

## Research Paper

# Effect of Three Therapeutic Methods of Exercise, Ozone, and Stem Cells on the MEF2C Expression and Myostatin Levels in Femoral Muscle Tissue of the Osteoarthritis Rats



Zahra Haddadpour<sup>1</sup>, \*Hajar Abbaszadeh<sup>1</sup>, Parvin Farzanegi<sup>1</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.



**Citation** Haddadpour Z, Abbaszadeh H, Farzanegi P. [Effect of Three Therapeutic Methods of Exercise, Ozone, and Stem Cells on the MEF2C Expression and Myostatin Levels in Femoral Muscle Tissue of the Osteoarthritis Rats (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(3):260-275. <https://doi.org/10.32598/hms.26.3.3145.2>

**doi** <https://doi.org/10.32598/hms.26.3.3145.2>



**Received:** 16 Dec 2019

**Accepted:** 19 Jan 2020

**Available Online:** 01 Jul 2020

### Key words:

Exercise, Ozone,  
Stem cells, Myocyte  
Enhancer Factor 2C  
(MEF-2C), Myostatin,  
Osteoarthritis

## ABSTRACT

**Aims** Myostatin and Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) are involved in muscle changes associated with bone problems. The aim of the present study was to determine the effect of three therapeutic methods of exercise, ozone, and stem cells on MEF-2C gene expression and myostatin levels of femoral muscle tissue in osteoarthritis rats.

**Methods & Materials** This experimental study was done on 63 male rats (mean age of 8-12 weeks and weight of 250-300 g). They were randomly divided into nine groups: the healthy control and osteoarthritis group and seven intervention groups of osteoarthritis rats, including , saline, exercise, ozone therapy, MSCs, MSCs+ozone therapy, exercise+ozone therapy, and exercise+MSCs. Osteoarthritis was induced in rats by surgery. The training program consisted of 30 min of running on a non-slip treadmill at a speed of 16 m/min. Rats in the MSCs group received  $1 \times 10^6$  cells/kg. The ozone was injected into the articular line of the knee tibiofemoral at a concentration of 20  $\mu\text{g/mL}$ . Tissue levels of myostatin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay kits and MEF2C gene expression was measured by real-time polymerase chain reaction method.

**Findings** Cell+exercise, exercise+ozone, and cell+ozone groups showed a significant increase in MEF2C gene expression and a significant decrease in myostatin levels compared with the cell, exercise, and ozone groups ( $P < 0.05$ ). In the exercise+cell group, these changes were greater.

**Conclusion** The results showed that the combination of exercise and MSCs with an increase in MEF2C gene expression and a decrease in myostatin levels, can possibly have beneficial effects on the stimulatory and inhibitory factors of interactions between muscle and bone in the osteoarthritis rats, and ultimately reduce the risks of muscle weakness due to osteoarthritis complications.

### \* Corresponding Author:

Hajar Abbaszadeh, PhD.

**Address:** Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

**Tel:** +98 (911) 2163511

**E-mail:** h.abaszade61@gmail.com

## Extended Abstract

### 1. Introduction

**O**steoarthritis is the most common joint disease that may occur due to several causes, including age, sex, genetics, bone density, endocrine disorders, major joint injuries, excessive pressure on joints caused by extreme jobs or workout routines, congenital or developmental disorders, previous defects of the joints, and inflammatory diseases of the joint [1].

The main limitation in the management of patients with osteoarthritis, which slows down the patient's recovery, is the lack of an appropriate treatment method. Methods, such as exercising and weight loss improve the symptoms, but to date, no factors have been found to affect the disease progression [2, 3]. This is also true about non-steroidal anti-inflammatory drugs, intra-articular hyaluronic injections, dietary supplements, anterior cruciate ligament repair surgery, and meniscus. Therefore, the lack of intervention to target the course of the disease has led to a significant increase in knee replacement surgery [2, 4].

The safe, effective, and cheaper treatment that can change the course of the disease will have a major impact on the quality of life and health care costs in the future. Due to the poor repairing ability of chondrocytes, cartilage damages caused by osteoarthritis and trauma have posed major challenges in clinical management. In the meantime, stem cell therapy and cartilage tissue engineering open up new ways for treating damaged cartilages [5]. Mesenchymal Stem cells (MSCs) have been considered as a biological therapeutic agent for the treatment of inflammatory diseases and tissue repair. The intra-articular injection of MSCs is effective in treating osteoarthritis [5, 6]. Stem cells are derived from various tissues and have the potential to become different tissues [7]. In 2016, Lee et al. showed that MSCs treatment method can repair damaged cartilages in mice [5]. Also in 2012, Howell et al. found that arthritic mice had more ability to put weight on the affected foot after mesenchymal therapy [8].

Another treatment recommended for osteoarthritis is ozone therapy. This method is used for therapeutic purposes in various body structures, especially in chronic diseases, such as rheumatism and osteoarthritis [9, 10]. Several studies have been conducted on the use of intra-articular ozone in the treatment of osteoarthritis [9, 11-13]. Because osteoarthritis is a progressive and chronic destructive disease and causes many disabilities in a person, regular exercise is an integral part of treating knee osteoarthritis [14]. Regu-

lar exercise at an appropriate intensity is useful to prevent muscle loss and resistance to daily activities. It also leads to pain management and the prevention of a limited range of motions in the joint [15]. However, water exercises are preferred for osteoarthritis patients because of their unique characteristics, such as floating [16].

Numerous studies have examined the effect of exercise on knee osteoarthritis [17-19]. On the other hand, studies have reported that in some patients, the knee pain is associated with joint instability, muscular dystrophy, and the inability of the patient [20]. Another study reported that the degree of disability in a patient with osteoarthritis may be associated with weakness, erosion, or muscle damage in involved parts [21]. Therefore, considering that one of the goals of treatment of these patients is to reduce pain, maintain joint mobility, and minimize disability, examining strategies for strengthening, growing, rebuilding, and the mechanisms involved in repairing damaged or atrophied muscles in knee osteoarthritis can help for better understanding of the problem. Cellular studies have reported that factors, such as myostatin and myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) play a role in muscle changes associated with bone diseases [22].

Myostatin has been reported to negatively regulate muscle mass, and MEF2C is an important factor that interacts with myogenic regulatory factors. Mice without MEF2C in osteocytes showed a decrease in sclerostin levels [22]. Therefore, given that MSCs and ozone therapy are relatively new treatment methods that appear to be effective in the interactions between muscle tissue and bone metabolism, no research has yet been done on the effect of these methods on the regulatory and inhibitory factors affecting the interactions between muscle tissue and bone metabolism in osteoarthritis patients with regular aerobic exercise. Thus, in this study, we investigated the effect of three treatment methods of exercise, ozone, and stem cells on myostatin levels and MEF2C gene expression in an arthritic mouse model to find a useful and appropriate solution to improve the physical performance of people with osteoarthritis.

### 2. Materials and Methods

The present experimental study was conducted on male Wistar rats aged 8-12 weeks with an average weight of 250-300 g. The sample size was determined 63 rats using the software G\*Power V. 3.1.9.2, the effect size of 0.55, alpha of 0.05, and power of 0.8. The rats were randomly divided into nine groups of 7, including two healthy control and unhealthy osteoarthritis groups, and seven intervention groups of osteoarthritis rats, including saline (saline injection to control the possible effects of injection in the research), exercise, ozone therapy, MSCs, MSCs+ozone therapy, exercise+ozone

therapy, and exercise+MSCs. The subjects were kept in an environment with an ambient temperature of 22.2°C and a humidity of 55.5% and were freely fed and watered.

### Research protocol

#### How osteoarthritis was induced

According to Malfait et al. surgery method (2015), osteoarthritis was induced in the rats [23]. The rats were anesthetized with ketamine and xylene. After modifying the right knee, a one-centimeter incision was made to make the knee joint appear and then, immediately opened with lateral displacement of the patella and patellar ligaments. A longitudinal cut was made by cutting the medial parapatellar. The lateral transfer of patella and patellar ligaments was done by forceps and then, an incomplete incision was made in the internal cruciate ligament without damage to the articular cartilage and other ligaments. Finally, the joint capsule with 6 absorbable stitches and the skin with 6 silk stitches were closed.

#### Exercise program

One month after the surgery, a week was spent getting acquainted with the research environment and the conveyor belt. For this purpose, the rats were active on the treadmill for 3 days a week, 10 min each session at a speed of 16 m/min, Vo<sub>2</sub>max of about 60%-70%, and a slope of 0%. By observing the overload principle, the main training program in the first week was changed into 50 min training in the eighth week. Also, 5 min of running at a speed of 8 m/min was included before and after the training for warming up and cooling down the animals. During the exercise, the control group only stood on the treadmill and the device was not turned on.

