, Lee et al., 2021). TNFα promotes the production of matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are enzymes that break down extracellular matrix components, including cartilage. An increase in the level of TNFα in the joint space leads to an increase in the expression of MMP and, as a result, cartilage degradation (Mukherjee and Das, 2024). MMP13 is an enzyme that plays a vital role in the degradation of extracellular matrix components, especially type II and type I collagen (key structural proteins in cartilage and other connective tissues) (Mukherjee and Das, 2024).

The present study investigates the independent and interactive effects of aerobic exercise and stem cell injection on TNFα gene expression and MMP13 protein expression in knee cartilage tissue in male rats with osteoarthritis model.

METHODS

The current experimental research was conducted on 25 male Wistar rats (age: 8-12 weeks, weight: 180-200 g). The animals were kept in standard and controllable conditions in the research center of laboratory animals in Islamic Azad University, Sari branch. The animals were randomly divided into five groups: healthy, osteoarthritis, osteoarthritis-exercise, osteoarthritis-stem cell, osteoarthritis-stem cell-exercise, and received interventions based on the group name. Endurance training was performed for eight weeks (5 sessions/week, 30-50 minutes/session, and at a speed of 16 meters/minute) on a non-inclined treadmill. Mesenchymal stem cells (1x106 cells/kg) were injected once to the respective groups. Forty-eight hours after the last training session, cartilage tissue was removed and sent to the laboratory. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used to determine the difference between groups. All calculations were done with SPSS software, and the significance level was considered as $P \leq 0.05$.

RESULTS

The results of the one-way analysis of variance regarding the TNFα variable showed that there was a significant difference between the research groups (P=0.046, F=2.937). TNFα gene expression was significantly higher in the osteoarthritis group than in the healthy group (P=0.027). No other significant changes were observed between the research groups.

Analysis of data related to MMP13 protein expression using one-way analysis of variance test showed that there was a significant difference between the research groups (P=0.001, F=124.614). MMP13 protein expression of cartilage tissue in osteoarthritis (P=0.001), osteoarthritis-exercise (P=0.003), osteoarthritis-stem cell (P=0.011), and osteoarthritis-exercise-stem cell (P=0.001) groups were significantly higher than that in the healthy group. MMP13 protein expression of cartilage tissue in osteoarthritis-exercise (P=0.001), osteoarthritis-stem cell (P=0.001), and osteoarthritis-exercise-stem cell (P=0.001) groups was significantly lower than that in the osteoarthritis group. There were no other significant differences between the groups.

The observed increase in TNFα and MMP13 variables supports the common understanding that inflammation and cartilage destruction are key processes involved in the progression of osteoarthritis. TNFα, as a pro-inflammatory cytokine, can initiate and perpetuate inflammatory responses in the joint and lead to cartilage degradation (Wojdasiewicz, Poniatowski et al., 2014). MMP13, as the enzyme responsible for collagen degradation, further contributes to cartilage matrix degradation (Troeberg and Nagase, 2012). Therefore, targeting these molecular signaling pathways, as shown by the effects of physical activity and stem cell therapy on their expression, may have therapeutic potential in the management of osteoarthritis.

In the present study, analyzing the TNFα gene expression results in the treatment groups indicates that the interventions (aerobic exercise, stem cell therapy, and the combination of exercise and stem cells) have partially altered the elevated expression of TNFα caused by osteoarthritis. However, these changes were not statistically significant. The increased protein expression of MMP13 in the cartilage tissue of the induced osteoarthritis groups was modified by exercise, the use of stem cells, and their interaction; nevertheless, there was no difference between the groups with different treatments. TNFα leads to inflammation by causing inflammation, and MMP13 causes cartilage breakdown by breaking down collagen. Past studies showed that inflammatory factors regulate MMPs. Inhibiting the synthesis and/or activity of MMPs is highly important in the development of structural modification therapies for osteoarthritis. Considering the lack of change in TNFα due to the interventions and the change in MMP13 due to the interventions, it seems that inflammatory factors other than TNFα have an effect on the expression of MMP13 protein in the present study.

CONCLUSION

The results of this study showed that the expressions of the TNFα gene and MMP13 protein increased in knee cartilage tissue in the rat model of arthritis. The use of regular aerobic activity and treatment with stem cells showed promising effects in modulating the expression of MMP13, which can be considered a therapeutic intervention to improve osteoarthritis by suppressing this protein. The results of the present study also showed that inflammatory factors other than TNFα seem to have an effect on the expression of MMP13 protein. Therefore, to find the exact mechanism of MMP13 changes, future studies are needed to investigate the changes of other inflammatory factors, such as interleukins, transcription factors (e.g., NFKB and AKT), and PI3K proteins.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All principles of working with laboratory animals approved by the Ministry of Health of the Islamic Republic of Iran were observed in this study. The current research has the ethics code number IR.IAU.SDJ.REC.1402.093 from Islamic Azad University, Sanandaj Branch.

Funding

There is no funding support.

Authors' Contributions

This article is a part of Hamidreza Sharifi's doctoral dissertation, which was approved at Islamic Azad University, Sanandaj Branch, under the guidance and advice of co-authors. All authors contributed to the writing of the article and approved the final version of the article.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We appreciate everyone who provided scientific consultation for this paper.

