



مقایسه اثر یک دوره تمرین هوازی و ازن درمانی بر بیان ژن AMPK، Beclin-1 و mTOR بافت غضروف در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت زانو

آزاده نصرت‌پور^۱، پروین فرزنانگی^۲، رضا رضایی شیرازی^۱

۱- گروه تربیت بدنی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
<p>مقدمه</p> <p>هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین اثر هشت هفته تمرین هوازی و ازن درمانی بر بیان ژن AMPK، Beclin-1 و mTOR بافت غضروف آسیب دیده در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت (OA) زانو بود.</p> <p>مواد و روش‌ها</p> <p>در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار 220 ± 10 گرمی به طور تصادفی به پنج گروه سالم (CN)، استئوآرتریت (OA)، OA+ازن درمانی، OA+تمرین هوازی و OA+ازن درمانی+تمرین هوازی تقسیم شدند. استئوآرتریت به روش جراحی انجام شد. تمرین ورزشی شامل دویدن روی نوارگردان به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته، هر جلسه ۳۵-۴۵ دقیقه و با سرعت ۱۸ متر در دقیقه بود. موش‌های گروه ازن درمانی، ازن (O3) با غلظت ۲۰ پیکوگرم بر لیتر، یک بار در هفته و در مدت سه هفته دریافت نمودند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در وضعیت ۱۲ ساعت ناشتایی نمونه‌های غضروف زانو جدا شد و سطوح mRNA فاکتورهای AMP، Beclin-1 و mTOR به روش PCR-RT اندازه‌گیری شد.</p> <p>یافته‌ها</p> <p>در بافت غضروفی، سطوح Beclin-1 در گروه OA کاهش، ولیکن AMPK و mTOR افزایش یافت. ازن درمانی، تمرین هوازی و ترکیب ازن درمانی+تمرین هوازی موجب معکوس شدن روند تغییرات شد ($P=0.009$). اما بین این گروه‌ها تفاوت معناداری وجود نداشت ($P \leq 0.05$).</p> <p>نتیجه‌گیری</p> <p>بر اساس نتایج، ازن درمانی، تمرین ورزشی و ترکیبی سطوح mRNA فاکتورهای Beclin-1 غضروف مفصلی را افزایش می‌دهند. اما، تمرین ورزشی با شدت متوسط با تعدیل سطوح mTOR ممکن است نقش بیشتری در کنترل اتوفاژی کندروسیت غضروف مفصلی در موش‌های صحرایی مدل OA داشته باشد.</p> <p>کلیدواژه‌ها</p> <p>تمرین هوازی، ازن درمانی، استئوآرتریت، AMPK، Beclin-1 و mTOR</p>	<p>تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶</p> <p>*نویسنده مسئول: دکتر پروین فرزنانگی، دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران تلفن: ۰۹۱۱۲۳۳۰۲۳۳ پست الکترونیک: Parvvin.farzanegi@gmail.com</p>



مقدمه

استئوآرتریت (OA¹)، یک بیماری مزمن دژنراتیو² غضروف مفصلی و شایع‌ترین نوع آرتریت است که افرادی زیادی در سراسر جهان مبتلا به این بیماری هستند. شیوع آن در حدود نیمی از افراد بالای ۶۵ سال است (۱). بنابراین، OA یک بار سنگین برای سیستم‌های بهداشت ملی محسوب می‌گردد. تحقیقات نشان می‌دهد چندین عامل در شکل‌گیری OA 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). واکنش کندروسیت‌های غضروفی زانو تحت شرایط استرس محیطی، مدتی است که کانون توجه مطالعات پاتولوژیک در OA شده است. در این راستا، نقش تداخلات اتوفازی و عملکرد میتوکندری کندروسیت‌ها در پاتولوژی OA اجتناب‌ناپذیر است، چرا که کندروسیت‌های غضروف مفصلی می‌توانند مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها را تولید کنند که اجزای اصلی حفظ، ساختار و عملکرد غضروف مفصلی به شمار می‌آیند (۳). در شرایط پاتولوژیک مانند OA، بی‌نظمی بر تعادل شرایط آنابولیک و کاتابولیک در کندروسیت‌های غضرفی حاکم می‌شود و در نتیجه، تغییرات دژنراتیو در ماتریکس غضروف و بافت‌های دیگر مفصلی مانند استخوان زیر کندیلی و سینوویال مشاهده می‌شود (۴). از سوی دیگر، در کندروسیت‌های غضروفی، بی‌نظمی گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)³ تولید شده توسط میتوکندری‌های ناکارآمد قادر به مداخله در سیگنالینگ سلولی و کاتابولیسم ماتریکس بوده و احتمال دارد بازگشت

میتوکندری‌های آسیب دیده ناشی از اتوفازی کندروسیت‌ها را کاهش دهد (۵). اتوفازی یک فرایند مهم در حفظ هموستاز و عملکرد سلول است که برخی از اندامک‌های سلولی تغییر می‌کنند یا عملکرد خود را از دست می‌دهند (۶). مسیر اتوفازی، یک مسیر دقیق و تنظیم شده است که شامل تخریب لیزوزومی ارگان‌های سیتوپلاسمی یا اجزای سیتوزولی است. این مسیر را می‌توان با اشکال مختلف استرس سلولی از جمله محرومیت از مواد مغذی یا فاکتور رشد، کمبود اکسیژن، گونه‌های اکسیژن فعال، آسیب DNA، پروتئین‌های ساختاری، اندامک‌های آسیب دیده یا عوامل بیماری‌زای درون سلول تحریک کرد. هر دو مسیر وابسته به محرک (عمومی‌تر) و مسیر سیگنالینگ مستقل از محرک، برای هماهنگی مراحل مختلف اتوفازی فعال می‌شوند. بنابراین، اتوفازی یک فرایند بیولوژیکی سلولی است که یک جزء اصلی پاسخ به استرس محسوب می‌شود (۷).