#### Stem cells preparation and injection

MSCs were extracted from the bone marrow of healthy Wistar male rats after being anesthetized with ketamine and xylazine. Isolated MSCs were incubated for 24 h in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) environment with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) for the cell adhesion process. Every 3 days, the cultivations were changed from the flask environment to separate the non-stick cells and MSCs reached 90% purity after 3-4 times passaging and were selected for injection. Rats in the MSCs group received 1×10<sup>6</sup> cells/kg by intra-articular injection of MSCs injected into the right knee joint of them.

#### Ozone therapy

Ozone was made from grade B medical oxygen by the OZOMED 01 device. It was produced by a low-intensity electric discharge, and its concentration was measured using ultraviolet light at 254 nm. Ozone was injected once a week for 3 weeks, 21 days after osteoarthritis was first induced in the rats, in the knee's tibiofemoral joint line, at a concentration of 20 µg/mL.

#### Sampling and measuring research variables

At the end of the research procedure, all animals with completely similar conditions and following 12-14 h of fasting and 48 h after the last training session and injections (to eliminate the acute effects of exercise and other interventions) were anesthetized by intramuscular injection of ketamine and xylazine and then, were killed. After opening the abdominal cavity, the muscle tissue was carefully separated and frozen after rinsing with distilled water. All frozen muscle tissues were homogenized in protease buffer in liquid nitrogen after being completely grinding followed by centrifugation for 20 min at 12000 rpm and 4°C. The solution was frozen at -80°C to be used for chemical analysis.

The measurement of the myostatin tissue levels of the thigh muscle was done with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit made by Lsbio Co. according to the manufacturer's instructions. Gene expression analysis in the muscle tissue was measured by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method and after quantifying, gene expression values were analyzed using 2-ΔΔC<sub>t</sub> formula. Initially, the muscle samples were homogenized with a homogenizer in the phosphate buffer (pH 7.0) at 4°C. All RNAs were extracted from the muscle tissue of all rats according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Germany).

The spectrophotometric method with light absorption property at 260 nm was used to estimate the quantity and quality of the extracted RNAs. After extracting RNA with purity and high concentration from all animals, the steps of cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA). Then, the synthesized cDNA was used to perform the reverse transcription reaction. First, all designed primers for the MEF2C gene were examined, and the expression of genes was investigated using real-time quantitative PCR. The expression of the desired genes was performed by real-time PCR method and by RT-qPCR kits (Ampliqon, Denmark) in 40 cycles. Table 1 presents the sequence of primers used.

Data were expressed using Mean±Standard Deviation, and the Shapiro-Wilk test was used to determine whether

**Table 1.** Specifications of the primers used to match the Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) gene

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Annealing Temperature
MEF2C	ATCTCTCCCTGCCTTCTACTC	CTCCCATCGTAGGAAGTGC	60°C

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

the data distribution was normal. Also, to investigate the significant changes in variables between different groups, One-way Analysis of Variance (ANOVA) was used and when a significant statistical difference was observed, Tukey's range test was used. All statistical analyses were performed using GraphPad prism V. 8 software at a significance level of  $P < 0.05$ .

### 3. Results

The results of one-way ANOVA showed that there was a difference between different expression levels of the MEF2C gene in femoral muscle between different groups ( $P < 0.0001$ ;  $F = 56.11$ ) (Table 2).

The results of the Tukey post-hoc test also showed that there was a significant difference between the mean ex-

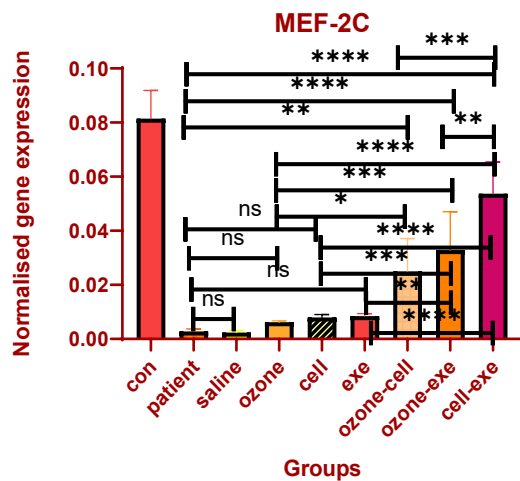
pression of the MEF2C gene in femoral muscle in rats with osteoarthritis compared with MSCs+exercise, exercise+ozone, and MSCs+ozone groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 1). The results of the Tukey test also showed that there was a significant difference between the mean muscle-building effect of myostatin in rats with osteoarthritis compared with other groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 2). The MSCs + Exercise, exercise+ozone, and MSCs+ozone groups showed a significant reduction in myostatin levels of femoral muscle compared with the MSCs, exercise, and ozone groups ( $P < 0.05$ ). Significantly, the reduction in myostatin levels of femoral muscle was higher in treated rats with a combination of MSCs+exercise than in other groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 2).

**Table 2.** Results of One-way Analysis of Variance (ANOVA) for MEF2C gene expression and femoral muscle myostatin levels

Statistics	Groups	Mean±SD	F	df	P
MEF2C gene expression	Healthy control	0.08148±0.0104	56.11	8.36	> 0.0001
	Unhealthy osteoarthritis	0.002774±0.0009081			
	Saline	0.002368±0.0007969			
	Ozone therapy	0.006176±0.0005154			
	MSCs	0.007976±0.001037			
	Exercise	0.00843±0.000927			
	MSCs+ozone therapy	0.02492±0.01217			
	Exercise+ozone therapy	0.03284±0.01424			
	Exercise+MSCs	0.05371±0.01179			
Myostatin levels (pg/mg tissue)	Healthy control	35.90±3.773	29.66	8.36	> 0.0001
	Unhealthy osteoarthritis	60.48±4.773			
	Saline	60.42±3.230			
	Ozone therapy	52.12±4.539			
	MSCs	52.17±4.111			
	Exercise	50.13±4.759			
	MSCs+ozone Therapy	40.05±3.087			
	Exercise+ozone therapy	40.46±3.644			
	Exercise+MSCs	38.35±3.174			

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences


Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

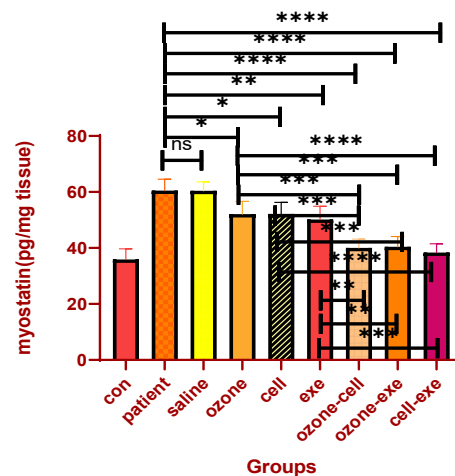
**Figure 1.** Comparison of the mean mRNA expression levels of the Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) gene in muscle identified by real-time polymerase chain reaction (PCR) in the healthy control, unhealthy osteoarthritis, saline, ozone therapy, Mesenchymal Stem Cells (MSCs), exercise, MSCs + Ozone, ozone+exercise, MSCs + Exercise groups.

There was a significant difference in the mean mRNA levels for the MEF-2C gene expression in the groups marked with (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\* $P > 0.0001$ ; \* $P < 0.05$ ; ns: not significant).

#### 4. Discussion

In this study, we evaluated the effectiveness of three therapeutic methods, including exercise, ozone, and stem cells, and their combination on myostatin levels and the expression of the MEF2C gene in the femoral muscle of arthritic rats. Our results showed that the expression of the MEF2C gene in the femoral muscle of the arthritic rat model decreased, whereas the levels of muscle myostatin increased. MEF2C is an important factor that interacts with myogenic regulatory factors, such as MyoD and Myf5. This interaction synergistically activates muscle-specific genes and biogenic differentiation. Decreased MEF2C in mice is associated with decreased sclerostin levels in osteocytes. Sclerostin is a blood factor produced by osteocytes and acts as an inhibitor of the Wnt signaling pathway that increases bone formation.

These findings suggest that the MEF2C-Sclerostin signaling pathway regulates the interaction between muscle and bone through Sclerostin [22]. In contrast, one of the mechanisms that can regulate muscle volume and strength is myostatin messaging. Myostatin is a member of the Transforming growth factor-beta (Tgf- $\beta$ ) family, specifically ex-


Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 2.** Comparison of the mean myostatin levels in the muscle identified by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method in the healthy control, unhealthy osteoarthritis, saline, ozone therapy, Mesenchymal Stem Cells (MSCs), exercise, MSCs + Ozone, Ozone + Exercise, MSCs + Exercise groups. There was a significant difference in mean expression levels of myostatin in groups marked with (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\* $P > 0.0001$ ; \* $P < 0.05$ ; ns: not significant).

pressed in skeletal muscle. Cellular effects of myostatin by autocrine and paracrine methods are the main regulators of skeletal muscle growth; therefore, its activation leads to the inactivation of the hypertrophic pathway and increasing its expression resulting in muscle atrophy.