مجله طب مکمل

دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳

https://cmja.arakmu.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات تمرین هوازی و سلول بنیادی درمانی بر بیان ژن TNFα و پروتئین MMP13 بافت غضروف زانو در موش‌های صحرایی نر مدل استئوآرتریت

حمیدرضا شریفی[۱]، ظاهر اعتماد[۲*]، کمال عزیزبیگی[۲]، پروین فرزانگی[۳]

[۱] دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت‌بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

[۲] گروه تربیت‌بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

[۳] گروه فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

[*] **نویسنده مسئول:** طاهر اعتماد، گروه تربیت‌بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. ایمیل: zetemad2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴

واژگان کلیدی:

تزریق سلول بنیادی

تمرین استقامتی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مداخلات درمانی

ورزش

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: ورزش و سلول بنیادی درمانی اثرات امیدوارکننده‌ای بر مدیریت استئوآرتریت دارند. TNFα و MMP13 دو فاکتور مهم در ارتباط با التهاب مفاصل و تخریب غضروف هستند. مطالعه حاضر به بررسی اثرات تمرین هوازی و تزریق سلول بنیادی بر بیان ژن TNFα و پروتئین MMP13 بافت غضروف زانو در موش‌های صحرایی نر مدل استئوآرتریت می‌پردازد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی به‌صورت تصادفی به گروه‌های سالم، استئوآرتریت، استئوآرتریت-تمرین، استئوآرتریت-سلول بنیادی و استئوآرتریت- سلول بنیادی- تمرین تقسیم شدند و مداخلات را براساس نام گروه دریافت کردند. تمرین استقامتی به مدت هشت هفته (۵ جلسه/هفته، ۳۰-۵۰ دقیقه/جلسه و با سرعت ۱۶ متر/دقیقه) روی تردمیل بدون شیب اجرا شد. سلول بنیادی مزانشیمی (۱×۱۰۶ سلول/کیلوگرم) یک‌بار به گروه های مربوط تزریق گردید. چهل‌وهشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، بافت غضروف برداشته و به آزمایشگاه ارسال شد. از روش آنالیز واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین اختلاف بین‌گروهی استفاده شد. تمامی محاسبات با نرم‌افزار SPSS انجام و سطح معنی‌داری $P \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیان ژن TNFα در گروه استئوآرتریت بیشتر از گروه سالم بود (P=0.027). تفاوت معنی‌دار دیگری درمورد بیان ژن TNFα بین گروه‌ها وجود نداشت. بیان پروتئین MMP13 در گروه‌های استئوآرتریت (P=0.001)، استئوآرتریت- تمرین (P=0.003)، استئوآرتریت- سلول بنیادی (P=0.011) و استئوآرتریت- سلول بنیادی- تمرین (P=0.001) بیشتر از گروه سالم بود. بیان پروتئین MMP13 در گروه‌های استئوآرتریت- تمرین (P=0.001)، استئوآرتریت- سلول بنیادی (P=0.001) و استئوآرتریت- سلول بنیادی-تمرین (P=0.001) کمتر از گروه استئوآرتریت بود. تفاوت معنی‌دار دیگری درمورد بیان پروتئین MMP13 بین گروه‌ها وجود نداشت.

نتیجه گیری: تمرین استقامتی و سلول بنیادی درمانی نقش مثبتی در تعدیل بیان پروتئین MMP13 دارند که از پتانسیل این دو مداخله برای بهبود استئوآرتریت حمایت می‌کنند.

Copyright © 2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مقدمه

استئوآرتریت (Osteoarthritis) یک بیماری دژنراتیو (Degenerative) مفصلی است که میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان تحت‌تأثیر قرار داده است. مشخصه آن تجزیه تدریجی غضروف در مفاصل است که به درد، سفتی و از دست دادن عملکرد منجر می‌شود. استئوآرتریت با انحطاط پیش‌رونده غضروف مفصلی و رباط‌ها و همچنین سینوویت (Synovitis) مزمن و بازسازی غیرطبیعی استخوان مشخص می‌شود. مفاصل زانو و ران شایع‌ترین مفاصل سینوویال درگیر هستند. با پیشرفت استئوآرتریت، بیماران از درد شدید فزاینده، محدودیت فعالیت حرکتی و حتّی ناتوانی رنج خواهند برد (۱).

درحالی‌که چندین گزینه درمانی برای استئوآرتریت وجود دارد، هنوز نیاز زیادی به مداخلات مؤثرتر و طولانی‌مدت وجود دارد. تحقیقات اخیر نشان داده است که فعالیت منظم هوازی و درمان با سلول‌های بنیادی ممکن است اثرات امیدوارکننده‌ای بر مدیریت استئوآرتریت داشته باشد.

نشان داده شده است که فعالیت‌های منظم هوازی، عملکرد مفصل را بهبود می‌بخشند و درد و پیشرفت استئوآرتریت را کاهش می‌دهند. فعالیت بدنی منظم برای درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های سیستم حرکتی، سیستم قلبی‌عروقی، سیستم عصبی و سیستم متابولیک اهمیت زیادی دارد (۲، ۳). اثرات فعالیت بدنی براساس نوع، مدت و شدت متفاوت است (۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فعالیت با شدت متوسط باعث بهبود استئوآرتریت می‌شود، درحالی‌که فعالیت شدید اثرات نامطلوبی دارد (۴، ۵). برای مثال، یک متاآنالیز از ۲۹ کارآزمایی تصادفی‌سازی و کنترل‌شده (Randomized controlled trial -RCTs) نشان داد که فعالیت با شدت متوسط ممکن است بر ترکیب ماتریکس غضروف در حیوانات تأثیر مثبت بگذارد، درحالی‌که تأثیر میزان روزانه فعالیت کم‌شدت نامشخص بود (۵). تمرینات هوازی نه‌تنها باعث تحرّک چربی، جلوگیری از آتروفی عضلانی و تقویت ایمنی می‌شوند، بلکه باعث تسریع بهبود غضروف آسیب‌دیده، بازیابی عملکرد مفاصل و تسکین درد مفاصل می‌گردند و در نتیجه کیفیت زندگی بیماران استئوآرتریت را بهبود می‌بخشند (۶، ۷).

