



# The Synergistic Effect of Stem Cell-Derived Exosomes and Glucosamine on the Expression of Sox9, Acan, Col2a1, and Col10a1 Genes in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of NMRI Mice in a Chondrogenic Medium

Lotfi M <sup>a</sup>, Baharara J<sup>b\*</sup>, Nejad Shahrokhadi Kh<sup>c</sup>, Khorshid P<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran, Email: maryam.lotfi0043@iau.ac.ir

<sup>b</sup>ph.D, Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran, Email: baharara@iau.ac.ir

<sup>c</sup>ph.D, Department of Biology, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran, Email: Shahrokhaby@yahoo.com

<sup>d</sup>ph.D, Department of Physics, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. Email: [Pejman.khorshid@iau.ac.ir](mailto:Pejman.khorshid@iau.ac.ir)

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Lotfi M, Baharara J, Nejad Shahrokhadi Kh, Khorshid P. The Synergistic Effect of Stem Cell-Derived Exosomes and Glucosamine on the Expression of Sox9, Acan, Col2a1, and Col10a1 Genes in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of NMRI Mice in a Chondrogenic Medium. *Journal of Cell and Tissue*. 2025; 16(4): 352-368.

 <https://doi.org/10.66224/JCT.16.4.352>

## KEYWORDS

Exosomes,  
Glucosamine,  
Mesenchymal Stem  
Cells, Chondrogenic  
Differentiation

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Cartilage, a tissue without blood vessels and nerves, possesses inherently limited regenerative capacity following injury, often leading to progressive joint degeneration and conditions like osteoarthritis (OA) if left untreated. Current clinical interventions, such as surgical microfracture or autologous chondrocyte implantation (ACI), face significant challenges, including donor site morbidity, immune rejection, and the formation of fibrocartilage with inferior biomechanical properties. These limitations underscore the urgent need for novel therapeutic strategies that can effectively stimulate hyaline cartilage regeneration. In this context, mesenchymal stem cell-derived exosomes (MSC-Exos) have garnered attention as a cell-free regenerative tool, leveraging their cargo of bioactive molecules (e.g., miRNAs, cytokines, and growth factors) to modulate chondrogenesis, suppress inflammation, and enhance extracellular matrix (ECM) synthesis. Concurrently, glucosamine, a natural amino sugar and precursor for

\* Corresponding author. Tel: 05138437092

E-mail address: baharara@iau.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.66224/JCT.16.4.337>

Received: 7 May, 2025; Received in revised form: 29 Nov. 2025; Accepted: 18 Dec. 2025

Original Article

© Author



glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis, has demonstrated dual functionality in joint health: not only does it serve as a building block for proteoglycans critical to cartilage integrity, but it also exhibits chondroprotective effects by mitigating ECM degradation and promoting stem cell chondrogenic differentiation. The potential synergy between MSC-Exos and glucosamine could thus address multiple facets of cartilage repair, combining anabolic stimulation (via exosomal signaling) with metabolic support (via glucosamine supplementation), offering a promising combinatorial approach to halt OA progression and restore functional cartilage.

**Aims:** This study aimed to investigate the combined effect of mouse bone marrow stem cell-derived exosomes and glucosamine on the expression of cartilage-specific genes, including Sox9, Acan, Col2a1, and Col10a1.

**Materials and Methods:** Bone marrow mesenchymal stem cells were prepared from NMRI mice. The mice were euthanized by cervical dislocation, the femoral heads were removed, and the bone marrow contents were transferred into a cell culture flask using a syringe containing culture medium. The bone marrow cells were cultured and were ready for use after 3 to 5 passages. The cell supernatant was separated, and exosomes were extracted from it by successive rounds of centrifugation followed by ultracentrifugation. Mesenchymal stem cell viability and determining the appropriate concentration of exosomes and glucosamine were performed using the MTT assay. The experiments were performed on mesenchymal stem cells in 4 groups: control, exosome, glucosamine, and exosome + glucosamine. The effects of exosomes and glucosamine on the expression of Sox9, Acan, Col2a1, and Col10a1 genes in mesenchymal stem cells were investigated in the presence of chondrogenic medium.