Myostatin inhibits the proliferation and differentiation of myeloblasts as well as the Akt/mTOR pathway, which regulates muscle protein synthesis. Myostatin is a negative regulator of muscle growth, which acts by reducing the regulation of Akt/mTOR messaging pathways and phosphorylation of P70S6K2, rpS63, Akt, and 4E-binding protein in the interruption of muscle hypertrophy [24]. Myostatin also regulates the fiber-type composition of skeletal muscle by regulating the expression of the MEF2 gene [25].

On the other hand, no use of the arthritic joint leads to muscle weakness, and since the muscles play a significant role in protecting the cartilage, it is very important to strengthen the muscles around the joint. It has shown that when the muscles and limbs do not move much due to pain, they become weak and the muscle volume decreases by about 5% per day. Muscle strength is enhanced by the force produced inside it and exercise is one of the easiest ways to strengthen the muscle, by which the muscle can repeatedly contract and expand [26, 27].



The results of the present study showed that moderate-intensity exercise on the treadmill increased the expression of the MEF2C gene and reduced myostatin muscle levels. Carvalho et al. (2010) stated that inactivity or strenuous exercise worsens the osteoarthritis. In contrast, regular exercise programs at the right intensity help in preventing decreased muscle strength and resistance to daily activities [15]. Other meta-regulatory studies reported the reduced mRNA and myostatin protein levels after 6-12 weeks of exercise after a hypertrophic protocol.

Co-administration of myostatin showed an increase in serum Follicle-Regulating Gene (FLRG) and a decrease in activin IIb receptor. In addition, inhibition of endogenous myostatin in mice significantly reduces muscle damage and increases muscle strength and mass [28]. In a review article, Marlene Franzen et al. (2017) examined the effect of exercise on knee osteoarthritis using 44 experiments. They showed that exercise significantly reduced pain and improved physical performance immediately after the treatment. By a review of 13 studies, they showed that exercise significantly improved quality of life immediately after treatment; however, it was not significant. Moreover, 12 studies showed a significant reduction in knee pain 2-6 months after exercise [29].

An increase in MEF2 has also been shown after exercise [30]. Elimination of MEF2C in mice can reduce the ratio of type I fibers, and MEF2C can respond to several calcium-regulated signals and regulate the fiber-type composition of skeletal muscle. MEF2C also uses FOXJ3 as a downstream target gene, which can reduce type I fiber ratios by activating transcription by FOXJ3 [31].

In contrast, in the Anderson study, it was shown that MEF2C is required for the overall growth of the body in skeletal muscle; however, in assessing the ability of control mice and mice without MEF2C to perform running for one week on a training treadmill, no significant difference was observed [32]. As mentioned earlier, in addition to exercise therapy, other methods, such as cell therapy and ozone therapy are also used to treat patients with osteoarthritis.

In the present study, the effect of bone marrow-derived stem cell injection, as well as ozone therapy on arthritic rats, was investigated. The results of our study showed that both cell therapy and ozone therapy increased the expression of the MEF2C gene and reduced myostatin levels in the femoral muscle. However, the combination of these interventions showed significant results, so that MSCs+exercise, exercise+ozone, and MSCs+ozone caused a significant reduction in myostatin levels and a

significant increase in femoral muscle MEF-2C gene expression compared with other groups. These changes were significantly higher in treated mice with a combination of MSCs+exercise than in other groups.

In line with our findings, Gibbs et al. (2015) examined the combined effect of the exercise rehabilitation program and intra-articular injection of stromal bone marrow transplantation and Platelet-Rich Plasma (PRP) in patients with knee osteoarthritis. Their findings showed an improvement in people with osteoarthritis following this combined treatment [33].

In 2016, Lee et al. also showed that treatment with MSCs led to the repair of damaged cartilage in mice [5]. Also in 2012, Bevel and et al. studied the distribution of pain in arthritic mice after injecting MSCs into the affected knee and observed that the mice were more able to weigh on the affected leg after mesenchymal therapy [8]. The effect of stem cells on the treatment of atrophy by inhibiting myostatin has also been shown [34].

The use of stem cells, such as mesenchymal cells not only affects the structure of the damaged joint but also affects the anti-inflammatory and modulating aspects of the immune system. Stem cells have two important characteristics that distinguish them from other types of cells. These cells are non-specialized cells, which means that they do not act as heart muscle cells. They have the power to revival and regenerate themselves through cell division and can become specialized-directed cells under laboratory conditions. Young et al. showed that MSC uses the anti-inflammatory mechanism in the clinical treatment of knee injury that improves cell differentiation [35].

On the other hand, ozone therapy also produces ozone in the tissues and regenerates damaged tissues and weak tissues around the joints. Ozone therapy stops pain and inflammation, improves blood flow, increases nutrients for tissues, and delivers oxygen to damaged tissues. This method also improves movement and reduces joint pain.

Kamelia et al. reported the following beneficial effects of ozone: increased supply of oxygen to the tissues affected by inflammation and pain, increased blood flow, removing metabolic wastes in the affected joints, eliminating the blockage of substances that maintains inflammation and pain, strengthening the immune system, stimulation of the mechanisms that improve health in the body resulting in better joint mobility, and better functioning of the body system [36].

In general, the possible mechanisms of action of ozone therapy are its analgesic, anti-inflammatory, antioxidant effects (by activating cellular metabolism, reducing prostaglandin synthesis) as well as improving the quality of oxygen delivery to tissues (through anaerobic action, vasodilation, and stimulation of angiogenesis) [9, 10]. It has shown that ozone therapy can significantly reduce the pain by moderating osteoarthritis and improving functional status of the patients. The mechanism, by which ozone can raise the pain threshold is likely the stimulation of the analgesic system mediated by endogenous serotonin and opioids [37].

Therefore, our findings showed that the combination therapy with bone marrow-derived stem cell injections and moderate-intensity exercise, ozone therapy, and exercise improved MEF2C gene expression and muscle myostatin levels and also the effective interaction between muscle and bone in rats with osteoarthritis. The results showed that this method is more appropriate than other treatments, such as cell, ozone, and exercise therapies alone. It should be noted that the combined treatment using bone marrow-derived stem cell injections and moderate-intensity exercise has been more effective than the combination of ozone therapy and exercise. Although stem cells have restorative, anti-inflammatory, and immune-modulating properties, their combination with exercise therapy can be more effective in reducing disorders caused by osteoarthritis.

## 5. Conclusion

Overall, our results showed that a combination of exercise and MSCs by a significant increase in MEF2C gene expression and a significant decrease in myostatin levels in the femoral muscle could have beneficial effects on the stimulation and inhibition of the interactions between muscle and bone in the arthritic rat model. Therefore, it reduces the risk of muscle wasting and weakness due to osteoarthritis.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Animal Care Committee at the Islamic Azad University, Sari Branch (Approval No.: IR.IAU.REC.1398.33).

### Funding

This article was extracted from a PhD. thesis of Zahra Haddadpour at the Sari Branch, Islamic Azad University, Sari (ID: 70363).

### Authors' contributions

Final compilation: All authors Original idea, protocol implementation, manuscript writing, final review: Zahra Haddadpour; Methodology, interpretation of the data, manuscript writing, final review: Hajar Abbaszadeh; Manuscript writing, final review: Parvin Farzangi.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

Hereby, the authors thank the officials of the Animal Laboratory of the Islamic Azad University, Sari Branch, for their cooperation.

# اثر سه روش درمانی، تمرین، ازون و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن MEF-2C و سطوح Myo-statin بافت عضله رانی در مدل موش‌های آرتروزی

زهرا حدادپور<sup>۱</sup>، \*هاجر عباس‌زاده<sup>۱</sup>، پروین فرزانی<sup>۱</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.



تاریخ دریافت: ۲۵ آذر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۹ دی ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۱ تیر ۱۳۹۹

**اهداف:** MEF-2C و Myostatin در تغییرات عضلانی مرتبط با مشکلات استخوانی نقش دارند. هدف پژوهش حاضر تعیین اثر سه روش درمانی، تمرین، ازون و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن MEF-2C و سطوح Myostatin بافت عضله رانی در مدل موش‌های آرتروزی بود. **مواد و روش‌ها:** پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده است. بدین منظور ۶۳ سر موش نر (میانگین سنی ۸ تا ۱۲ هفته و میانگین وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) به طور تصادفی به نه گروه شامل دو گروه کنترل سالم و بیمار استئوآرتروز و هفت گروه مداخله موش‌های بیمار استئوآرتروز شامل، سالین، تمرین، ازون تراپی، MSCs، ازون تراپی، تمرین ازون تراپی و تمرین MSCs تقسیم شدند. استئوآرتروز با روش جراحی به موش‌ها القا شد. برنامه تمرینی شامل سی دقیقه دویدن روی ترمیل بدون شیب و سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود. ۱۰<sup>۶</sup> سلول بر کیلوگرم به موش‌ها تزریق شد. ازون در خط مفصلی تیمپوفمورال زانو و با غلظت ۲۰ μg/ml تزریق شد. سنجش سطوح بافتی Myostatin با کیت الایزا و بیان ژن MEF-2C به روش Real time PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** گروه‌های سلول + تمرین، تمرین + ازون و سلول + ازون موجب یک افزایش معنی‌دار در بیان ژن MEF-2C و یک کاهش معنی‌دار در سطوح Myostatin عضله رانی در مقایسه با گروه‌های سلول، تمرین و ازون شدند ( $P < 0.05$ ). در گروه تمرین + سلول این تغییرات مشهودتر بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد ترکیبی از تمرین و سلول با افزایش در بیان ژن MEF-2C و کاهش در سطوح Myostatin عضله رانی احتمالاً می‌تواند اثرات مفیدی بر عوامل تحریکی و مهاری تعاملات بین عضله و استخوان در مدل موش‌های آرتروزی داشته و در نتیجه خطرات تحلیل و ضعف عضلات ناشی از عوارض آرتروز را کاهش دهد.