برهم خوردن تعادل در اتوفازی و تغییر در کندروسیت‌ها، فعال شدن و تفرق پذیری آن‌ها، تحت شرایط کاتابولیک خارج سلولی یا تغییرات خودبخودی کندروسیت‌ها، وضعیت هموستاتیک بافت غضرفی را متاثر می‌سازد (۸). بررسی‌های دقیق‌تر که به مسیرهای سیگنالی درگیر در اتوفازی کندروسیت‌ها اشاره دارند، بخوبی نشان دادند Beclin-1 یکی از اجزای مهم در شکل‌گیری اتوفازوزوم در فرایند اتوفازی است (۹) که می‌تواند تحت تاثیر یا تنظیم پروتئین کیناز فعال شونده - AMP (AMPK) و راپامایسین هدف پستانداران (mTOR) قرار گیرد (۱۰). در حقیقت، اتوفازی یک سازوکار هموستاتیک و محافظتی در بافت غضروف و یک فرآیند حیاتی برای تکامل و بلوغ کندروسیت‌ها می‌باشد (۹). مطالعات گزارش دادند مسیر اتوفازی توسط مسیرهای متعدد سیگنالینگ کنترل می‌شود که هم‌راستا با mTOR و AMPK در پستانداران است. در این زمینه، آغازگرهای

¹ Osteoarthritis

² Degenerative

³ Reactive Oxygen Species



مطالعه حاضر بدنبال بررسی دقیق‌تر و مقایسه اثر تمرین هوازی، ازن‌درمانی و ترکیب ازن‌درمانی و ورزش بر فاکتورهای درگیر در مسیر سیگنالینگ اتوفازای کندروسیت‌های زانو بود. به همین سبب بیان در سطح mRNA فاکتورهای Beclin-1، AMPK و mTOR بافت غضروفی زانو در موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه آزاد واحد ساری با رعایت اصول اخلاقی حاکم در پژوهش انجام شد. ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار ۱۱۰ روزه و با محدوده وزنی تا 10 ± 220 گرم مورد مطالعه قرار گرفتند. در طول دوره پژوهش حیوانات از آب و پلیت شرکت خوراک دام پارس تهران برخوردار بودند. دمای اتاق حیوانات ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه شبانه‌روزی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی برقرار بود. اصول نگهداری این حیوانات براساس قوانین بین‌المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه (Ethical code: NO.19.33.2018) رسید. حیوانات بصورت تصادفی به پنج گروه (۸ سر موش در هر گروه شامل CN، OA، OA+ازن‌درمانی، OA+تمرین هوازی و OA+ازن‌درمانی+تمرین هوازی) تقسیم شدند. در تعیین حجم نمونه، با توجه به فرمول حجم نمونه برای نمره‌های پیوسته، در صورتی که تفاوت‌های مورد انتظار برابر با ۱/۵ باشد، با توان آزمون ۸۰ درصد در سطح معنی‌داری $\alpha=0/05$ ، تعداد آزمودنی‌های هر گروه برابر هشت می‌باشد (۱۶). قبل از شروع تمرین اصلی، جهت آشنایی با تمرین، گروه‌های تمرینی به مدت یک هفته (۶ جلسه تمرین) به مدت ۱۰ دقیقه روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه دویدند.

اتوفازای کندروسیت‌ها، مجموعه‌ای از کیناز Unc-51 (ULK) مانند ATG13، FIP200 و ATG101 هستند (۹). تغییرات اتوفازای که هنگام پیری و آسیب غضروف گزارش شده است، شامل کاهش تعداد و حجم اتوفازوزوم‌ها و از سوی دیگر با کاهش بیان پروتئین‌های اتوفازای ULK1، Beclin1 و LC3 و 6 بیان بیش از حد mTOR مرتبط می‌باشد (۱۱).