**Results:** According to the MTT assay results demonstrating the synergistic effect of exosomes and glucosamine, the combined concentrations of 15 µg/mL exosomes and 25 µg/mL glucosamine were chosen for subsequent applications. Real-time PCR results showed that the expression of Sox9, Acan, and Col2a1 genes in stem cells treated with exosomes and glucosamine significantly increased compared to the other groups after 14 days, while the expression of the Col10a1 gene significantly decreased compared to the other groups.

**Discussion:** The combined treatment of bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) exosomes and glucosamine significantly upregulated the expression of key chondrogenic markers, including Sox9, Acan, and Col2a1, while downregulating the hypertrophic marker Col10a1. This gene expression profile suggests a dual beneficial effect: (1) promotion of chondrogenic differentiation and extracellular matrix (ECM) synthesis, and (2) suppression of hypertrophic differentiation, a critical factor in preventing cartilage calcification and osteoarthritis progression. These findings highlight the synergistic potential of BMSC exosomes and glucosamine as a combinatorial therapy for cartilage regeneration. By enhancing anabolic processes (Sox9-mediated chondrogenesis and aggrecan/collagen II deposition) and concurrently inhibiting catabolic pathways (Col10a1-associated hypertrophy), this strategy may offer a promising approach to delay or reverse early-stage cartilage degeneration in degenerative joint diseases.

**Conclusion:** Our study reveals that combining bone marrow stem cell-derived exosomes with glucosamine synergistically enhances chondrogenesis by upregulating key cartilage markers (Sox9, Acan, Col2a1) while suppressing hypertrophy-related Col10a1. This dual action suggests that exosomes promote cartilage matrix synthesis through their bioactive cargo (e.g., miRNAs/growth factors), while glucosamine likely inhibits hypertrophic differentiation, potentially via modulation of the Wnt/β-catenin pathway. These findings support this combination as a promising strategy for improving cartilage repair and preventing OA progression, though further *in vivo* validation is needed.



## اثر هم افزایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی و گلوکز آمین بر بیان ژن‌های Col10a1 و Col2a1، Acan، Sox9 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش نژاد NMRI در محیط کندروژنیک

مریم لطفی<sup>۱</sup>، جواد بهار آرا<sup>۲\*</sup>، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی<sup>۳</sup>، پژمان خورشید<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، maryam.lotfi0043@iau.ac.ir

<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، baharara@iau.ac.ir

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، Shahrokhbady@yahoo.com

<sup>۴</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران، Pejman.khorshid@iau.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
اگزوزوم، گلوکز آمین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز کندروژنیک	هدف: غضروف‌ها فاقد رگ خونی و دارای توانایی ترمیم محدود می‌باشند. بازسازی آسیب غضروفی به‌عنوان یک چالش باقی مانده است. اگزوزوم‌ها وزیکول‌های خارج سلولی می‌باشند که از انواع مختلفی از سلول‌ها آزاد می‌شوند. از طرف دیگر مشاهده شده که گلوکز آمین به‌عنوان دارو نقش مهمی در بازسازی غضروف ایفا می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر توام اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش و گلوکز آمین بر بیان ژن‌های اختصاصی غضروف می‌باشد. مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی کشت داده شدند و اگزوزوم‌ها از محیط رویی سلول‌ها به‌روش التراسانتریفیوژ استخراج شد. اثرات اگزوزوم و گلوکز آمین بر بیان ژن‌های Col10a1 و Col2a1، Acan، Sox9 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور محیط کندروژنیک بررسی شد. نتایج: نتایج شناسایی، حضور اگزوزوم‌ها با اندازه‌ی تقریبی ۱۰۰ نانومتر را تایید کردند و همچنین نتایج Real time PCR نشان داد که بیان ژن‌های Sox9، Col2a1 و Acan در سلول‌های بنیادی تحت تیمار توام با اگزوزوم و گلوکز آمین نسبت به سایر گروه‌ها پس از ۱۴ روز افزایش معنی دار و همچنین بیان ژن Col10a1 کاهش معنادار داشته است. نتیجه‌گیری: ترکیب اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و گلوکز آمین باعث افزایش بیان ژن‌های اختصاصی غضروف (Sox9، Acan و Col2a1) و کاهش بیان ژن هیپرتروفیک Col10a1 شد که نشان‌دهنده تقویت فرایند کندروژنز و مهار تمایز هیپرتروفیک است. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده هم‌زمان از این دو عامل می‌تواند رویکردی موثر برای بازسازی غضروف و پیشگیری از تخریب زودرس آن باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۰۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۷	