درمان با سلول‌های بنیادی، راه‌حلی بالقوّه برای بازسازی غضروف آسیب‌دیده و ترویج ترمیم بافت ارائه می‌دهد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells (MSCs)) می‌توانند به چندین نوع سلول ازجمله سلول‌های غضروفی، آدیپوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، سلول‌های میوژنیک و عصبی تمایز یابند (۸، ۹). سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از منابع مختلف، عمدتاً از مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندان، جفت و بند ناف و همچنین از بافت های اسکلتی جدا کرد (۱۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان یک منبع سلولی امیدوارکننده برای ترمیم آسیب بافت غضروفی و درعین‌حال اثر تعدیل‌کننده ایمنی برای کاهش التهاب در استئوآرتریت ایجاد کنند (۱۱، ۱۲).

فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-alpha) یک سایتوکین پیش‌التهابی است که نقش مهمی در پاسخ ایمنی و التهاب ایفا می‌کند. TNF-alpha عمدتاً توسط ماکروفاژها، همچنین توسط سلول‌های دیگر مانند سلول‌های T، سلول‌های B و فیبروبلاست‌ها تولید می‌شود (۱۳). TNF-alpha در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک مختلف ازجمله تنظیم سلول‌های ایمنی، آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) و تشکیل گرانولوم نقش دارد (۱۳). TNF-alpha به تولید متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) کمک می‌کند. MMPs آنزیم‌هایی هستند که اجزای ماتریکس خارج‌سلولی ازجمله غضروف را تجزیه می‌کنند. افزایش سطح TNF-alphaدر فضای مفصلی به افزایش بیان MMP و درنتیجه تجزیه غضروف منجر می‌شود (۱۴). MMP13 آنزیمی است که نقش مهمی در تخریب اجزای ماتریکس خارج‌سلولی، به‌ویژه کلاژن نوع II و I (پروتئین‌های ساختاری کلیدی در غضروف و سایر بافت‌های همبند)، ایفا می‌کند (۱۴). کندروسیت‌ها (سلول‌های مسئول حفظ غضروف) با تغییر عملکرد خود، ازجمله کاهش سنتز ماتریکس غضروف (مانند پروتئوگلیکان ها و کلاژن) و افزایش بیان نشانگرهای التهابی، به‌TNF-alpha پاسخ می‌دهند (۱۵). TNF-alpha تولید سایر واسطه‌های التهابی مانند IL-1 و IL-6 را تحریک می‌کند که باعث افزایش التهاب و تخریب بافت در مفصل می‌شوند (۱۳). افزایش فعالیت استئوکلاست‌ها در پاسخ به TNF-alpha به فرسایش استخوان منجر می‌شود که به روند کلی بیماری کمک می‌کند (۱۳). TNF-alpha همچنین عامل کلیدی در سینوویت یا التهاب غشای سینوویال است که معمولاً در آرتروز مشاهده می‌شود. این التهاب می‌تواند درد مفاصل و اختلال عملکرد را تشدید کند (۱۳).

بسیاری از تحقیقات in vitro و in vivo نشان داده‌اند سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات ضدّالتهابی و بازسازی قابل‌توجهی در مدل‌های استئوآرتریت دارند. نتایج یک مطالعه تجربی نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، تنظیم مثبت COX2- Cyclooxygenase 2 با واسطه TNF-α- Tumor necrosis factor و اینترلوکین‌های (Interleukin (IL)) پیش‌التهابی، یعنی IL-1α، IL-1β، IL-6، IL-8 را تغییر دادند (۱۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی با کاهش آزادسازی واسطه‌های التهابی (مانند TNFα، IL-6، Prostaglandin E2 (PGE2) و NO- Nitric oxide و فعالیت MMP- Matrix metalloproteinases (MMPs)، اثرات محافظتی غضروفی نشان دادند، درحالی‌که تولید سایتوکین ضدّالتهابی IL-10 را افزایش دادند. در یک مطالعه اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی با فعال‌سازی مسیرهای AKT- Protein kinase B (PKB)، ERK- Extracellular Signal-Regulated Kinases و AMP-activated protein kinase (AMPK) پاسخ التهابی را کاهش و ترمیم غضروف و ترمیم استخوان زیرغضروفی را افزایش دادند (۱۶).

مکانیسم‌های مولکولی اساسی که توسط آن فعالیت هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی اثرات خود را بر استئوآرتریت اعمال می‌کنند، به‌خوبی شناخته نشده است. به‌طور خاص، مسیرهای مولکولی مربوط به التهاب و تخریب غضروف در استئوآرتریت باید بررسی گردد تا مزایای بالقوّه این درمان‌ها روشن شود. در این مطالعه، هدف ما بررسی اثرات فعالیت منظم هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان دو فاکتور کلیدی درگیر در التهاب و تخریب غضروف زانوی موش‌های صحرایی نر مدل استئوآرتریت است. ما فرض می‌کنیم که فعالیت هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی، بیان ژن TNFα و بیان پروتئین MMP13را در بافت غضروف زانو کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده کاهش التهاب و تخریب غضروف است. علاوه‌براین، ممکن است که ترکیب تمرین هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی اثر هم‌افزایی بر بیان این ژن‌ها و ترویج ترمیم غضروف داشته باشد. بنابراین در این مطالعه ما این فرضیه را هم بررسی خواهیم کرد. مطالعه حاضر به بررسی اثرات مستقل و تعاملی تمرین هوازی و تزریق سلول بنیادی بر بیان ژن TNFα و بیان پروتئین MMP13 بافت غضروف زانو در موش‌های صحرایی نر مدل استئوآرتریت می‌پردازد.

روش کار

ملاحظات اخلاقی

این مقاله حاصل بخشی از رساله دکتری تصویب‌شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج است. تمام اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوّب

وزارت بهداشت جمهوری اسلامی ایران در این مطالعه رعایت شده است. پژوهش حاضر دارای کد اخلاق به شماره ۰۹۳ .۱۴۰۲ IR.IAU.SDJ.REC. از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج است.