ازن‌درمانی (۱۲) و استفاده از تمرینات بدنی و ورزش (۱۳) بعنوان راهکارهای موثر غیر جراحی در درمان، کاهش درد و یا بهبود نسبی افراد مبتلا به OA مورد تاکید و توجه قرار گرفته است. ازن یک گاز بسیار محلول و دارای قابلیت اکسیداسیون است و تماس آن با مایعات بیولوژیک می‌تواند سبب ساخته شدن محصولات ناشی از اکسیداسیون لیپیدها شود (۱۴). هرچند مطالعات در دسترس، بسیار محدودند، ژائو و همکاران^۱ بتازگی نشان دادند که ازن مورد استفاده در OA، می‌تواند در مسیر اتوفازای وابسته به mTOR و AMPK در کندروسیت‌ها دخالت نماید (۱۵). در مطالعه ژنگ و همکاران^۲ (۲۰۱۸) نیز اثر چهار هفته تمرین دویدن ۱۸ متر بر دقیقه بصورت ۵ بار در هفته، بر اتوفازای کندروسیت‌ها در موش‌های صحرایی مدل OA بررسی شد و نتایج نشان از بهبود وضعیت اتوفازای و کاهش بیان Beclin-1 در نقاط مختلف غضروفی داشت (۱۱). در مجموع، با توجه به محدودیت مطالعات و منابع در دسترس، پرسش‌های زیادی در ساز و کار اصلی اثر ازن‌درمانی و تمرینات بدنی بر فاکتورهای Beclin-1، mTOR و AMPK در کندروسیت‌ها وجود دارد که بیش از پیش محتاج مطالعات دقیق‌تری است. از اینرو، با فرض این که هم تمرینات بدنی یا ورزش، هم ازن‌درمانی و احتمالاً ترکیب این دو فاکتور، سودمندی‌هایی در بهبود وضعیت بیماران و درجات OA ایجاد می‌نماید،

¹ Zhao

² Zhang



معیارهای ورود به مطالعه شامل نر بودن موش‌ها، سلامت کامل، قرار گرفتن بازه وزنی 10 ± 220 بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل آسیب، بیماری، و عدم تناسب وزنی بود.

القای استئوآرتریت با روش جراحی برگرفته از مطالعه لامپروپولو-آدامیدو^۱ و همکارانش (۲۰۱۴) انجام شد، که در ابتدا موش‌ها به وسیله کتامین (۴۰ mg/kg) و زایلاسین (۴ 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 پتلاز باز و یک برش طولی در قسمت مدیال زانو ایجاد شد. پس از جابجایی جانبی پتلا و لیگامان پتلا، یک برش در لیگامان صلیبی داخلی بدون آسیب به غضروف مفصلی و دیگر لیگامنت‌ها ایجاد شد. در نهایت کپسول مفصلی با ۶ بخیه قابل جذب و پوست نیز با ۶ بخیه ابریشمی بسته شد (۱۶). ازن^۲ از اکسیژن پزشکی درجه ۲ توسط دستگاه ازن ساز^۳ ساخته شده است. ازن توسط یک تخلیه الکتریکی با شدت کم تولید شد و غلظت آن با استفاده از اشعه ماوراء بنفش در ۲۵۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. ازن در خط مفصلی تیپوفومرال زانو و با غلظت ۲۰ میکروگرم بر لیتر ($\mu\text{g/ml}$) یک بار در هفته به مدت سه هفته و ۲۱ روز بعد از آرتروزی کردن موش‌ها تزریق شد (۱۷). کل دوره تمرین شامل دو مرحله آشنایی و تمرین اصلی بود که یک ماه بعد القای آرتروز شروع شد. هدف از مرحله آشنایی، سازگاری با محیط پژوهش و نوارگردان بود. بدین منظور و در مدت یک هفته، حیوانات تحت شرایط آزمایش قرار داشتند و تمرین ورزشی را در مدت 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. برنامه تمرین اصلی بصورت پنج روز در هفته و شامل ۲۹-۲۵ دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۵ متر در دقیقه برای هفته اول بود که با رعایت اصل اضافه بار به صورت پیشرونده در هفته‌های بعدی به مدت تمرین ۴۴-۳۴ دقیقه و شدت ۱۸-۱۶ متر در دقیقه در هفته هشتم رسید (۱۱).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی تمام حیوانات با تزریق درون صفاقی ماده بیهوشی حاوی کتامین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از شکافتن حفره زانو، بافت غضروف به دقت جدا و پس از شست و شو با آب مقطر و توزین وزن، بخشی در فرمالین جهت عکس‌برداری (تایید القا بیماری) قرار گرفت و بخشی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد فریز شد. تمامی بافت فریز شده غضروف پس از پودر (ساییده) شدن در نیتروژن مایع، در بافر فسفات سالین (Ph:7) بوسیله یک هموژنیزه کننده (Hielscher UP100H) هموژنیزه شد (۱۷). جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligo dt (MWG- Biotech, Germany) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از Applied PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems, Foster City, CA) انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از

¹ Lampropoulou-Adamidou

² O₃

³ OZOMED 01

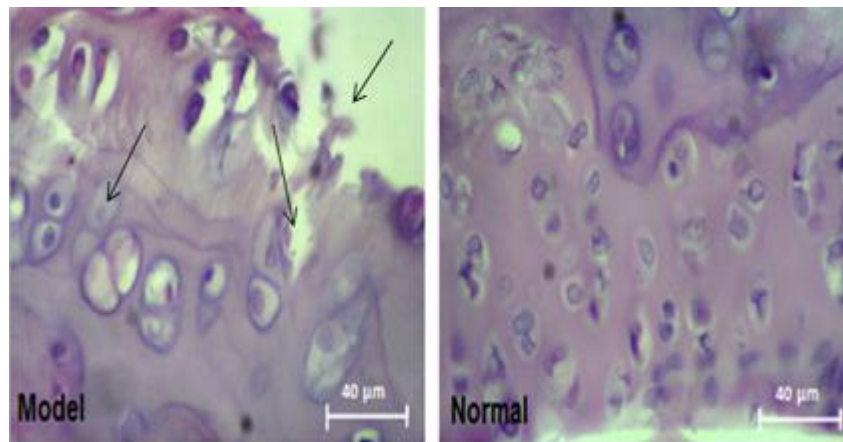


توزیع داده ها و تست لون برای تجانس واریانسها استفاده شد. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون توکی برای بررسی تفاوت بین گروهها در دادههای پارامتریک کروسکال والیس و یومن ویتنی برای دادههای ناپارامتریک در نظر گرفته شد. سطح معنی داری، $P \leq 0.05$ بود. آنالیز تمام دادهها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام پذیرفت.