## کلیدواژه‌ها:

تمرین، ازون، سلول‌های بنیادی، MEF-2C، Myostatin، آرتروز

## مقدمه

بیمار شود. متدهایی مانند ورزش و کاهش وزن منجر به بهبود علائم می‌شوند، اما تا به امروز عواملی که بر روند پیشرفت بیماری تأثیر بگذارد یافت نشده است [۲، ۳] و این امر در مورد داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی، تزریق داخل مفصلی هیالورونیک، مکمل‌های غذایی، جراحی‌های ترمیم لیگامان صلیبی قدامی و مینیسک هم صدق می‌کند. به همین خاطر فقدان مداخله‌ای که روند بیماری را هدف قرار دهد، منجر به افزایش چشمگیر جراحی تعویض مفصل زانو گشته است [۲، ۴].

واضح است که درمان امن، مؤثر و ارزان‌تر که بتوانند مسیر بیماری را تغییر دهد، تأثیر عمده‌ای بر کیفیت زندگی و هزینه‌های مراقبت بهداشتی در آینده خواهد داشت. با توجه به توانایی ضعیف

استئوآرتروز<sup>۱</sup> شایع‌ترین بیماری مفصلی است که عوامل متعددی در ایجاد آن نقش دارند. سن، جنس، ژنتیک، تراکم استخوان، اختلالات آندوکروینی، ضربه‌های مفصلی عمده، فشار بیش از حد به مفاصل ناشی از نوع شغل یا ورزش، اختلالات یا نقایص مادرزادی یا رشدی مفاصل و بیماری‌های التهابی قبلی مفصل را می‌توان جزء این عوامل برشمرد [۱]. محدودیت اصلی در مدیریت بیماران مبتلا به استئوآرتروز، فقدان یک روش درمانی مناسب است که منجر به کند شدن روند پیشرفت درمان

1. Osteoarthritis

\* نویسنده مسئول:

دکتر هاجر عباس‌زاده

نشانی: ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۲۱۶۳۵۱۱ (۹۱۱) +۹۸

پست الکترونیکی: h.abaszade61@gmail.com



مطالعات سلولی گزارش دادند که فاکتورهای، مانند Myostatin و MEF-2C<sup>۲</sup> در تغییرات عضلانی مرتبط با مشکلات استخوانی نقش دارند [۲۲].

نشان داده شده است که Myostatin تنظیم کننده منفی توده عضلانی است و MEF-2C یک عامل مهم است که با عوامل نظارتی میوژنیک، در تعامل است. موش های فاقد MEF-2C در استئوسیت ها کاهش میزان اسکلوستین را نشان دادند [۲۲]. بنابراین، با توجه به اینکه MSCs و ازن ترابی روش های درمانی نسبتاً جدیدی هستند که بر تعاملات بین بافت عضله و متابولیسم استخوان مؤثر به نظر می رسند و تاکنون پژوهشی درباره اثر این روش ها بر عوامل تنظیمی و مهاری مؤثر بر تعاملات بین بافت عضله و متابولیسم استخوان در بیماران استئوآرتریت به همراه ورزش هوازی منظم باشد، صورت نگرفته است، در این پژوهش، ما به بررسی اثر سه روش درمانی، تمرین، ازن و سلول های بنیادی بر سطوح Myostatin و بیان ژن MEF-2C در مدل موش های آرتروزی می پردازیم تا راهکار مفید و مناسبی برای بهبود عملکرد افراد مبتلا به استئوآرتریت به دست آوریم.

### مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده است. برای تعیین تعداد جامعه آماری از نرم افزار G\*Power version 3/1/9/2 (N=۶۳) به ازای مقادیر "براساس موضوع پژوهش": Effect size = ۰/۵۵، F=۰/۰۵، α=۰/۰۸، Power=۰/۸، Number of groups=۹ استفاده شد. جامعه آماری شامل ۶۳ سر موش صحرایی نر بالغ هشت تا دوازده هفته ای نژاد ویستار، با میانگین وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بودند. موش ها به طور تصادفی به نه گروه هفت تایی تقسیم شدند که شامل دو گروه کنترل سالم و بیمار-استئوآرتریت و هفت گروه مداخله موش های بیمار استئوآرتریت شامل، سالین (تزریق سالیین برای کنترل اثرات احتمالی تزریق ناشی مداخلات پژوهش)، تمرین، ازن ترابی، MSCs، MSCs ازن ترابی، تمرین ازن ترابی و تمرین MSCs بودند. آزمودنی ها در محیطی با دمای محیط ۲۲±۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵±۵ درصد نگهداری شدند. غذا و آب مورد نیاز به صورت آزادانه در اختیار آنان قرار گرفت.

### پروتکل تحقیق

#### نحوه القای استئوآرتریت

استئوآرتریت با روش جراحی مالفت و همکاران به موش ها القا شد [۲۳]. موش ها به وسیله کتامین و زایلازین بیهوش شدند. بعد از اصلاح زانوی راست، یک برش یک سانتی متری برای ظاهر ساختن مفصل زانو ایجاد شد. مفصل زانو بلافاصله با جابه جایی جانبی استخوان کشکک و لیگامان پتلار باز شد. یک برش طولی

کندروسیت ها در ترمیم، آسیب های غضروفی ناشی از آرتروز و تروما چالش های بزرگی را در مدیریت بالینی به وجود آورده اند. در این میان درمان های مبتنی بر سلول های بنیادی و مهندسی بافت غضروف راه های جدیدی را برای درمان غضروف آسیب دیده باز می کند [۵]. MSCs<sup>۲</sup> به عنوان یک عامل بیولوژیکی درمانی جهت درمان بیماری های التهابی و ترمیم بافت مورد توجه قرار گرفته است. تعدادی از مطالعات قبلی تزریق داخل مفصلی MSCs را در درمان بیماری استئوآرتریت مؤثر دانسته اند [۵، ۶].

سلول های بنیادی از بافت های مختلف گرفته می شوند و پتانسیل تبدیل شدن به بافت های مختلف را نیز دارند [۷]. لی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که درمان به وسیله MSCs منجر به ترمیم غضروف آسیب دیده در موش ها می شود [۵]. همچنین بوول و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مشاهده کردند که موش های آرتروزی پس از مزانشیمال ترابی، بهتر توانستند روی پای مبتلا وزن اندازی کنند [۸]. یکی دیگر از روش های درمانی پیشنهاد شده برای استئوآرتریت، ازن ترابی است. این روش با هدف درمانی برای ساختارهای مختلف بدن مخصوصاً در بیماری های مزمن مانند رماتیسم و استئوآرتریت اعمال می شود [۹، ۱۰]. مقالات متعددی در مورد استفاده از ازن درون مفصلی در درمان استئوآرتریت وجود دارد [۹، ۱۱-۱۳].

با توجه به اینکه بیماری استئوآرتریت یک بیماری پیش رونده و تخریب کننده مزمن است و باعث ایجاد بسیاری از ناتوانی ها در فرد می شود، فعالیت ورزشی منظم جزء جدایی ناپذیر در درمان استئوآرتریت زانو به حساب می آید [۱۴]. برنامه های ورزشی منظم با دُز مناسب، به پیشگیری از کاهش قدرت عضله و مقاومت در برابر فعالیت های روزانه کمک می کند؛ همچنین منجر به کنترل درد و پیشگیری از کاهش دامنه حرکتی مفصل می شود [۱۵]. با این حال تمریناتی که در آب انجام می شود به دلیل ویژگی های منحصر به فردش مانند شناوری برای بیماران استئوآرتریتی ترجیح داده می شود [۱۶]. مقالات متعددی به بررسی اثر ورزش بر استئوآرتریت زانو پرداخته اند [۱۷-۱۹].

از طرفی، مطالعات گزارش دادند که در افراد بیمار، درد زانو علاوه بر ناپایداری مفصل، با ضعف عضلات درگیر و ناتوانی این بیماران در ارتباط است [۲۰]. 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 [۲۱]. بنابراین، با توجه به اینکه یکی از اهداف درمان این بیماران کاهش درد، حفظ تحرک مفصل و به حداقل رساندن ناتوانی در این افراد است، بررسی راهکارهای تقویت، رشد، بازسازی و مکانیسم های درگیر در نوسازی عضلات آسیب دیده یا آتروفی شده در استئوآرتریت زانو می تواند به درک بهتر موضوع کمک کند.