طرح پژوهش

آزمودنی‌های پژوهش حاضر را ۲۵ سر موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار (سن: هشت تا ۱۲ هفته، وزن: ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) تشکیل دادند. حجم نمونه با در نظر گرفتن اخلاق پژوهش مبنی‌بر حداقل حیوانات موردنیاز با استناد به مطالعات قبلی ۵ سر در هر گروه در نظر گرفته شد (۱۷، ۱۸). پژوهش حاضر از نوع تجربی است. حیوانات در مرکز تحقیقاتی حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری در شرایط استاندارد و قابل‌کنترل (دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵ ± ۵۵ درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب) نگهداری شدند. همچنین، حیوانات در طی مطالعه با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند و به‌صورت آزاد ازطریق بطری مخصوص به آب دسترسی داشتند. حیوانات به‌صورت تصادفی به پنج گروه با نام‌های سالم، استئوآرتریت، استئوآرتریت- تمرین، استئوآرتریت- سلول بنیادی و استئوآرتریت- سلول بنیادی- تمرین تقسیم شدند و مداخلات را براساس نام گروه دریافت کردند.

برنامه تمرین هوازی

کلّ دوره تمرین شامل دو مرحله آشنایی و تمرین اصلی است. هدف از مرحله آشنایی، سازگاری با محیط پژوهش و نوار گردان بود. بدین‌منظور و در مدت یک هفته، حیوانات تحت شرایط آزمایش قرار گرفتند و تمرین ورزشی را در مدت ۳ روز، هر روز به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد بر روی تردمیل اجرا کردند. برنامه تمرین اصلی شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه، ۵ روز در هفته برای هفته اوّل بود که با رعایت اصل اضافه‌بار به‌صورت پیش‌رونده مدت تمرین به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید (۱۹).

القای استئوآرتریت

القای استئوآرتریت با روش جراحی برگرفته از مطالعه Lampropoulou-Adamidou و همکاران (۲۰۱۴) است (۲۰). موش‌ها به‌وسیله کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند (۲۱). سپس از زانوی راست یک برش یک سانتی‌متری برای ظاهر ساختن مفصل زانو ایجاد شد و مفصل زانو بلافاصله با جابه‌جایی جانبی استخوان کشکک و لیگامان پتلار باز و یک برش طولی در قسمت مدیال زانو ایجاد گردید. پس از جابه‌جایی جانبی پتلا و لیگامان پتلا، یک برش در لیگامان صلیبی داخلی بدون آسیب به غضروف مفصلی و دیگر لیگامنت‌ها ایجاد و درنهایت کپسول مفصلی با ۶ بخیه قابل‌جذب و پوست نیز با ۶ بخیه ابریشمی بسته شد (۲۲).

نحوه تهیه و تزریق داخل‌مفصلی سلول مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش‌های نر نژاد ویستار سالم پس از بیهوشی با کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) استخراج شدند. روش کشت با تراکم پایین‌سلولی بود که سلول‌ها با تراکم ۶ تا ۵۰ سلول در هر سانتی‌مترمربع کشت داده شدند. پس از پُر شدن نسبی سطح ظرف کشت، پاساژ صورت گرفت و مراحل بالا تا پاساژ ۳ یا ۴ که مجموعه خالصی از سلول‌هاست، تکرار شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده در محیطی با DMEM با FBS ۲۰٪ در طول یک شبانه‌روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شدند تا سلول‌هایی که نچسبیده‌اند، جدا شوند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۳ تا ۴ بار پاساژ شدن به <۹۰٪ خلوص رسیدند و به هدف تزریق انتخاب شدند. موش‌هایی که در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند، ۱×۱۰^{۶} (یک‌میلیون) سلول بر کیلوگرم ازطریق تزریق داخل‌مفصلی دریافت کردند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مفصل زانوی راست آن‌ها تزریق شد (۲۳).

تهیه نمونه بافتی و روش‌های آزمایشگاهی

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی، تمام حیوانات با تزریق درون‌صفاقی مادّه بیهوشی حاوی کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند (۲۱). پس از شکافتن حفره زانو، بافت غضروف به‌دقت جدا و پس از شست‌وشو با آب‌مقطّر و توزین وزن، در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شد. اندازه‌گیری بیان ژن با استفاده از روش Real-time PCR انجام گرفت (۲۴). RNA کل با هموژن کردن بافت غضروف با استفاده از نیتروژن مایع و کیت مخصوص تخلیص RNA (ساخت شرکت سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت استخراج شد. درجه خلوص RNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتری ارزیابی شد و پس از اطمینان از درجه خلوص مناسب، ساخت cDNA آغاز گردید. cDNA با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس و پرایمر غیراختصاصی از RNA با استفاده از کیت مخصوص و دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. سپس جهت حذف DNA ژنومی از آنزیم DNase I استفاده گردید. ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر، ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین و ۵ میکرولیتر آب با هم پیپت و با استفاده از دستگاه به روش Real time PCR طی ۳۵ الی ۴۰ چرخه تکثیر شدند. چرخه‌های دمایی مطابق با مقاله رحمتی احمدآباد و همکاران ( ) انجام شد (۲۵). تسلسل و توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۱ ارائه شده است. بیان ژن نسبی با استفاده از روش $۲^{-\Delta Ct}$ و نسبت به GAPDH محاسبه شد. ارزیابی بیان پروتئین با استفاده از روش وسترن‌بلات انجام گرفت. تمامی مراحل انجام کار وسترن‌بلات مطابق با مقاله بختیاری و همکاران ( ) انجام شد (۲۶).