یافتهها

شکل یک نتایج هیستولوژی بافت غضروف در گروه بیمار، آسیب سلولهای کندروسیت و تخریب بافت استخوانی در زیر غضروف مفصلی را نشان می دهد.

واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). سطوح بیان mRNA متغیرها در قیاس با بیان ژن مرجع گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) و برآورد آن با فرمول $2^{-\Delta Ct}$ در نظر گرفته شد. در این ارتباط، سیکل آستانه ای بیان شدن (Ct) و اختلاف آن با بیان ژن مرجع بر پایه لگاریتم ۲ در نظر گرفته شد. براین اساس، مقادیر کمتر دادههای ΔCt نشان دهنده بیان بیشتر و مقادیر بیشتر $2^{-\Delta Ct}$ نشان دهنده بیان بیشتر ژن مربوطه بود. در تجزیه و تحلیل آماری، آزمون شاپیروویلیک برای بررسی نرمال بودن



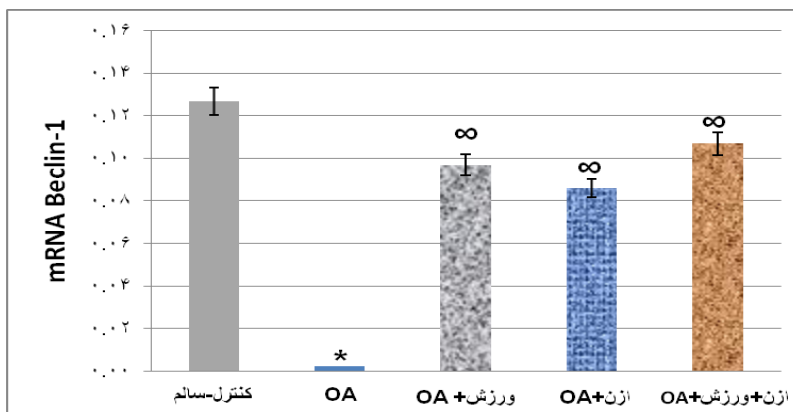
شکل ۱- نتایج هیستولوژی بافت غضروف در گروه بیمار و سالم

آنالیز دادههای Beclin-1 mRNA منتج از RT-PCR با محاسبه $2^{-\Delta Ct}$ نشان داد، تفاوت معناداری بین گروهها وجود داشت ($P < 0.001$). در ادامه، اختلاف گروه OA با گروه کنترل سالم ($P = 0.008$)، ازن + OA ($P = 0.009$)، ورزش + OA ($P = 0.009$) و ازن + ورزش + OA ($P = 0.009$) معنادار بود. با این وجود، تفاوت معناداری بین گروههای ورزش + OA، ازن + OA و ازن + ورزش + OA وجود نداشت ($P = 0.132$ ، $P = 0.531$) (نمودار ۱).

همچنین ژن توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

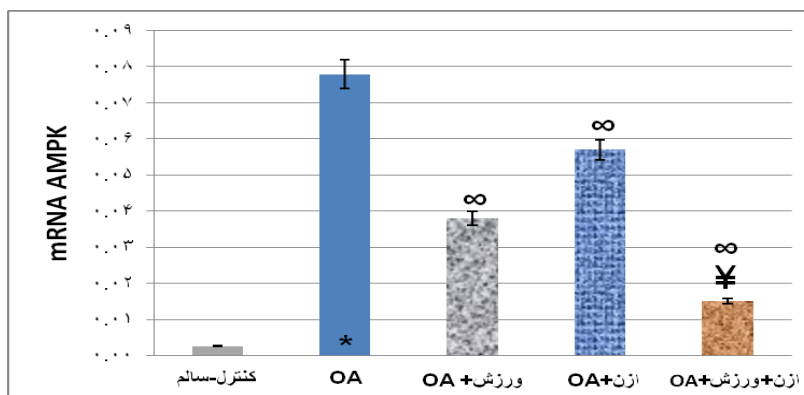
mTOR -R	GCACTATGGGAGAGAGGAGAGT
mTOR -F	GGTAGGGCAACTGAGTAGATG
Beclin R	TGTGGAAGGTGGCATTGAAGAC
Beclin F	AGGCTGAGGCGGAGAGATTG
AMPK R	TCGTTGTGCCTTTATTAGTGCATC
AMPK F	CACTGCTCTGTCTGTGTAGGTTG



نمودار ۱- مقایسه میانگین بیان ژن mRNA Beclin-1 در بین گروه‌ها (داده‌ها براساس فولد تغییر نسبت به GAPDH) علامت‌ها نشان دهنده اختلاف معنادار هستند. (*: نسبت به گروه کنترل سالم. ∞: نسبت به گروه OA)

بود. همچنین اختلاف بین گروه ازن+ورزش+OA با گروه OA ($P=0/01$) و ازن+OA ($P=0/001$) معنادار بود. با این وجود، اختلاف بین گروه ورزش+OA با ازن+OA معنادار نبود ($P=0/132$) (نمودار-۲).