3. Myocyte enhancer factor -2C

2. Mesenchymal Stem Cells

تولید شد و غلظت آن با استفاده از اشعه ماورای بنفش در ۲۵۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. ازن در خط مفصلی تیپوفمورال زانو و با غلظت  $20 \mu\text{g/ml}$  یک بار در هفته به مدت سه هفته ۲۱ روز بعد از آرتروزی کردن موش‌ها تزریق شد.

#### نحوه نمونه‌برداری و اندازه‌گیری متغیرهای تحقیق

پس از اجرای تحقیق تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال دوازده تا چهارده ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات (جهت حذف اثرات حاد تمرین و دیگر مداخلات)، با تزریق داخلی صفاقی کتامین و زایلازین بیهوش و فدا شدند.

پس از شکستن حفره شکمی، بافت عضله رانی به‌دقت جدا و پس از شست‌وشو با آب مقطر فریز شد. تمامی بافت فریز شده عضله رانی پس از پودر شدن (ساییده شدن) در نیتروژن مایع، در بافر پروتئاز هموژنیزه شد و سپس به مدت بیست دقیقه با سرعت دوازده هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد منجمد شد تا برای آنالیز شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. سنجش سطوح بافتی Myostatin عضله ران با کیت الایزای ساخت شرکت LS-bio و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مطالعات بیان ژن MEF-2C در بافت عضله رانی به روش Real time PCR<sup>۶</sup> سنجش و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  تجزیه و تحلیل شد. در ابتدا، نمونه‌های عضلانی در بافر فسفات (pH ۷/۰) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با هموژنیزه‌کننده همگن شدند. کل RNAها از بافت عضله رانی در تمام موش‌ها طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) استخراج شد. برای تخمین کمیت و کیفیت RNAهای استخراج‌شده از روش اسپکتروفتومتری با خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن MEF-2C، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده

از طریق برش مدیال پاراپتالار ایجاد شد. جابه‌جایی 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 لیگامان‌ها ایجاد شد. در نهایت کپسول مفصلی با شش بخیه قابل جذب و پوست نیز با شش بخیه ابریشمی بسته شد.

#### برنامه تمرینی

یک ماه بعد از عمل جراحی، یک هفته صرف آشنایی و سازگاری با محیط پژوهش و نوار گردان شد. بدین منظور موش‌ها سه روز در هفته به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۶ متر در دقیقه حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد  $Vo^2\text{max}$  و با شیب صفر درصد، روی تردمیل فعالیت داشتند. برنامه تمرین اصلی شامل سی دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در هفته اول با رعایت اصل اضافه‌بار به صورت پیش‌رونده به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید. همچنین پنج دقیقه با سرعت ۸، قبل و بعد از تمرین برای گرم و سرد کردن حیوانات اختصاص یافت. گروه کنترل در طول اجرای تمرین فقط روی تردمیل ایستاده بود و دستگاه روشن نمی‌شد.

#### نحوه تهیه و تزریق سلول‌های بنیادی

MSCs از مغز استخوان موش‌های نر نژاد ویستار سالم پس از بیهوشی با کتامین و زایلازین استخراج شد. MSCs جدا شده در محیطی DMEM<sup>۴</sup> با ۲۰ درصد FBS<sup>۵</sup> در طول یک شبانه‌روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت‌ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شدند تا سلول‌هایی که نجسیدند جدا شوند و MSCsها بعد از سه تا چهار بار پاساژ شدن به  $>90\%$  درصد خلوص رسیدند و به هدف تزریق انتخاب شدند. موش‌هایی که در گروه MSCs بودند، ۱۰<sup>۶</sup> سلول بر کیلوگرم از طریق تزریق داخل مفصلی MSCs دریافت کردند. MSCs در مفصل زانوی راست موش‌ها تزریق شد.

#### آزن‌تراپی

ازن از اکسیژن پزشکی درجه ۲ توسط دستگاه OZOMED 01 ساخته شد. ازن توسط یک تخلیه الکتریکی با شدت کم

4. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

5. Fetal Bovine Serum

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت همسان‌سازی ژن MEF-2C

Annealing Temperature	Reverse primer 5'-3'	Forward primer 5'-3'	ژن
60°C	CTCCCATCGTAGGAAGTGC	ATCTCTCCCTGCCTTCTACTC	MEF-2C

بیان ژن MEF-2C عضله رانی در موش‌های مبتلا به استئوآرتریت در مقایسه با گروه‌های تمرین + MSCs، تمرین + ازن + ازن + در MSCs تفاوت معنی‌داری وجود دارد (تصویر شماره ۱،  $P < 0.05$ ). گروه‌های MSCs + تمرین، تمرین + ازن و MSCs + ازن افزایش معنی‌داری در بیان ژن MEF-2C عضله رانی در مقایسه با گروه‌های MSCs، تمرین و ازن داشتند ( $P < 0.05$ ). افزایش بیان ژن MEF-2C عضله رانی در موش‌های تحت درمان با ترکیبی از تمرین + MSCs به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (تصویر شماره ۱،  $P < 0.05$ ). همچنین، نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح Myostatin عضله رانی تفاوت وجود دارد (جدول شماره ۲،  $F = 29.66$ ،  $P < 0.0001$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نیز نشان داد که بین میانگین سطوح Myostatin عضله رانی در موش‌های مبتلا به استئوآرتریت در مقایسه با سایر گروه‌های پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد (تصویر شماره ۲،  $P < 0.05$ ). گروه‌های MSCs + تمرین، تمرین + ازن و MSCs + ازن کاهش معنی‌داری در سطوح Myostatin عضله رانی در مقایسه با گروه‌های MSCs، تمرین و ازن داشتند ( $P < 0.05$ ). به طور معنی‌داری، کاهش سطوح Myostatin عضله رانی در موش‌های تحت درمان

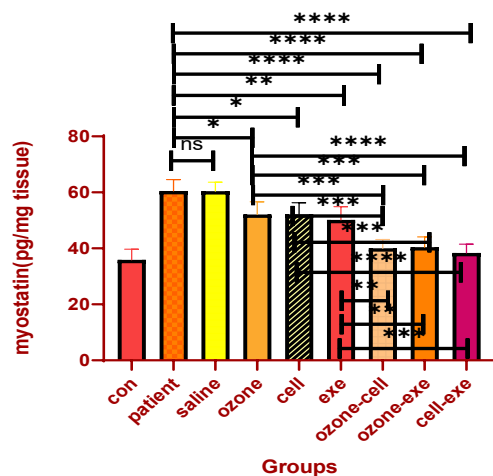
از روش کمی q-RT PCR انجام گرفت. بیان ژن‌های موردنظر با روش PCR Real-Time و با دستگاه ۲۹ Real Q-PCR Master Mix Kit (Amplicon، دانمارک) در چهل سیکل انجام شد. در جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است. توصیف کمی داده‌ها با استفاده از میانگین و انحراف استاندارد بیان شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی‌دار هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نسخه ۸ نرم‌افزار GraphPad Prism و در سطح معناداری  $P < 0.05$  انجام شد.

### یافته‌ها

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد در بین گروه‌های مختلف پژوهش در مقادیر بیان ژن MEF-2C عضله رانی تفاوت وجود دارد (جدول شماره ۲،  $P < 0.0001$ ،  $F = 56.11$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نیز نشان داد که بین میانگین

جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه برای میزان بیان ژن MEF-2C و سطوح Myostatin عضله رانی

آماره	گروه‌ها	میانگین $\pm$ انحراف معیار	F	df	P
بیان ژن MEF-2C	کنترل سالم	۰/۰۸۱۴۸ $\pm$ ۰/۰۱۰۴	۵۶/۱۱	(۸/۳۶)	> ۰/۰۰۰۱
	بیمار- استئوآرتریت	۰/۰۰۲۷۷۴ $\pm$ ۰/۰۰۰۹۰۸۱			
	سالمین	۰/۰۰۲۳۶۸ $\pm$ ۰/۰۰۰۷۹۶۹			
	آزن تراپی	۰/۰۰۶۱۷۶ $\pm$ ۰/۰۰۰۵۱۵۴			
	MSCs	۰/۰۰۷۹۷۶ $\pm$ ۰/۰۰۱۰۳۷			
	تمرین	۰/۰۰۸۴۳۳ $\pm$ ۰/۰۰۰۹۳۷			
	MSCs آزن تراپی	۰/۰۲۴۹۲ $\pm$ ۰/۰۱۲۱۷			
	تمرین آزن تراپی	۰/۰۲۲۸۴ $\pm$ ۰/۰۱۴۲۴			
سطوح Myostatin (pg/mg tissue)	تمرین MSCs	۰/۰۵۳۷۱ $\pm$ ۰/۰۱۱۷۹	۲۹/۶۶	(۸/۳۶)	> ۰/۰۰۰۱
	کنترل سالم	۳۵/۳ $\pm$ ۹۰/۷۷۳			
	بیمار استئوآرتریت	۶۰/۴ $\pm$ ۴۸/۰۷۷			
	سالمین	۶۰/۳ $\pm$ ۴۲/۲۳۰			
	آزن تراپی	۵۲/۴ $\pm$ ۱۲/۵۳۹			
	MSCs	۵۲/۴ $\pm$ ۱۷/۱۱۱			
	تمرین	۵۰/۴ $\pm$ ۱۳/۷۵۹			
	MSCs آزن تراپی	۴۰/۳ $\pm$ ۰۵/۰۸۷			
	تمرین آزن تراپی	۴۰/۳ $\pm$ ۴۶/۶۴۴			
	تمرین MSCs	۳۸/۳ $\pm$ ۳۵/۱۷۴			