مدل آماری

توصیف کمّی داده‌ها با استفاده از میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده گردید. همچنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه، از روش آنالیز واریانس یک‌راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین‌گروهی استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $P\leq$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلّیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده‌شده

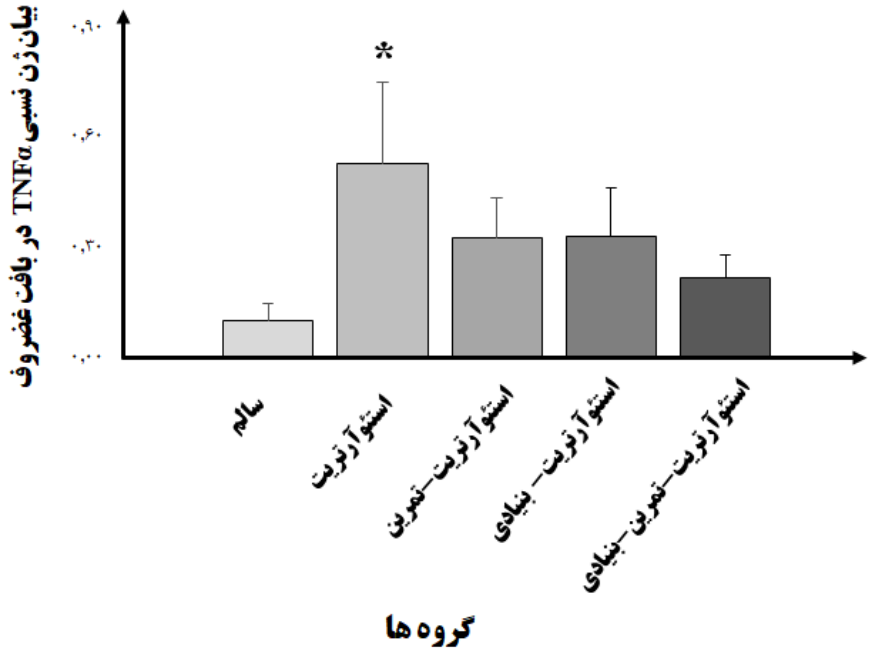
ژن	آغازگر برگشت	آغازگر رفت
TNFα	5'– TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC–3'	5'– AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC–3'
GAPDH	5'–CATACTCAGCACCAGCATCACC–3'	5'–AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG–3'

یافته‌ها

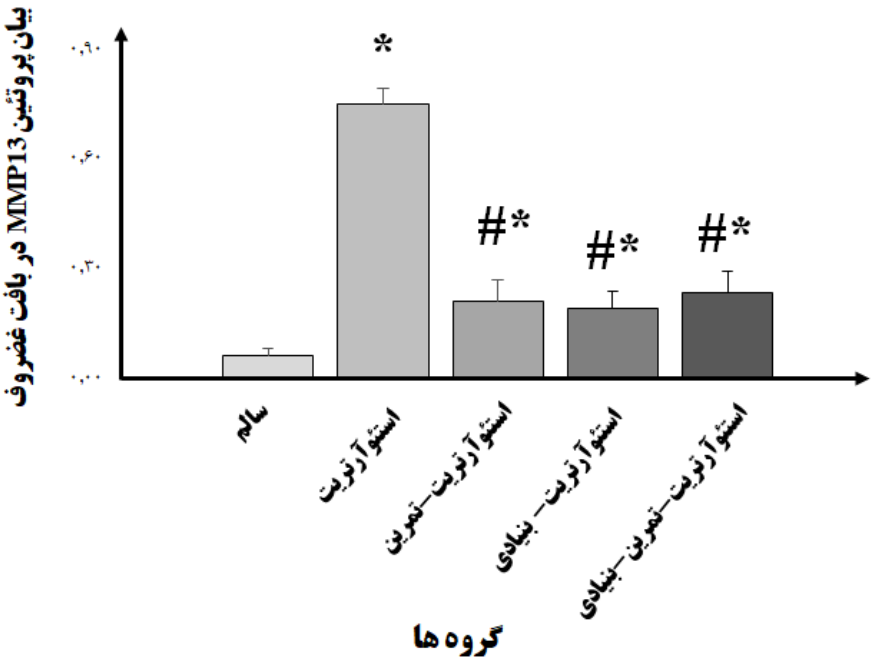
نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه درمورد متغیّر TNFα نشان داد بین گروه‌های پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد (F=۲/۹۳۷، ۰/۰۴۶ =P). بیان ژن TNFα در گروه استئوآرتریت به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود (۰/۰۲۷ =P). تغییر معنی‌دار دیگری بین گروه‌های پژوهش مشاهده نشد (شکل ۱).

آنالیز داده‌های مربوط به بیان پروتئین MMP13 با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد بین گروه‌های پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=0.001, F=124.614). بیان پروتئین MMP13 بافت غضروف در گروه‌های استئوآرتریت (P=0.001)، استئوآرتریت- تمرین (P=۰/۰۰۳)، استئوآرتریت- سلول بنیادی (P=۰/۰۱۱) و استئوآرتریت- تمرین- سلول بنیادی (P=0.001) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود.

بیان پروتئین MMP13 بافت غضروف در گروه‌های استئوآرتریت- تمرین (P=0.001)، استئوآرتریت- سلول بنیادی (P=۰/۰۰۱) و استئوآرتریت- تمرین- سلول بنیادی (P=۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه استئوآرتریت بود. تفاوت معنی‌دار دیگری بین گروه‌ها وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۱: تفاوت‌های بین‌گروهی مشخص‌شده به‌وسیله آزمون تعقیبی توکی درمورد بیان ژن TNFα بافت غضروف؛ اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.
* تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استئوآرتریت و سالم



شکل ۲: تفاوت‌های بین‌گروهی مشخص‌شده به‌وسیله آزمون تعقیبی توکی درمورد بیان پروتئین MMP13 بافت غضروف؛ اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.
*تفاوت معنی‌دار با گروه سالم
تفاوت معنی‌دار با گروه استئوآرتریت