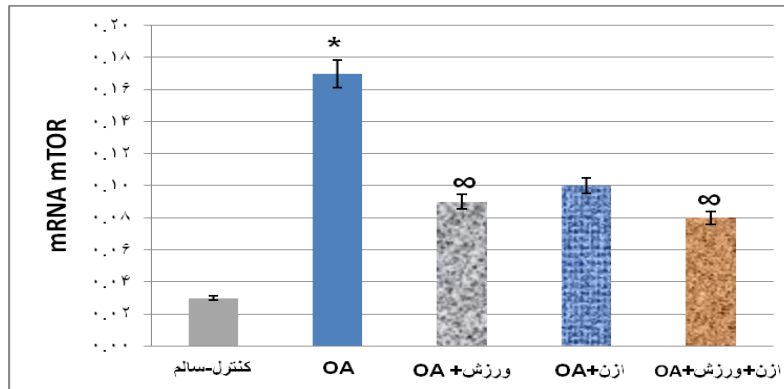
مقایسه با آنالیز واریانس‌ها نشان داد تفاوت معناداری بین میانگین بیان mRNA متعلق به AMPK گروه‌ها وجود داشت ($P<0/001$). در ادامه، اختلاف بین گروه کنترل سالم با دو گروه OA ($P=0/008$) و ازن+OA ($P=0/001$) معنادار



نمودار ۲- مقایسه میانگین بیان ژن mRNA AMPK در بین گروه‌ها (داده‌ها براساس فولد تغییر نسبت به GAPDH) علامت‌ها نشان دهنده اختلاف معنادار هستند. (*: نسبت به گروه کنترل سالم، ∞: نسبت به گروه OA و †: نسبت به گروه ازن+OA)

معناداری بین گروه‌های ورزش+OA، ازن+OA و ازن+ورزش+OA وجود نداشت (به ترتیب $P=0/065$ ، $P=0/111$) (نمودار-۳).

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معناداری بین میانگین بیان mRNA mTOR گروه‌ها وجود داشت ($P<0/001$). در ادامه، اختلاف بین گروه کنترل سالم با گروه OA ($P=0/001$) معنادار بود. با این وجود، تفاوت



نمودار ۳- مقایسه میانگین بیان ژن mRNA mTOR در بین گروه‌ها (داده‌ها براساس فولد تغییر نسبت به GAPDH)
علامت‌ها نشان دهنده اختلاف معنادار هستند. (*: نسبت به گروه کنترل سالم، ∞: نسبت به گروه OA)

بحث

مکانیکی، کندروسیت‌ها می‌توانند سنتز ماتریکس خارج سلولی را در پاسخ به استرس مکانیکی افزایش دهند (۲۳). هرچند سازوکار اصلی اثر تمرینات ورزشی بر فاکتور Beclin-1 ناشناخته مانده است، ولی بنظر می‌رسد سیگنال‌های سنسورهای مکانیکی، نقش مهمی در تنظیم آسیب غضروف و بازسازی آن دارد (۲۴). از نتایج دیگر پژوهش حاضر، افزایش بیان mRNA فاکتور Beclin-1 با ازن درمانی بود. این نتیجه با مطالعه ژائو و همکاران (۲۰۱۵) همخوان است. در این مطالعه، اثر ازن درمانی بر اتوفاژی کندروسیت‌ها را تا حدودی وابسته به دوز تزریقی ازن دانستند و اشاره نمودند که ازن می‌تواند از بیان ژن فاکتورهای التهابی مانند IL-6 و TNF- α جلوگیری نماید که قادرند اتوفاژی را سرکوب نمایند (۱۵).

یافته‌های این مطالعه نشان داد بیان mRNA AMPK در مواجهه با OA افزایش بسیار زیادی داشت. بنظر می‌رسد بیان شدن در این سطوح مرتبط با پاسخ جبرانی کندروسیت‌ها به استرس ایجاد شده می‌باشد. یانگ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند که افزایش اختلال در حفظ تعادل انرژی با پیشرفت درجات بیماری همراه است و کاهش ظرفیت AMPK در بافت مفصلی، شرایط همئوستاز انرژی

یافته‌های این پژوهش نشان داد در موش‌های صحرایی گروه OA، مواجه شدن با استئوآرتریت زانو بیان mRNA فاکتور Beclin-1 را کاهش داد. گزارش شد که مقدار بیان Beclin-1 یکی از نشانه‌های اختلاف کندروسیت‌های سالم و OA است. به عبارت دیگر سطوح بیان Beclin-1 در OA کاهش می‌یابد (۱۵). کاهش یافتن بیان Beclin-1 مرتبط با کاهش اتوفاژی، آسیب میتوکندری و آپوپتوز کندروسیت‌ها می‌باشد (۲۰). با این وجود، یک دوره تمرین ورزشی دویدن با شدت ملایم در موش‌های OA پژوهش حاضر، با افزایش بیان Beclin-1 کندروسیت‌ها همراه شد. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ توسط ژانگ و همکاران انجام شد مشخص گردید، بیان mRNA فاکتور Beclin-1 در کندروسیت‌های موش‌های مدل OA بعد از چهار هفته دویدن روی نوارگردان، با سرعت ۱۸ متر در دقیقه، افزایش یافت (۱۱)، که با یافته تحقیق حاضر همسو است. نتایج تحقیقات حاکی از این است که تحریکات مکانیکی باعث پاسخ‌های فیزیولوژیکی مختلفی می‌شود (۲۱). فعالیت‌های مناسب ورزشی، سودمندی‌هایی مانند کاهش درد و بهبود جنبش‌پذیری در OA را به همراه دارد (۲۲). به دلیل وجود سنسورهای حساس به استرس