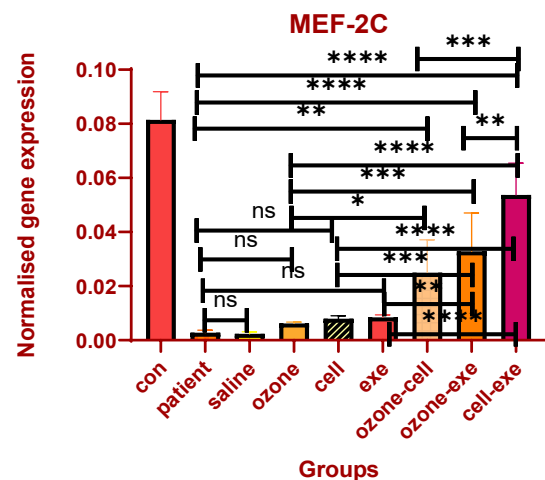
## افتخار دانش

تصویر ۲. مقایسه سطوح میانگین Myostatin در عضله رانی که به روش الایزا مشخص شد. گروه کنترل سالم (noc)، گروه بیمار استئوآرتریت (patient)، گروه سالیین (salin)، گروه ازن‌تراپی (ozone)، گروه (cell MSCs)، گروه تمرین (exe)، گروه ازن‌تراپی + sCSM (ozone-cell)، گروه ازن‌تراپی + تمرین (ozone-exe)، گروه تمرین + sCSM (cell-exe). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین Myostatin در گروه‌های با علامت \* وجود داشت

(\*\*\*\*P<0.0001; \*\*\*P=0.0001; \*\*P>0.0001; \*P<0.05; ns: not significant).

Myostatin است. Myostatin عضوی از خانواده  $TGF-\beta$  به عنوان فاکتورهای رشدی است که به طور خاص در عضله اسکلتی بیان می‌شود. تأثیرات سلولی Myostatin به روش اتوکراین / پاراکراین، تنظیم‌کننده اصلی رشد عضلات اسکلتی است، به طوری که فعال‌سازی آن به غیرفعال شدن مسیر هایپرتروفی و افزایش بیان آن به آتروفی عضلانی منجر می‌شود. Myostatin تکثیر و تمایز مایوبلاست‌ها و همچنین مسیر Akt/mTOR را مهار می‌کند که تنظیم‌کننده سنتز پروتئین عضلانی است. درواقع، Myostatin تنظیم‌کننده منفی رشد عضلانی است که با کاهش تنظیم مسیر پیام‌رسانی Akt mTOR و کاهش فسفوریلاسیون Akt، rpS63، P70S6K2 و پروتئین اتصال 4E در توقف هایپرتروفی عضلانی عمل می‌کند [۲۴].

همچنین بیان شده که Myostatin با تنظیم بیان ژن MEF2، ترکیب نوع تار عضله اسکلتی را تنظیم می‌کند [۲۵]. از طرفی، عدم استفاده از مفصل آرتروزی، منجر به ضعف عضلانی شده و از آنجا که عضلات نقش قابل توجهی در حفاظت از غضروف به عهده دارند، تقویت عضلات اطراف مفصل بسیار مهم است. تحقیقات نشان داده است که اگر به دلیل درد، عضلات و اندام‌ها حرکت چندانی نداشته باشند، دچار ضعف شده و روزانه حدود ۵ درصد از حجم عضله کاهش می‌یابد. قدرت عضله با نیروی تولیدشده در آن تقویت می‌شود که یکی از ساده‌ترین کارها برای کمک به آن انجام ورزش‌هایی است که عضله به طور مکرر منقبض و منبسط شود [۲۶، ۲۷].



## افتخار دانش

تصویر ۱. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن MEF-2C در عضله رانی که به وسیله Real time PCR مشخص شد. گروه کنترل سالم (con)، گروه بیمار استئوآرتریت (patient)، گروه سالیین (salin)، گروه ازن‌تراپی (ozone)، گروه (MSCs cell)، گروه تمرین (exe)، گروه ازن‌تراپی + MSCs (ozone-cell)، گروه ازن‌تراپی + تمرین (ozone-exe)، گروه تمرین + MSCs (cell-exe). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن MEF-2C در گروه‌های با علامت \* وجود داشت.

(\*\*\*\*P<0.0001; \*\*\*P=0.0001; \*\*P>0.0001; \*P<0.05; ns: not significant)

با ترکیبی از تمرین + MSCs بیشتر از سایر گروه‌ها بود (تصویر شماره ۲،  $P<0.05$ ).

## بحث

در این پژوهش، ما اثرات مثبت سه روش درمانی، تمرین، ازن و سلول‌های بنیادی و ترکیب آن‌ها بر سطوح Myostatin و بیان ژن MEF-2C در عضله رانی مدل موش‌های آرتروزی را مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج ما نشان داد بیان ژن MEF-2C در عضله رانی مدل موش‌های آرتروزی کاهش می‌یابد و در مقابل سطوح Myostatin عضله افزایش می‌یابد. MEF-2C یک فاکتور مهم است که با فاکتورهای تنظیم‌کننده میوژنیک مثل MyoD و Myf5 اثر متقابل دارد. این برهمکنش، به طور هم‌افزایی، ژن‌های مخصوص عضله و افتراق بیوژنیک را فعال می‌کند.

کاهش MEF-2C در موش‌ها با کاهش سطوح اسکروستین در استئوسیت‌ها نشان داده شده است. اسکروستین یک فاکتور خونی است که با استئوسیت‌ها تولید می‌شود و به عنوان یک مهارکننده مسیر سیگنالینگ Wnt عمل کرده و سبب افزایش تشکیل استخوان می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد سیگنالینگ MEF-2C-Sclerostin، فعل و انفعال بین ماهیچه و استخوان را از طریق اسکروستین تنظیم می‌کند [۲۲]. در مقابل، یکی از سازوکارهای تنظیم‌کننده حجم و قدرت عضلانی پیام‌رسانی



از ترکیب این مداخلات استفاده شد، نتایج قابل توجهی دیده شد. به طوری که گروه‌های MSCs + تمرین، تمرین + ازون و MSCs + ازون کاهش معنی‌دار در سطوح Myostatin و افزایش معنی‌دار در بیان ژن MEF-2C عضله رانی در مقایسه با سایر گروه‌ها داشتند و این تغییرات در موش‌های تحت درمان با ترکیبی از تمرین + MSCs به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همسو با یافته‌های ما، گیبس و همکاران به بررسی اثر ترکیبی درمان برنامه توان بخشی ورزشی و تزریق درون مفصلی پیوند مغز استخوان استروم و پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) در بیماران مبتلا به استئوآرتریت زانو پرداختند. یافته‌ها نشانگر بهبود نتایج حاصل از ترکیب تزریق درون مفصلی پیوند مغز استخوان استروم و پلاسمای غنی از پلاکت همراه با تمرینات ورزشی در افراد استئوآرتریت بود [۳۳].

لی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که درمان با MSCs منجر به ترمیم غضروف آسیب‌دیده در موش‌ها می‌شود [۵]. همچنین بوول و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به بررسی میزان توزیع درد در موش‌های آرتروزی بعد از تزریق MSCs به زانوی مبتلا پرداختند و مشاهده کردند که موش‌ها پس از مزانسیمال تراپی بهتر توانستند روی پای مبتلا وزن‌اندازی کنند [۸]. همچنین مطالعات اثر سلول‌های بنیادی در درمان آتروفی را با مهار Myostatin نشان دادند [۳۴].