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات فعالیت هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان ژن TNFα و پروتئین MMP13 در بافت غضروف زانو در موش‌های صحرایی نر دارای مدل استئوآرتریت انجام شده است. درمورد متغیّر TNFα، بیان ژن آن در گروه استئوآرتریت به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. این یافته نشان می‌دهد که TNFα نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی استئوآرتریت ایفا می‌کند. این با مطالعات قبلی که TNFα را در فرایندهای التهابی و تخریب غضروف مرتبط با استئوآرتریت دخیل کرده‌اند، مطابقت دارد (۲۷-۲۹). ازسوی‌دیگر، بیان پروتئین MMP13 در بافت غضروف همه گروه‌های دارای استئوآرتریت به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. این یافته نشان‌دهنده اختلال در تنظیم بیان پروتئین MMP13 در شرایط استئوآرتریت است که نقش آن را در تخریب غضروف تأیید می‌کند (۳۰-۳۲). شایان‌ذکر است که گروه‌های استئوآرتریت- تمرین، استئوآرتریت- سلول بنیادی و گروه استئوآرتریت- تمرین- سلول بنیادی بیان کمتری از پروتئین MMP13 را نسبت به گروه استئوآرتریت نشان دادند که نشان می‌دهد هم تمرین هوازی و هم درمان با سلول‌های بنیادی پتانسیل تعدیل بیان MMP13 و به‌طور بالقوّه کاهش تخریب غضروف در استئوآرتریت را دارند.

یافته‌های پژوهش حاضر با پژوهش علی‌نژاد و همکاران ( ) که تغییرات بیان ژن MMP13 متعاقب تمرین هوازی و سلول بنیادی درمانی را بررسی کردند، مطابقت دارد (۳۳). جلیلیان و همکاران ( ) به بررسی اثر تمرین هوازی به همراه سلول های بنیادی بر سطوح شاخص‌های التهابی بافت قلب موش مدل استئوآرتریت پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد تمرین هوازی و سلول بنیادی به‌صورت مستقل و ترکیب با هم باعث افـــزایش سطوح IL-10 و کاهـــــش سطوح TNF-α شد (۳۴). فتّاحی و همکاران ( ) به بررسی اثر تمرین هوازی همراه با سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر سطوح بیومارکرهای التهابی مغز در مدل موش های مبتلا به استئوآرتریت پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد استفاده ترکیبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و ورزش هوازی منظم باعث بهبود غلظت بیومارکرهای التهابی در مغز مدل موش استئوآرتریت می‌شود (۳۵).

افزایش مشاهده‌شده در متغیّرهای TNFα و MMP13 از این درک رایج حمایت می‌کند که التهاب و تخریب غضروف فرایندهای کلیدی درگیر در پیشرفت استئوآرتریت هستند. TNFα، به‌عنوان یک سیتوکین پیش‌التهابی، می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در مفصل آغاز کند و تداوم بخشد و به تجزیه غضروف منجر شود (۳۶). MMP13، به‌عنوان آنزیمی که مسئول تخریب کلاژن است، بیشتر به تخریب ماتریکس غضروف کمک می‌کند (۳۷). بنابراین، هدفْ قرار دادن این مسیرهای سیگنالینگ مولکولی، همان‌طور که توسط اثرات فعالیت بدنی و درمان با سلول‌های بنیادی بر بیان آن‌ها نشان داده شده، ممکن است پتانسیل درمانی در مدیریت استئوآرتریت داشته باشد.