نبود و نقشی در اثر ورزش در گروه مربوطه (گروه ازن+ورزش+OA) نداشته است. در مطالعه ژائو و همکاران (۲۰۱۸) به نقش ازن در کاهش IL-1B و TNF- α و فعال شدن مسیری AMPK/mTOR در کندروسیت‌ها اشاره شد (۱۵) که در متدولوژی و بویژه دوز بکار گرفته شده مطالعه مذکور (۳۰ $\mu\text{g/mL}$) و مطالعه ما (۲۰ $\mu\text{g/mL}$) متفاوت بوده است.

همچنین در پژوهش حاضر، مبتلا شدن به OA، سطوح mRNA mTOR غضروف مفصلی را افزایش داد. این افزایش می‌تواند بطور غیرمستقیم به مهار اتوفاژی و پیشرفت آپوپتوز در کندروسیت‌ها مرتبط باشد. افزایش بیان mRNA mTOR کندروسیت‌ها با وجود OA در غضروف انسان، موش و سگ‌ها مشاهده شده است (۲۹). تمرین ورزشی بکار رفته در مطالعه حاضر، همراه با ازن، در کاهش سطوح mRNA mTOR موثر بوده است. با وجود آن که کمپلکس ۱-راپامایسین (mTOR-C1) تنظیم‌کننده اولیه در راه‌اندازی اتوفاژی است (۳۰)، بیان بیش از حد mRNA mTOR به همراه کاهش Beclin-1 از نشانه‌های کاهش ظرفیت اتوفاژی و پیری است (۱۱). در پژوهش حاضر، شدت تمرین دویدن ملایم و متوسط بود و آثار آن در کاهش بیان mRNA mTOR به همراه افزایش Beclin-1 مشاهده شد. بکارگیری تمرین با شدت متوسط در OA که سبب رشد و تکثیر کندروسیت‌ها گردد، در برخی مطالعات مورد تایید قرار گرفته است (۱۱). بنظر می‌رسد تمرین با شدت متوسط با مکانیسم ناشناخته‌ای، سیگنال‌های ناشی از فاکتورهای مکانیکی را در جهت رشد و تکثیر کندروسیت‌ها راه‌اندازی می‌کند (۱۱). در مطالعه ما، بکارگیری ازن در OA تاثیری در بیان mRNA mTOR نداشته است. هرچند، این نتیجه می‌توانست تحت تاثیر دوز بکار رفته ازن قرار گرفته باشد (۱۵)، ازن بکارگیری شده در OA می‌تواند سطوح فاکتورهای التهابی

در دسترس کندروسیت‌ها را به خطر می‌اندازد. بر این اساس، در شرایط استرسی سلول مانند اختلالات میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو، التهاب، پاسخ سلول‌ها در جهت بقای سلول و عملکرد بافت است. سنسورهای حساس انرژی، مانند AMPK شرایط فیزیولوژیک را برای مقابله با استرس ایجاد شده فراهم می‌کنند. بنابراین، فعال شدن AMPK در کندروسیت‌های مفصلی با حفظ و تنظیم تعادل انرژی، در جهت پایداری داخل سلول، مقاومت سلولی و کنترل کیفی کندروسیت‌ها عمل می‌کند (۲۵). از مکانیسم‌های احتمالی دیگر می‌توان به نقش غیرمستقیم گونه‌های فعال اکسیژنی ناشی از میتوکندری‌های آسیب دیده در افزایش بیان AMPK اشاره نمود (۲۶). قابل ذکر است که شکل‌گیری OA ممکن است آسیب‌های میتوکندریایی را به همراه داشته باشد، که در اینصورت، مصرف اکسیژن، سطوح ATP، استرس اکسیداتیو، التهاب و کاتابولیسم ماتریکس غضروفی تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در چنین شرایطی، پاسخ سلول افزایش فعال‌سازی و ظرفیت AMPK در جهت بایوژنز میتوکندریایی با درگیر نمودن فاکتورهای مانند PGC-1 α می‌باشد (۲۷). هم‌چنین، یک دوره تمرین دویدن روی نوارگردان در موش‌های OA، سطوح افزایش یافته AMPK mRNA را کاهش داد. مطالعات نشان دادند که تحریکات مکانیکی، سیگنال‌های قوی‌تری در جهت جلوگیری از بیان ژن فاکتورهای التهابی در کندروسیت‌ها ارسال می‌کنند (۲۸). علاوه بر آن، نشان داده شد که تمرینات ورزشی با کاهش فاکتورهای التهابی مانند IL-1B (۱۷) می‌توانند در بایوژنز میتوکندری و بهینه نمودن هموستاز انرژی کندروسیت‌ها نقش داشته باشند. هرچند مکانیسم‌های درگیر همچنان ناشناخته هستند، برای درک بهتر این مساله، نیازمند مطالعات بیشتری هستیم. در مطالعه حاضر، تزریق ازن با وجود OA، قادر به کاهش mRNA AMPK



و عدم تنظیم آنها با سرطان و سایر پاتولوژی‌ها، از جمله OA همراه است (۳۵).