استفاده از سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های مزانشیمی نه تنها ساختار مفصل آسیب‌دیده، بلکه جنبه‌های ضدالتهابی و تعدیل سیستم ایمنی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. سلول‌های بنیادی دو ویژگی مهم دارند که آن‌ها را از انواع دیگر سلول‌ها جدا می‌کنند. این سلول‌ها، سلول‌هایی غیر تخصصی هستند؛ یعنی عمل خاصی را مانند سلول‌های عضله قلب انجام نمی‌دهند و قدرت بازسازی و احیای خودشان را از طریق تقسیم سلولی دارا هستند و دیگر اینکه این سلول‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی به سلول‌هایی با کارکرد تخصصی تبدیل می‌شوند. یانگ و همکاران نشان دادند که مکانیسم تأثیر MSC در درمان بالینی آسیب دیدگی زانو، یک مکانیسم ضدالتهابی است که سبب بهبود تمایز سلولی می‌شود [۳۵].

از طرف دیگر، ازن درمانی نیز باعث تولید ماده و گاز ازن در بافت‌ها و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده و بافت‌های ضعیف در اطراف مفاصل می‌شود. ازن درمانی باعث توقف درد و التهاب، رساندن جریان خون بهتر، افزایش مواد مغذی برای بافت‌ها و رساندن اکسیژن به بافت‌های آسیب‌دیده می‌شود. این روش باعث بهبود حرکت و کاهش درد مفصل هم می‌شود. کاملیا و همکاران اثرات مفید ازن را افزایش عرضه اکسیژن در بافت‌های تحت تأثیر التهاب و درد، افزایش جریان خون و از بین بردن زواید متابولیک در مفاصل آسیب‌دیده، از بین بردن انسداد موادی که التهاب و درد را حفظ می‌کنند، تقویت سیستم ایمنی بدن، تحریک

نتایج تحقیق حاضر نشان داد انجام تمرین ورزشی با شدت متوسط روی نوارگردان موجب افزایش بیان ژن MEF-2C و کاهش سطوح Myostatin عضله رانی می‌شود.

کاروالو و همکاران بیان کردند که عدم فعالیت یا ورزش‌های بسیار شدید منجر به تشدید استئوآرتریت می‌شود. در مقابل برنامه‌های ورزشی منظم با دُز مناسب؛ به پیشگیری از کاهش قدرت عضله و مقاومت در برابر فعالیت‌های روزانه کمک می‌کند [۱۵]. دیگر محققان فراتنظیمی mRNA و پروتئین Myostatin را پس از پروتکل هایپر تروفی ناشی از شش و دوازده هفته تمرین گزارش کرده‌اند. هم‌زمان با فراتنظیمی Myostatin، افزایش در ژن تنظیم‌کننده فولیستاتین سرم (FLRG) و کاهش گیرنده ac-tivin IIb را نشان دادند. علاوه بر این، مهار Myostatin درون‌زا در موش‌ها به طور قابل توجهی میزان آسیب‌های عضلانی را کاهش داده و موجب افزایش قدرت و توده عضلانی می‌شود [۲۸].

مارلن فرانس و همکارانش در یک مقاله مروری به بررسی اثر تمرین درمانی بر استئوآرتریت زانو پرداختند و با ۴۴ آزمایش نشان دادند که ورزش به میزان قابل توجهی کاهش درد، بهبود عملکرد فیزیکی را بلافاصله پس از درمان به میزان متوسط نشان می‌دهد و با بررسی سیزده مطالعه نشان دادند ورزش به میزان قابل توجهی کیفیت زندگی را بلافاصله پس از درمان با اثر کوچک بهبود بخشید. علاوه بر این، دوازده مطالعه اطلاعات پایداری را دو ماه تا شش ماه پس از درمان با ورزش در مورد کاهش قابل توجه درد زانو نشان دادند [۲۹]. محققان دیگر هم افزایش MEF2 را با انجام تمرین نشان دادند [۳۰].

حذف MEF-2C در موش‌ها می‌تواند نسبت الیاف نوع I را کاهش دهد و نیز MEF-2C می‌تواند به چندین سیگنال تنظیم‌شده با کلسیم پاسخ دهد و نوع فیبر عضلاتی اسکلتی را تنظیم کند. MEF-2C همچنین به عنوان یک ژن هدف پایین دست از Foxj3 استفاده می‌کند، که می‌تواند نسبت الیاف نوع I را از طریق فعال سازی رونویسی توسط Foxj3 کاهش دهد [۳۱]. در مقابل، در مطالعه آندرسون، نشان داده شد MEF-2C برای رشد کلی بدن در عضلات اسکلتی مورد نیاز است، اما در بین موش‌های کنترل و موش‌های فاقد MEF-2C برای ارزیابی توانایی آن‌ها در دویدن روی چرخ دوار تمرینی که برای یک هفته مورد آزمایش قرار گرفتند اختلاف معنی‌داری ثبت نشد [۳۲]. همان‌طور که قبلاً بیان شد علاوه بر تمرین درمانی از روش‌های دیگری مانند سلول درمانی و ازن تراپی نیز برای بهبود افراد مبتلا به استئوآرتریت استفاده می‌شود.

در پژوهش حاضر به بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و نیز اثر ازن تراپی روی موش‌های مدل آرتروزی پرداخته شد. نتایج پژوهش ما نشان داد هر دو روش درمانی سلول و ازن تراپی موجب افزایش بیان ژن MEF-2C و کاهش سطوح Myostatin در عضله رانی شد. با این حال، زمانی که



مکانیسم‌های بهبود سلامت در بدن و در نتیجه، تحرک مفصلی بهتر و عملکرد بهتر سیستم بدن می‌دانند [۳۶].

به طور کلی مکانیسم‌های احتمالی ازن‌تراپی شامل ضد درد، ضد التهاب، تأثیرات آنتی‌اکسیدانتی (به وسیله فعال کردن متابولیسم‌های سلولی، کاهش سنتز پروستاگلندین)، بهبود کیفیت اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها (از طریق عمل بی‌هوازی، وازودیلاسیون و تحریک آنژیوژنز) است [۹، ۱۰]. تحقیقات دیگر نیز نشان دادند که ازن‌تراپی می‌تواند درد بیماران مبتلا به استئوآرتریت متوسط را به میزان قابل توجهی کاهش دهد و موجب بهبود وضعیت عملکردی آن‌ها شود. مکانیسمی که ازن می‌تواند آستانه درد را بالا ببرد، احتمالاً تحریک دستگاه ضد درد است که به واسطه سروتونین درون‌زا و مواد افیونی انجام می‌شود [۳۷].

یافته‌های ما نشان دادند که درمان ترکیبی با تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و انجام تمرین با شدت متوسط و نیز ترکیب ازن‌تراپی و انجام تمرین هر دو، می‌تواند برای بهبود بیان ژن MEF-2C و سطوح Myostatin عضله و نیز تعامل مؤثر عضله با استخوان در موش‌های مبتلا به استئوآرتریت نسبت به روش‌های درمانی دیگر مانند سلول، ازن و تمرین تنها، مناسب‌تر باشد. درمان ترکیبی تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و انجام تمرین با شدت متوسط بیش از ترکیب ازن‌تراپی و انجام تمرین تأثیرگذار بوده است. گرچه سلول‌های بنیادی دارای خواص ترمیم‌کنندگی، ضدالتهابی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی هستند، ترکیب آن با تمرین درمانی می‌تواند برای کاهش اختلالات ناشی از آرتروز مؤثرتر باشد.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج ما نشان داد که ترکیبی از تمرین و سلول با بیشترین افزایش در بیان ژن MEF-2C و بیشترین کاهش در سطوح Myostatin عضله رانی احتمالاً می‌تواند اثرات مفیدی بر عوامل تحریکی و مهارتی تعاملات بین عضله و استخوان در مدل موش‌های آرتروزی داشته باشد و در نتیجه خطرات تحلیل و ضعف عضلات ناشی از عوارض آرتروز را کاهش دهد.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

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

### حامی مالی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری زهرا حدادپور با کد رهگیری ۷۰۳۶۳ در سامانه پژوهشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد

ساری است و با هزینه شخصی انجام شده است.

### مشارکت نویسندگان

تدوین دست‌نوشته و بازبینی نهایی: همه نویسندگان؛ ایده اصلی و اجرای پروتکل: زهرا حدادپور؛ روش‌شناسی و تفسیر نتایج: هاجر عباس‌زاده.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از مسئولان آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به دلیل همکاری‌های لازم سپاسگزاری می‌کنند.