## ۱- مقدمه

آسیب‌های غضروفی با تخریب مفصلی، دردهای مزمن، ناتوانی و همچنین هزینه‌های سنگین اقتصادی رابطه‌ی تنگاتنگی دارد (۱). غضروف بافت پیوندی در مفاصل با توانایی محدود بازسازی و ترمیم بعد از جراحت می‌باشد (۲). غضروف مفصلی از ماکرومولکول‌هایی مثل کلاژن، پروتئوگلیکان و پرتئین‌های غیرکلاژنی و گلیکوپروتئین‌ها اما بدون هیچ رگ خونی و عصب تشکیل شده است (۳). در مواقع آسیب این خصوصیات منحصر به فرد باعث عدم انتقال مواد مغذی و فاکتورهای ترمیمی به محل مورد نظر شده و باعث تحلیل پیش‌رونده بافت می‌شود (۴). کندروسیت‌ها تنها سلول‌های مستقر در غضروف می‌باشند و مسئول سنتز و بازگشت مایع خارج سلولی هستند به‌همین دلیل حفظ سلامت کندروسیت‌ها، فاکتوری مهم در نگهداری غضروف و جلوگیری از تخریب آن می‌باشد (۵). الگوهای درمانی فعلی در پزشکی استفاده از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) می‌باشد که از مغز استخوان جدا می‌شوند (۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، می‌توانند به انواعی از سلول‌ها مثل استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت تمایز پیدا کنند (۷). در سال‌های اخیر استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی که یکی از انواع ترشحات سلولی است به‌عنوان یک رویکرد درمانی عاری از سلول و بدون عوارض ناشی از سلول درمانی از جمله تومورزایی و ایمنی‌زایی مورد توجه قرار گرفته است (۸). اگزوزوم‌ها وزیکول‌های خارج سلولی آزاد شده از انواع مختلفی از سلول‌ها با اندازه ۴۰ تا ۱۴۰ نانومتر می‌باشند. وظیفه‌ی اصلی آن‌ها انتقال پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک بین سلول‌ها می‌باشد (۹). تمایز کندروسیت‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تحت تاثیر محیط خارج سلولی و انواعی از فاکتورهای رشد قرار می‌گیرد.  $TGF/\beta$  به‌عنوان فاکتور رشد اصلی می‌باشد که توانایی القا تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف را دارد (۱۰). تمایز سلول‌های بنیادی به کندروسیت فرایندی پیچیده است که به‌وسیله‌ی چندین ژن تنظیم می‌شود. Sox9 یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی اولیه برای تمایز کندروسیت‌ها است. کلاژن II، پروتئین پایین دست Sox9، یکی از اجزا مهم ماتریکس غضروف و اساس استحکام ساختاری برعلیه فشارهای خارجی می‌باشد. همچنین اگریکان یکی از اجزا اصلی ماتریکس خارج سلولی در غضروف‌های مفصلی است و برای نگهداری شکل طبیعی بافت غضروف مورد نیاز می‌باشد (۱۱). اگزوزوم‌ها به‌عنوان نانوذراتی با قابلیت انتقال مواد بیولوژیکی، می‌توانند بر فعالیت‌های سلول‌های غضروفی تاثیرگذار باشند. این اگزوزوم‌ها با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مانند Wnt/ $\beta$ -catenin، تکثیر سلول‌های غضروفی را تحریک می‌کنند. اگزوزوم‌های مشتق شده از MSCها می‌توانند بیان نشانگرهای غضروفی مانند کلاژن نوع II و اگریکان را در سلول‌های غضروفی افزایش دهند و باعث تمایز شوند و همچنین با کاهش بیان MMP-13، از تجزیه ماتریکس خارج سلولی جلوگیری کرده و سنتز ماتریکس را تقویت می‌کنند (۱۲، ۱۳). گلوکزآمین (Glucosamine) یک آمینو مونوساکارید طبیعی است که به‌عنوان جزئی از گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAG) در بافت‌های همبند و غضروف وجود دارد و به حفظ انعطاف پذیری، استحکام و قابلیت ارتجاعی این بافت‌ها کمک می‌کند (۱۴). گلوکزآمین (GA) معمولا به‌عنوان دارو یا مواد مغذی برای کنترل علائم استئوآرتروز در مفصل آسیب‌دیده استفاده می‌شود (۱۵). زیست‌فعال بالای GA باعث سنتز پروتئوگلیکان‌ها و بازیابی فعالیت کندروسیت‌های آسیب‌دیده می‌شود (۱۶). این ترکیب با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مانند Wnt/ $\beta$ -catenin، تکثیر سلول‌های غضروفی را افزایش می‌دهد و همچنین با افزایش بیان ژن‌های غضروفی مانند Sox9، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های غضروفی را تسهیل می‌کند. گلوکزآمین با افزایش سنتز پروتئوگلیکان‌ها و کلاژن نوع II، تولید