نتیجه‌گیری

در مجموع، این پژوهش نشان داد در بافت غضروف مفصلی موش‌های مبتلا به OA سطوح mRNA مولکول Beclin-1 (بعنوان یکی از شاخص‌های اصلی اتوفازی) کاهش یافت، ولی سطوح mTOR و AMPK افزایش بسیار زیادی داشت. در مقابل، یک دوره تمرین با شدت متوسط، همراه با ازن درمانی، ضمن افزایش سطوح Beclin-1، سبب کاهش سطوح افزایش یافته mTOR و AMPK ناشی از OA شد. هرچند در پژوهش حاضر، بیان پروتئینی مولکول‌ها و همچنین سطوح فاکتورهای دیگر اتوفازی از جمله ULK-1 و LC3 اندازه‌گیری نشد، با توجه به مطالعات گذشته و نتایج این مطالعه، در موش‌های صحرایی مدل OA، در مقایسه با ازن درمانی، یک دوره تمرین ورزشی با شدت متوسط در کنترل فرآیند اتوفازی و بازسازی کندروسیت‌ها دخالت بیشتری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع در اجرای این پژوهش وجود نداشته است.

مانند TNF- α کندروسیت‌های مفصلی را کاهش دهد (۱۷). نکته قابل ذکر، حضور چشمگیر TNF- α در استخوان و مفاصل آسیب دیده است (۳۱). بر این اساس، نقش ازن در مهار و کاهش TNF- α ممکن است سبب کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)^۱ در OA گردد که در اینصورت، فاکتور هسته‌ای کاپایی^۲ (NF- κ B) مهار شده و شرایط بهبود مفصلی آسان خواهد شد. در این ارتباط، NF- κ B می‌تواند فعالیت بسیاری از ژن‌های التهابی را راه‌اندازی و شرایط سلولی را دشوار نماید (۳۲). هم‌چنین ازن از بیان بسیار زیاد نیتریک اکساید (NO)^۳ جلوگیری می‌نماید که خود، یکی از واسطه‌های فعال شدن و سطوح ترجمه‌ای NF- κ B می‌باشد (۳۳). از نکات قابل ذکر دیگر این است که پیشرفت OA با تغییرات عمیق کنترل اپی ژنتیک بیان ژن و عوامل رونویسی همراه است که منجر به تغییرات مشخصی در بیان ژن هدف در بافت مفصل از طریق تغییر وضعیت متیلاسیون ژنوم می‌شود (۳۴). از محدودیت‌های پژوهش حاضر، عدم اندازه‌گیری بیان سطوح پروتئینی متغیرهای یاد شده بود. همچنین سطوح برخی از عوامل مداخله‌گر ژنی در پژوهش حاضر اندازه‌گیری نشد که امکان داشت نتایج این تحقیق را دست‌خوش تغییر نمایند. از جمله، میکرو RNAها (miRs) یا همان RNAهای کوچک و غیر کدومی اندوژنی که قادر به بیان ژن به واسطه کاهش mRNA یا مسدود کردن ترجمه mRNA هستند و در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند آپوپتوز، تمایز سلولی و متابولیسم شرکت نموده

¹ Reactive oxygen species

² Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B cells

³ Nitric Oxide



References

1. Musumeci G, Aillo FC, Szychlinska MA, Di Rosa M, Mobasheri A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6093-112.
2. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) *Osteoarthritis and Cartilage* 2013;21(1):16-21.
3. Li YS, Xiao WF, Luo W. Cellular aging towards osteoarthritis. *Mech Ageing Dev.* 2017;162:80-84.
4. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
5. Wu L, Liu H, Li L, Cheng Q, Huang H. Mitochondrial pathology in osteoarthritic chondrocytes. *Current Drug Targets.* 2014;15(7):710-719.
6. Li YS, Zhang FJ, Zeng C, Luo W, Xiao WF. Autophagy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2016;83(2):143-8.
7. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40:280-93.
8. Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: A new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs.* 2009;189:88-92.
9. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 2016;26:1021-1032.
10. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH. PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):569-578. [Persian]
11. Zhang X, Yang Y, Li X. Alterations of autophagy in knee cartilage by treatment with treadmill exercise in a rat osteoarthritis model. *Int J Mol Med.* 2019; 43: 336-344.
12. Arias-Vázquez PI, Tovilla-Zárate CA, Bermudez-Ocaña DY, Legorreta-Ramírez B. Efficacy of Ozone Infiltrations in the Treatment of Knee Osteoarthritis Vs Other Interventional Treatments: A Systematic Review of Clinical Trials. *Rehabilitacion (Madr).* 2019;53(1):43-55.
13. Morouço P, Fernandes C, Santos-Rocha R. Osteoarthritis, Exercise, and Tissue Engineering: A Stimulating Triad for Health Professionals. *J Aging Res.* 2019;2:1935806.
14. Benvenuti P. Oxygen-ozone treatment of the knee, shoulder and hip: a personal experience. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozoterapia.* 2006;5:135-44.
15. Zhao X, Li Y, Lin X, Wang J, Zhao X. Ozone induces autophagy in rat chondrocytes stimulated with IL-1 β through the AMPK/mTOR signaling pathway. *J Pain Res.* 2018;11:3003-3017.
16. Moher D, Dulberg CS, Wells GA. Statistical power, sample size, and their reporting in randomized controlled trials. *JAMA.* 1994;272(2):122-4.
17. 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 Orthopaedic Surg Traumatol.* 2014;24(3):263-271.
18. Asadi S, Farzanegi P, Azarbayjan MA. Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF- α in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. *Social Determinants of Health.* 2018;4(3). [Persian]
19. Baghban Eslaminezhad MR, Taghiyar L, Falahi F. Study of expression level of cartilage genes in rat articular chondrocyte monolayer and 3D cultures using real time PCR. *J of Iranian Anatomical sciences.* 2010;8(31):107-116. [Persian]
20. Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology.* 2010;62(3):791-801.
21. Wu C, Zheng J, Yao X. Defective autophagy in chondrocytes with Kashin-Beck disease but higher than osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014;22(11):1936-1946.
22. Grad S, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ. Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: A review. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2011;469(10):2764-2772.
23. Barbour KE, Hootman JM, Murphy L B. Meeting physical activity guidelines and the risk of incident knee osteoarthritis: A population-based prospective cohort study. *Arthritis Care & Research.* 2014;66(1):139-146.
24. Harvey L A, Brosseau L, Herbert R D. Continuous passive motion following total knee arthroplasty in people with arthritis *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014;6(2):004260.
25. Yang Y, Wang Y, Kong Y, Zhang X. Mechanical stress protects against osteoarthritis via regulation of the AMPK/NF- κ B signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):9156-9167.