## References

- [1] Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011; 23(5):492. [DOI:10.1097/BOR.0b013e3283494005] [PMID] [PMCID]
- [2] Loeser RF. The role of aging in the development of osteoarthritis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2017; 128:44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28790486/>
- [3] Hunter DJ, Beavers DP, Eckstein F, Guermazi A, Loeser RF, Nicklas BJ, et al. The Intensive Diet and Exercise for Arthritis (IDEA) trial: 18-month radiographic and MRI outcomes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015; 23(7):1090-8. [DOI:10.1016/j.joca.2015.03.034] [PMID]
- [4] Cram P, Lu X, Kates SL, Singh JA, Li Y, Wolf BR. Total knee arthroplasty volume, utilization, and outcomes among Medicare beneficiaries, 1991-2010. *Journal of the American Medical Association*. 2012; 308(12):1227-36. [DOI:10.1001/2012.jama.11153] [PMID] [PMCID]
- [5] Li M, Luo X, Lv X, Liu V, Zhao G, Zhang X, Cao W, Wang R, Wang W. In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016; 7(1):160. [DOI:10.1186/s13287-016-0420-2] [PMID] [PMCID]
- [6] Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy*. 2013; 15(1):1-6. [DOI:10.1186/ar4156] [PMID] [PMCID]
- [7] Liu W, Sun Y, He Y, Zhang H, Zheng Y, Yao Y, et al. IL-1 $\beta$  impedes the chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells in the human temporomandibular joint. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017; 39(2):317-26. [DOI:10.3892/ijmm.2016.2832] [PMID] [PMCID]
- [8] van Buul GM, Siebelt M, Leijts MJ, Bos P, Waarsing JH, Kops N, et al. Mesenchymal stem cell therapy in a rat model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012; 20:S275. [DOI:10.1016/j.joca.2012.02.468]
- [9] Lopes de Jesus CC, dos Santos FC, de Jesus LM, Monteiro I, Sant'Ana MS, Trevisani VF. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *PloS One*. 2017; 12(7):e0179185. [DOI:10.1371/journal.pone.0179185] [PMID] [PMCID]
- [10] Calunga JL, Menéndez S, León R, Chang S, Guanche D, Balbín A, et al. Application of ozone therapy in patients with knee osteoarthritis. *Ozone: Science & Engineering*. 2012; 34(6):469-75. [DOI:10.1080/01919512.2012.719120]
- [11] Invernizzi M, Stagno D, Carda S, Grana E, Picelli A, Smania N, et al. Safety of intra-articular oxygen-ozone therapy compared to intra-articular sodium hyaluronate in knee osteoarthritis: A randomized single blind pilot study. *International Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2017; 5(385):2. [DOI:10.4172/2329-9096.1000385]
- [12] Hashemi M, Khameneh SM, Dadkhah P, Mohajerani SA. Effect of intraarticular injection of ozone on inflammatory cytokines in knee osteoarthritis. *Journal of Cellular & Molecular Anesthesia*. 2017; 2(2):37-42. [DOI:10.22037/jcma.v2i2.16016]
- [13] Feng X, Beiping L. Therapeutic efficacy of ozone injection into the knee for the osteoarthritis patient along with oral celecoxib and glucosamine. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017; 11(9):UC01. [DOI:10.7860/JCDR/2017/26065.10533] [PMID] [PMCID]
- [14] Focht BC, Garver MJ, Lucas AR, Devor ST, Emery CF, Hackshaw KV, et al. A group-mediated physical activity intervention in older knee osteoarthritis patients: Effects on social cognitive outcomes. *Journal of Behavioral Medicine*. 2017; 40(3):530-7. [DOI:10.1007/s10865-017-9822-6] [PMID] [PMCID]
- [15] Carvalho NA, Bittar ST, Pinto FR, Ferreira M, Sitta RR. Manual for guided home exercises for osteoarthritis of the knee. *Clinics*. 2010; 65(8):775-80. [DOI:10.1590/S1807-59322010000800006] [PMID] [PMCID]
- [16] Kunduracilar Z, Sahin HG, Sonmezer E, Sozay S. The effects of two different water exercise trainings on pain, functional status and balance in patients with knee osteoarthritis. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2018; 31:374-8. [DOI:10.1016/j.ctcp.2018.01.004] [PMID]
- [17] McAlindon TE, Bannuru R, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014; 22(3):363-88. [DOI:10.1016/j.joca.2014.01.003] [PMID]
- [18] Lun V, Marsh A, Bray R, Lindsay D, Wiley P. Efficacy of hip strengthening exercises compared with leg strengthening exercises on knee pain, function, and quality of life in patients with knee osteoarthritis. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2015; 25(6):509-17. [DOI:10.1097/JSM.0000000000000170] [PMID]
- [19] Alkatan M, Baker JR, Machin DR, Park W, Akkari AS, Pasha EP, et al. Improved function and reduced pain after swimming and cycling training in patients with osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2016; 43(3):666-72. [DOI:10.3899/jrheum.151110] [PMID]
- [20] Segal NA, Glass NA. Is quadriceps muscle weakness a risk factor for incident or progressive knee osteoarthritis? *The Physician and Sports Medicine*. 2011; 39(4):44-50. [DOI:10.3810/psm.2011.11.1938] [PMID]
- [21] Heidari B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2011; 2(2):205. [PMCID] [PMID]
- [22] Kawao N, Kaji H. Interactions between muscle tissues and bone metabolism. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015; 116(5):687-95. [DOI:10.1002/jcb.25040] [PMID]
- [23] Malfait AM, Little CB. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2015; 17(1):225. [DOI:10.1186/s13075-015-0747-6] [PMID] [PMCID]
- [24] Tolouei Azar j, Shabkhiz F, Khalafi M. Changes in serum myostatin and follistatin to 8 weeks of resistance training in elderly men with type 2 diabetes. *Journal of Physiology and Management Research in Sport*. 2019; 2(11):41-53. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=724370>
- [25] Hennebry A, Berry C, Siriott V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, et al. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009; 296(3):C525-34. [DOI:10.1152/ajpcell.00259.2007] [PMID]
- [26] Øiestad BE, Juhl CB, Eitzen I, Thorlund JB. Knee extensor muscle weakness is a risk factor for development of knee osteoarthritis. A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015; 23(2):171-7. [DOI:10.1016/j.joca.2014.10.008] [PMID]
- [27] Loureiro A, Mills PM, Barrett RS. Muscle weakness in hip osteoarthritis: A systematic review. *Arthritis Care & Research*. 2013; 65(3):340-52. [DOI:10.1002/acr.21806] [PMID]

- [28] Elkasrawy M, Fulzele S, Bowser M, Wenger K, Hamrick M. Myostatin (GDF-8) inhibits chondrogenesis and chondrocyte proliferation in vitro by suppressing Sox-9 expression. *Growth Factors*. 2011; 29(6):253-62. [DOI:10.3109/08977194.2011.599324] [PMID] [PMCID]
- [29] Fransen M, Nairn L, Bridgett L, Crosbie J, March L, Parker D, et al. Post-acute Rehabilitation after total knee replacement: A multicenter randomized clinical trial comparing long-term outcomes. *Arthritis Care & Research*. 2017; 69(2):192-200. [DOI:10.1002/acr.23117] [PMID]
- [30] McGee SL, Sparling D, Olson AL, Hargreaves M. Exercise increases MEF2-and GEF DNA-binding activity in human skeletal muscle. *The FASEB Journal*. 2006; 20(2):348-9. [DOI:10.1096/fj.05-4671fe] [PMID]
- [31] An JH, Yang JY, Ahn BY, Cho SW, Jung JY, Cho HY, et al. Enhanced mitochondrial biogenesis contributes to Wnt induced osteoblastic differentiation of C3H10T1/2 cells. *Bone*. 2010; 47(1):140-50. [DOI:10.1016/j.bone.2010.04.593] [PMID]
- [32] Anderson CM, Hu J, Barnes RM, Heidt AB, Cornelissen I, Black BL. Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice. *Skeletal Muscle*. 2015; 5(1):7. [DOI:10.1186/s13395-015-0031-0] [PMID] [PMCID]
- [33] Gibbs N, Diamond R, Sekyere EO, Thomas WD. Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: A case series. *Journal of pain research*. 2015; 8:799. [DOI:10.2147/JPR.S92090] [PMID] [PMCID]
- [34] Gehmert S, Wenzel C, Loibl M, Brockhoff G, Huber M, Kruttsch W, et al. Adipose tissue-derived stem cell secreted IGF-1 protects myoblasts from the negative effect of myostatin. *BioMed Research International*. 2014; 2014. [DOI:10.1155/2014/129048] [PMID] [PMCID]
- [35] Yang X, Zhu TY, Wen LC, Cao YP, Liu C, Cui YP, et al. Intraarticular injection of allogenic mesenchymal stem cells has a protective role for the osteoarthritis. *Chinese Medical Journal*. 2015; 128(18):2516. [DOI:10.4103/0366-6999.164981] [PMID] [PMCID]
- [36] Camelia C, Madalina I, Tatiana M, Marilena P, Oana A. The role of ozone therapy in maintaining the articular function and in relieving the pain for patients with knee osteoarthritis. *ARS Medica Tomitana*. 2014; 20(1):25-9. [DOI:10.2478/arsm-2014-0005]
- [37] Hashemi M, Nabi BN, Saberi A, Sedighinejad A, Haghighi M, Farzi F, et al. The comparison between two methods for the relief of knee osteoarthritis pain: Radiofrequency and intra-periarticular ozone injection: A clinical trial study. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*. 2016; 5(7s):539-46. <https://www.ijmrhs.com/abstract/the-comparison-between-two-methods-for-the-relief-of-knee-osteoarthritis-pain-radiofrequency-and-intraperiarticular-ozon-8384.html>