ماتریکس خارج سلولی را تقویت می‌کند (۱۷). مطالعات *in vitro* و *in vivo* اثرات گلوکزآمین بر بازسازی غضروف را بررسی کرده‌اند و اثرات بازسازی کننده ساختار و ضد التهابی آن را نشان داده‌اند. در واقع، گلوکزآمین نه تنها بلوک‌های ساختمانی برای سنتز GAG توسط سلول‌های غضروفی را فراهم می‌کند، بلکه اثرات دیگری مانند تحریک ساخت غضروف، فعالیت ضد کاتابولیک و ضد التهاب را نیز اعمال می‌کند. همچنین گلوکزآمین ترشح و فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP)، آگریکانازها و سایر آنزیم‌های کاتابولیک را مهار می‌کند (۱۸). این ماده یک بستر مناسب برای بیوسنتز پروتئوگلیکان‌ها مانند آگرکان است که یکپارچگی و عملکرد غضروف را حفظ می‌کند (۱۹). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که اثر مثبت GA بر سلول‌های غضروفی با تنظیم مثبت بیان فاکتور رشد تبدیل کننده بتا ( $TGF/\beta$ ) به دست آمده است. در مطالعات گذشته نشان داده شد که GA سنتز اجزای ماتریکس خاص غضروف، یعنی آگریکان و کلاژن II را افزایش داد (۱۴). با توجه به اثرات موفقیت آمیز اگزوزوم‌ها در تمایز سلول‌های بنیادی به غضروف و نتایج مثبت گزارش شده از اثر گلوکزآمین بر افزایش بیان شاخص‌های غضروفی، این تحقیق با هدف استفاده توأم از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش و گلوکزآمین برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی غضروف انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

موش‌های نر NMRI بالغ ۶ هفته ای از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری تهیه شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است و کلیه مراحل آزمایش بر اساس اخلاق کمیته اخلاق پژوهشی نهادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. (مجوز شماره IR.IAU.MSHD.REC.1402.014).