اصلی‌ترین تظاهر آسیب‌شناسی (پاتولوژی) استئوآرتریت در سطح بافتی، تخریب موضعی غضروف مفصلی است که در مفاصل متحرک به‌وسیله تخریب غضروف مفصلی همراه با استخوان‌سازی جدید در سطح و حاشیه مفاصل درگیر تظاهر می‌کند. عوامل متعدد موضعی و یا عمومی در ایجاد و پیشرفت استئوآرتریت نقش دارند. سن، جنس، نژاد، ژنتیک، تراکم استخوان، هورمون‌های جنسی، اختلالات آندوکربن یا متابولیک، تغذیه، چاقی، ضربه‌های مفصلی عمده، فشار بیش‌ازحد به مفصل ناشی از نوع شغل یا ورزش، اختلالات یا نقایص مادرزادی یا رشدی مفصل و بیماری‌های التهابی یا عفونی قبلی مفصل را می‌توان جزء این عوامل برشمرد (۲، ۳۸). آسیب ماتریکس که در استئوآرتریت رخ می‌دهد، افزایش تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریکس ازجمله MMPs توسط غضروف‌هاست. Hulejová و همکاران بیان کردند که سطوح سایتوکاین‌ها و متالوپروتئینازها در استخوان‌های ساب‌کندرال در بیماران استئوآرتریت افزایش می‌یابد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که سطوح سایتوکاین‌ها و متالوپروتئینازها به‌صورت معنی‌داری در بیماران استئوآرتریتی بالاتر از گروه کنترل بود و برعکس، سطوح IL-10 سرمی کمتری نسبت به گروه کنترل داشته‌اند. اما غضروف بیماران استئوآرتریتی IL-10، IL-1α، MMP2,3,9 بالاتر و IL-8 در سینویوم بیماران استئوآرتریتی بیشتر بود (۳۹). در مطالعه حاضر با بررسی نتایج بیان ژن TNFα در گروه‌های تیمار، به نظر می‌رسد مداخلات (تمرین هوازی، سلول بنیادی، تمرین- سلول بنیادی) تاحدودی سبب تعدیل بیان افزایش‌یافته TNFα به‌واسطه القای استئوآرتریت شده است. به‌هرحال، این تغییرات ازنظر آماری معنی‌دار نبود. بیان پروتئین افزایش‌یافته MMP13 بافت غضروف گروه‌های استئوآرتریت القاشده به‌واسطه تمرین، استفاده از سلول بنیادی و تعامل آن‌ها تعدیل شد، اما تفاوتی بین گروه‌ها با تیمارهای مختلف وجود نداشت. TNFα ازطریق ایجاد التهاب و MMP13 ازطریق تجزیه کلاژن موجب تجزیه غضروف می‌شوند. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که عوامل التهابی تنظیم‌کننده MMP ها هستند. مهار سنتز و یا فعالیت MMP ها در توسعه درمان‌های اصلاح ساختاری برای استئوآرتریت بسیار مهم است. با توجه به عدم تغییر TNFα به‌واسطه مداخلات و تغییر MMP13 به‌واسطه مداخلات، به نظر می‌رسد عوامل التهابی به‌غیر از TNFα در مطالعه حاضر بر بیان پروتئین MMP13 تأثیر داشته باشند. بنابراین برای یافتن مکانیسم دقیق تغییرات MMP13 مطالعاتی لازم است که تغییرات دیگر عوامل التهابی نظیر اینترلوکین‌ها، فاکتورهای رونویسی مانند NFKB و پروتئین‌های AKT و PI3K را بررسی کنند. درحالی‌که مطالعه حاضر بینش‌های ارزشمندی را درمورد اثرات ورزش هوازی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان ژن TNFα و بیان پروتئین MMP13 در مدل موش آرتروز ارائه می‌دهد، محدودیت‌های دیگری وجود دارد که باید در نظر گرفته شود. این مطالعه روی موش‌های صحرایی نر متمرکز شد و قابلیت تعمیم آن را به جمعیت‌های ماده محدود کرد. تحقیقات آینده باید شامل مدل‌های حیوانی ماده برای بررسی تفاوت‌های جنسی بالقوّه در پاسخ به فعالیت بدنی و درمان با سلول‌های بنیادی باشد. علاوه‌براین، این مطالعه از مدل حیوانی آرتروز استفاده کرد. اگرچه این مدل جنبه‌های مهم بیماری انسانی را منعکس می‌کند، اما مطالعات بیشتری برای تأیید یافته‌ها در انسان ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن TNFα و بیان پروتئین MMP13 در بافت غضروف زانو در مدل موش‌های آرتروز دارای اختلال افزایش می‌یابد. استفاده از فعالیت منظم هوازی و درمان با سلول‌های بنیادی اثرات امیدوارکننده‌ای در تعدیل بیان MMP13 نشان داد که می‌تواند به‌عنوان مداخله درمانی برای بهبود استئوآرتریت با سرکوب این پروتئین مطرح باشد. نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد به نظر می‌رسد عوامل التهابی، به‌غیر از TNFα، در مطالعه حاضر بر بیان پروتئین MMP13 تأثیر داشته باشند. بنابراین برای یافتن مکانیسم دقیق تغییرات MMP13، مطالعاتی در آینده موردنیاز است تا تغییرات دیگرِ عوامل التهابی نظیر اینترلوکین‌ها، فاکتورهای رونویسی مانند NFKB و پروتئین‌های AKT و PI3K را بررسی کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از اساتید دانشگاه آزاد واحد ساری که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشته‌اند، سپاسگزاری می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافع در ارتباط مقاله حاضر ندارند.