26. Liu-Bryan R. Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1835-42.
27. Hinchy EC, Gruszczuk AV, Willows R, Navaratnam N. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem*. 2018;293(44):17208-17217.
28. Wang Y, Zhao X, Lotz M, Terkeltaub R. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritic chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α . *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(8):2141-2153.
29. Agarwal S, Deschner J, Long P, Verma A. Role of NF- κ B transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50(11):3541-3548.
30. Zhang Y, Vasheghani F, Li YH, Blati M, Simeone K. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(7):1432-40.
31. Rabanal-Ruiz Y, Otten E G, Korolchuk V I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*. 2017;61: 565-584.
32. Vailant JD, Fraga A, Diaz MT, Mallok A. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;714:318-324.
33. Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(4):672-679.
34. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett*. 2006;106:8-13.
35. Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-840.
36. Zhang M, Lygrisse K, Jinxi Wang J. Role of MicroRNA in Osteoarthritis. *J Arthritis*. 2017;6(2):239,1-13.



The comparison of the effect of an aerobic training period and ozone therapy on gene expression of Beclin-1, AMPK and mTOR of articular cartilage tissue in rats model of osteoarthritis

Azadeh Nosratpour¹, Parvin Farzanegi^{2*}, Reza RezaeeShirazi¹

1- Department of Physical Education, Aliabad Katoul branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

2- Department of sport physiology, Sari branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Original Article

Received: 26 Aug 2019

Accepted: 6 Jan 2020

***Corresponding Author:** Dr Parvin Farzanegi, Department of sport physiology, Sari branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
TEL: 09112230233
Email: Parvvin.farzanegi@gmail.com

ABSTRACT

Introduction

The aim of the research was to investigate the effect of 8 weeks' exercise training and ozone therapy on articular cartilage tissue mRNA Beclin-1, AMPK, and mTOR gene expression in rat's model of osteoarthritis (OA).

Materials and Methods

In this experimental study, 40 adult male rats 210±10 gr were randomly divided into 5 groups: 1) control (CN), 2) OA, 3) OA + ozone, 4) OA + exercise training and 5) OA + ozone + exercise training groups. The knee OA was induced by the surgical method in rats. The exercise training included running on a treadmill for 8 weeks, five times a week, and 35-45 minutes in an exercise session and with 18m per minute speed.

Rats in the ozone group received ozone (O₃) at a concentration of 20µg/ml, once weekly for 3 weeks. 48 hours after the programs and fasting, cartilage tissues were isolated, and articular cartilage tissue mRNA Beclin-1, AMPK, and mTOR gene expression were considered using Real-Time PCR (RT-PCR).

Results

In cartilage tissue, Beclin-1 levels had a significant decrease in the OA group, but AMPK and mTOR levels increase. Ozone, exercise training, and ozone + exercise training Caused to reverse the process (P=0.009). But, there was no significant difference between these groups (P≥0.05).

Conclusion

According to the results of this study, ozone therapy and moderate-intensity exercise training Increase Beclin-1 levels in the articular cartilage tissue. However, moderate-intensity exercise training with adjustable levels of mTOR may Play a greater role in the control of articular chondrocyte autophagy in rat's model of OA.

Keywords

Aerobic Exercise, Ozone Therapy, Osteoarthritis, Beclin-1, AMPK, mTOR

► **Please cite this article as:** Nosratpour A, Farzanegi P, RezaeeShirazi R. The comparison of the effect of an aerobic training period and ozone therapy on gene expression of Beclin-1, AMPK and mTOR of articular cartilage tissue in rat's model of osteoarthritis. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020;8(4):124-135.