**تهیه و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:** ۳ سر موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI، به وسیله‌ی جا به جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تحت شرایط استریل استخوان تیبیا و فمور آن بدون بافت‌های اضافه جدا شد. سپس دو سر استخوان قطع شد و محتویات مغز استخوان توسط یک سرنگ حاوی محیط کشت پایه (aMEM، ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) به درون فلاسک کشت سلولی منتقل شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از ۳ تا ۵ پاساژ آماده ی استفاده شدند. اثبات بنیادی بودن سلول‌ها توسط حضور مارکرهای سطحی CD44، CD73 و CD105 و عدم وجود مارکرهای سطحی CD34 و CD45 توسط فلوسایتومتری بررسی شد (۲۰).

**جداسازی، خالص سازی اگزوزوم‌ها:** در این مطالعه از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که در مطالعه‌ی قبلی توسط لطفی و همکاران جداسازی، شناسایی و تعیین غلظت شده بود استفاده شد (۲۰). به منظور جداسازی اگزوزوم‌ها زمانی که سلول‌ها به ۶۰ تا ۷۰ درصد تراکم رسیدند، محیط کشت تازه فاقد سرم به آن‌ها اضافه شد و بعد از ۲ روز محیط کشت رویی سلول‌ها جمع آوری شد و سپس سانتریفیوژ با دورهای متوالی و در نهایت اولتراسانتریفیوژ (g1۰۰۰۰۰) به مدت ۷۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس پلت‌های اگزوزوم در PBS ( $\sigma$ -Sigma)

(Aldrich, UK) سرد معلق و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آگروزوم‌ها توسط کیت سنجش پروتئین BCA (Sigma, UK) تعیین غلظت شد.

**تهیه‌ی گلوکزآمین:** گلوکزآمین هیدروکلراید از سیگما آلدریج خریداری شد. محلول گلوکزآمین هیدروکلراید با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و تا استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**آزمون MTT:** سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آگروزوم و غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گلوکزآمین تحت تیمار قرار گرفتند و سپس برای بررسی میزان بقای سلولی و تعیین غلظت مناسب آگروزوم و گلوکزآمین برای مطالعات بعدی از آزمون MTT استفاده شد (۲۰، ۲۱). پس از تیمار سلول‌ها و گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت قبلی سلول‌ها خارج و محیط کشت جدید به همراه محلول MTT اضافه شد و پس از ۴ ساعت آنکوباسیون از محیط رویی برداشته شد و DMSO اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه آنکوبه شد و در نهایت میزان جذب، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

**تیمار آگروزوم‌ها و گلوکزآمین بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان طبق پروتکل گفته شده استخراج شدند (۲۰). پس از پاساژ دوم محیط کشت سلول‌ها با محیط تمایزی تعویض شد و میزان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کندروژنیک شامل ۱ درصد ITS همراه pre-mix، ۰.۰۵ g/L آسکوربیک اسید، ۱۰۰ nM دگزامتازون، ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتوماسین و ۱۰ ng/mL TGF/β در چهار گروه شاهد (بدون تیمار)، آگروزوم، گلوکزآمین و آگروزوم+ گلوکزآمین بررسی شد (۲۲). سلول‌ها به مدت ۱۴ روز در محیط تمایزی غرور قرار داده شدند و محیط کشت آن‌ها هر دو روز تعویض شد.