References

1. Sellam J, Berenbaum F (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;**6**(11):625-35. doi: 10.1038/nrrheum.2010.159 pmid: 20924410
2. Skou ST, Pedersen BK, Abbott JH, Patterson B, Barton C. Physical Activity and Exercise Therapy Benefit More Than Just Symptoms and Impairments in People With Hip and Knee Osteoarthritis. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2018;**48**(6):439-447. doi: 10.2519/jospt.2018.7877 pmid: 29669488
3. Wang R, Tian H, Guo D, et al. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci.* 2019;**9**(3):211–227. doi: 10.1016/j.jshs.2019.09.008 pmid: 32444146
4. Schulz JM, Birmingham TB, Atkinson HF, Woehrle E, Primeau CA, Lukacs MJ, Al-Khazraji BK, Khan MCM, Zomar BO, Petrella RJ, Beier F, Appleton CT, Shoemaker JK, Bryant DM. Are we missing the target? Are we aiming too low? What are the aerobic exercise prescriptions and their effects on markers of cardiovascular health and systemic inflammation in patients with knee osteoarthritis? A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2020;**54**(13):771-775. doi: 10.1136/bjsports-2018-100231 pmid:31848152
5. Bricca A, Juhl CB, Grodzinsky AJ, Roos EM. Impact of a daily exercise dose on knee joint cartilage - a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in healthy animals. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;**25**(8):1223-1237. doi: 10.1016/j.joca.2017.03.009 pmid:28323138
6. Kabiri S, Halabchi F, Angoorani H, et al. Comparison of three modes of aerobic exercise combined with resistance training on the pain and function of patients with knee osteoarthritis: A randomized controlled trial. *Phys Ther Sport.* 2018;**32**:22-28. doi: 10.1016/j.ptsp.2018.04.001
7. Loew L, Brosseau L, Kenny GP, et al. An evidence-based walking program among older people with knee osteoarthritis: the PEP (participant exercise preference) pilot randomized controlled trial. *Clin Rheumatol.* 2017;**36**(7):1607-1616. doi: 10.1007/s10067-017-3606-9 pmid: 28332010
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY).* 1999;**284**(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143 pmid: 10102814
9. Badyra B, Sulkowski M, Milczarek O, et al. Mesenchymal stem cells as a multimodal treatment for nervous system diseases. *Stem Cells Transl Med.* 2020;**9**(10):1174–1189. doi: 10.1002/sctm.19-0430 pmid: 32573961
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;**8**(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905 pmid: 16923606
11. Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, et al. Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro. *Theranostics* 2018;**8**(4):906–920. doi: 10.7150/thno.20746 pmid: 29463990
12. Zhang W, Robertson WB, Zhao J, et al. Emerging Trend in the Pharmacotherapy of Osteoarthritis. *Front endocrinol.* 2019;**10**:431. doi: 10.3389/fendo.2019.00431 pmid:31312184
13. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021;**22**(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719 pmid: 33800290
14. Mukherjee A, Das B. The role of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in the progression of osteoarthritis. *Biomater and biosyst.* 2024;**13**:100090. doi: 10.1016/j.bbiosy.2024.100090 pmid:38440290
15. Sengprasert P, Kamenkit O, Tanavalee A, et al. The Immunological Facets of Chondrocytes in Osteoarthritis: A Narrative Review. *J R.* 2024;**51**(1):13-24. doi: 10.3899/jrheum.2023-0816.
16. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood. 2005;**105**(5):2214-9. doi: 10.1182/blood-2004-07-2921 pmid: 15514012
17. Russow L-M. NIH Guidelines and Animal Welfare. In: Humber JM, Almeder RF, editors. Biomedical Ethics Reviews · 1990. *Totowa, NJ: Humana Press*; 1991. 229-252. Link
18. Rezaei M, Azarbayjani M, Piree M, et al. (2022) The effect of aerobic exercise with ozone and stem cell on anandamide concentration in desert rat with osteoarthritis. *Feyz Med Sci J.* 2022, **26**(1): 38-46. doi: 10.48307/fmsj.2022.26.1.38
19. Zhang X, Yang Y, Li X, et al. Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *Int J Mol Med.* 2018 ;**43**(1):336–344. doi: 10.3892/ijmm.2018.3948 pmid: 30365059
20. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, et al. (2014) Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg & Traumatol.* 2014;**24**(3):263-71 . doi: 10.1007/s00590-013-1205-2
21. Rahmati-Ahmadabad S, Azarbayjani MA, Broom DR, et al. Effects of high-intensity interval training and flaxseed oil supplement on learning, memory and immobility: relationship with BDNF and TrkB genes. *Comparative Exercise Physiology.* 2021;**17**: 273-284. doi:10.3920/CEP200046.
22. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;**1**(4):363-76. pmid: 15758487
23. Kim JE, Lee SM, Kim SH, et al. Effect of self-assembled peptide-mesenchymal stem cell complex on the progression of osteoarthritis in a rat model. *Int J Nanomedicine.* 2014;**9**:141–157. doi: 10.2147/IJN.S54114
24. Shirvani H, Rahmati-Ahmadabad S, Kowsari E, et al. Effects of 2-week HMB-FA supplementation with or without eccentric resistance exercise on expression of some genes related to muscle protein turnover and serum irisin and IGF-1 concentrations. *Gene.* 2020;**760**:145018. doi:10.1016/j.gene.2020.145018.
25. Rahmati-Ahmadabad S, Azarbayjani M-A, Farzanegi P, et al. High-intensity interval training has a greater effect on reverse cholesterol transport elements compared with moderate-intensity continuous training in obese male rats. *Eur J Prev cardiol.* 2021;**28**(7):692-701. doi: 10.1177/2047487319887828
26. Bakhtiyari A, Gaeni A, Chobineh S, et al. Effect of 12-weeks high-intensity interval training on SIRT1, PGC-1α and ERRα protein expression in aged rats . *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology.* 2018; **5**(2): 95-102. doi: 10.22049/jassp.2019.26555.1223
27. Raafat N, Gharib AF, Atta DS, et al. Tumor necrosis factor-α: Molecular assessment of gene expression, genetic variants and serum level in Egyptian patients with knee osteoarthritis. *Gene Reports.* 2020;**21**: 100922. doi:10.1016/j.genrep.2020.100922.
28. Li H, Xie S, Qi Y, et al. TNF‐α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate‐induced osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2018;**16**(6): 4737-4744. doi: 10.3892/etm.2018.6770 pmid: 30542428
29. Zhao Y, Li Y, Qu R, et al. Cortistatin binds to TNF-α receptors and protects against osteoarthritis. *EBioMedicine.* 2019:**41**:556-570. doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.035 pmid: 30826358
30. Hu Q, Ecker M (2021) Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(4):1742. doi: 10.3390/ijms22041742 pmid: 33572320
31. Wang M, Sampson ER, Jin H, et al. (2013) MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res & Ther.* 2013;**15**(1):R5. doi: 10.1186/ar4133 pmid: 23298463
32. Xin X, Tan Q, Li F, et al. Potential Value of Matrix Metalloproteinase-13 as a Biomarker for Osteoarthritis. *Front Surg.* 2021;**8**:750047. doi: 10.3389/fsurg.2021.750047 pmid: 34778362
33. Alinejad M, Barari A, Abbasi Daloii A, et al. Effect of Endurance Training and Stem Cell on Fgf2 and Mmp13 Gene Expression in Knee Tissue of Rats with Osteoarthritis. *JSSU.* 2021; **29** (3) :3599-3610. doi: 10.18502/ssu.v29i3.6204
34. Jalilian J, Behpoor N, Hosseinpour delavar S, et al. Effect of Aerobic Training in Combination with Stem Cells on

Inflammatory Biomarker Levels in the Heart Tissue of Rat Model of Osteoarthritis. *J. Ilam Uni. Med. Sci*. 2020; **28** (1) :12-26. doi: 10.29252/sjimu.28.1.12

35. Fatahi M, Behpoor N, Hosseinpourdelavar S, et al. (2021) The effect of aerobic exercise combined with bone marrow mesenchymal stem cells on inflammatory biomarkers levels of the brain in a model of osteoarthritic rat. *J Basic Res Med Sci*. 2021; **8** (3):32-39. Link
36. Wojdasiewicz P, Poniatowski Ł A, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflamm*. 2014:**2014**:561459 doi: 10.1155/2014/561459 pmid: 24876674
37. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;**1824** (1):133-45. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.06.020 pmid: 21777704
38. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015:**25** Suppl 3:1-72. doi: 10.1111/sms.12581 pmid: 26606383
39. Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, et al. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine*. 2007;**38**(3):151-6. doi: 10.1016/j.cyto.2007.06.001 pmid:17689092