**بررسی بیان ژن‌های Col10a1، Col2a1، Acan، Sox9 توسط تکنیک Real Time PCR:** استخراج RNA از سلول‌ها بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش کوچک آزمایشگاهی گروه‌های آزمون در روز ۱۴ پس از تیمار در شرایط عاری از DNase و RNase توسط کیت pars tous طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد و غلظت RNA به دست آمده در فرایند استخراج RNA به صورت کمی محاسبه شد. سنتز cDNA توسط نسخه برداری معکوس از RNA توسط کیت شرکت pars tous انجام شد. همچنین یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌های مورد مطالعه طراحی و سنتز شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد. سپس Real-Time PCR با استفاده از SYBRGreen PCR Master Mix انجام شد و سطح بیان تمامی ژن‌های مورد نظر توسط ژن بتا اکتین نرمال سازی و بیان ژن‌ها توسط نرم افزار CFX96 BioRad بررسی شد. همچنین از ژن بتا اکتین به عنوان Housekeeping استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Rael-time PCR

Gene	Sens	Antisense	Temp
Beta-Actin	5'CTTCTTGGGTATGGAATCCTG3'	5'GTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC3'	60
Sox9	5'CTCTGGAGGCTGCTGAA3'	5'ATGTGAGTCTGTTCCGTGG3'	60
ACAN	5'GGCAGAAGAAAGATCGCT3'	5'CTTGTAGGTGTTGGGGTCT3'	60
Col2a1	5'GGACAGAAAGGAGATGCTG3'	5'TCCAGGATTGCCATTAGC3'	60
Col10a1	5'CCCAGCACCAGAATCTATC3'	5'CTTACTCTTTATGGCGTATG3'	60

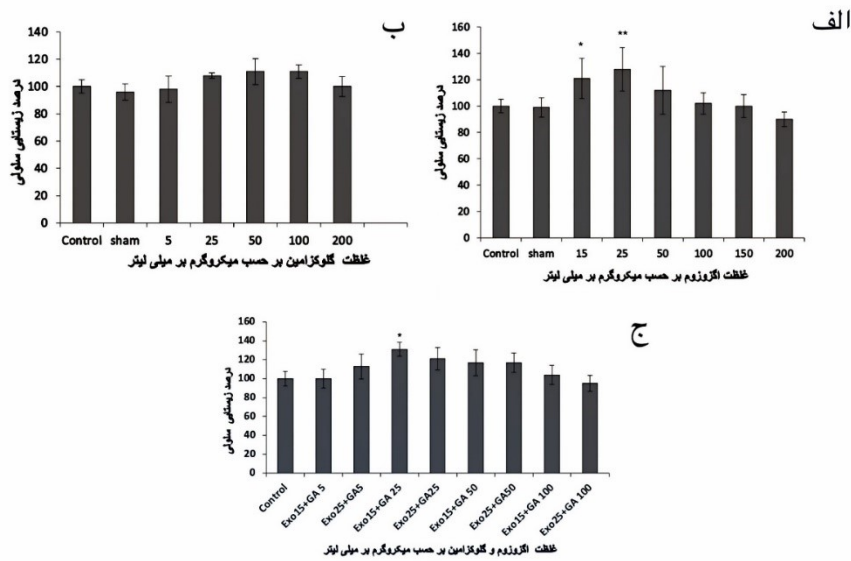
### ۳- آنالیز آماری

تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد و آزمایش‌ها حداقل سه بار انجام شد. در تمام آزمایش‌ها تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده شد. مقدار  $p < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### ۴- نتایج

#### آزمون MTT

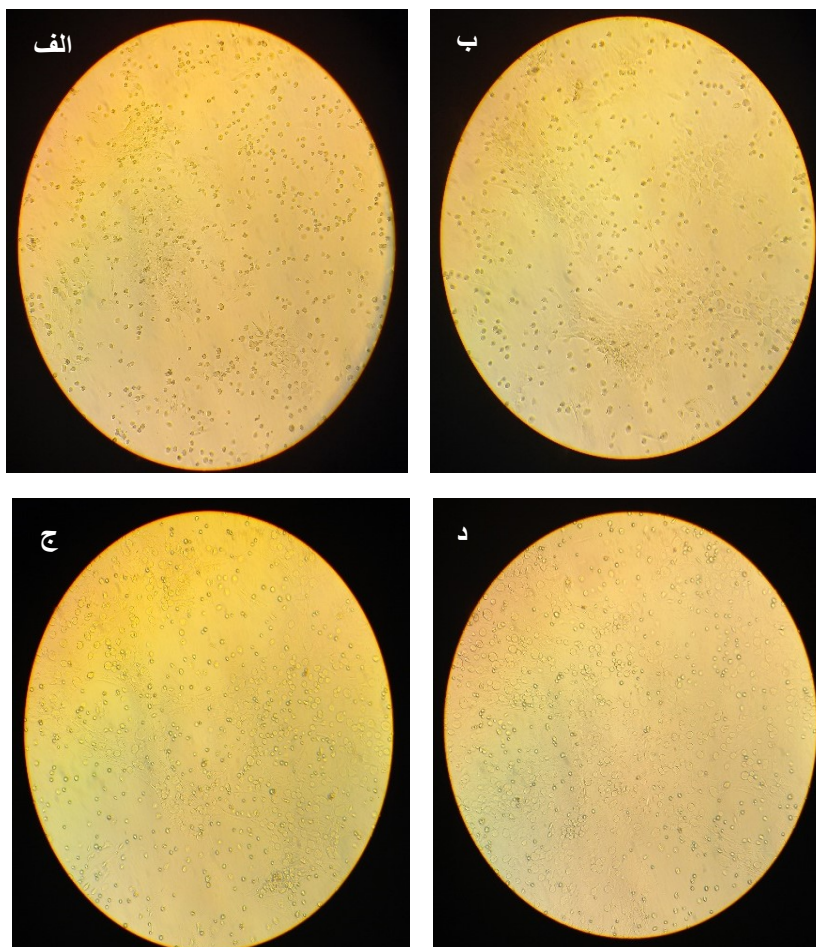
آزمون MTT به منظور بررسی زیستایی سلول‌های تحت تیمار با اگزوزوم و گلوکزآمین و تعیین غلظت بهینه‌ی آن‌ها انجام شد. سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر اگزوزوم و غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر گلوکزآمین و PBS (شاهد آزمایشگاهی) تیمار شدند و بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد که اختلاف معنادار در زیستایی سلول‌ها بین گروه‌های تحت تیمار با غلظت ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم نسبت به گروه شاهد وجود دارد ( $p < 0.01$  و  $p < 0.05$ ) (شکل ۱-الف). این نتایج نشان داد که غلظت‌های مورد نظر اگزوزوم باعث زیستایی بیشتر سلول‌ها شده و اثرات سمی برای سلول‌ها ندارد و با توجه به داده‌های این آزمون غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم به عنوان غلظت بهینه برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد. در مورد گلوکزآمین اختلاف معناداری در زیستایی سلول‌ها بین گروه‌های تحت تیمار با گلوکزآمین و گروه شاهد وجود نداشت و بنابراین غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گلوکزآمین به عنوان غلظت مورد استفاده در این مطالعه در نظر گرفته شد (شکل ۱-ب). همچنین با توجه نتیجه‌ی به دست آمده از اثر هم افزایی اگزوزوم و گلوکزآمین از طریق آزمون MTT به ترتیب غلظت ۱۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم و گلوکزآمین برای استفاده‌ی توأم در نظر گرفته شد (شکل ۱-ج).



شکل ۱: اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و گلوکزآمین بر زیستایی سلول‌های بنیادی با استفاده از روش MTT<sub>24</sub> ساعت پس از تیمار. الف) تیمار سلول‌های بنیادی با غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اگزوزوم. ب) تیمار سلول‌های بنیادی با غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گلوکزآمین. ج) تیمار سلول‌های بنیادی تحت تاثیر هم‌زمان اگزوزوم با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ و گلوکزآمین با غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SD نمایش داده شده است.  $p < 0.05$  و  $P < 0.01$ \*\* اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد).

### بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار با اگزوزوم و گلوکزآمین

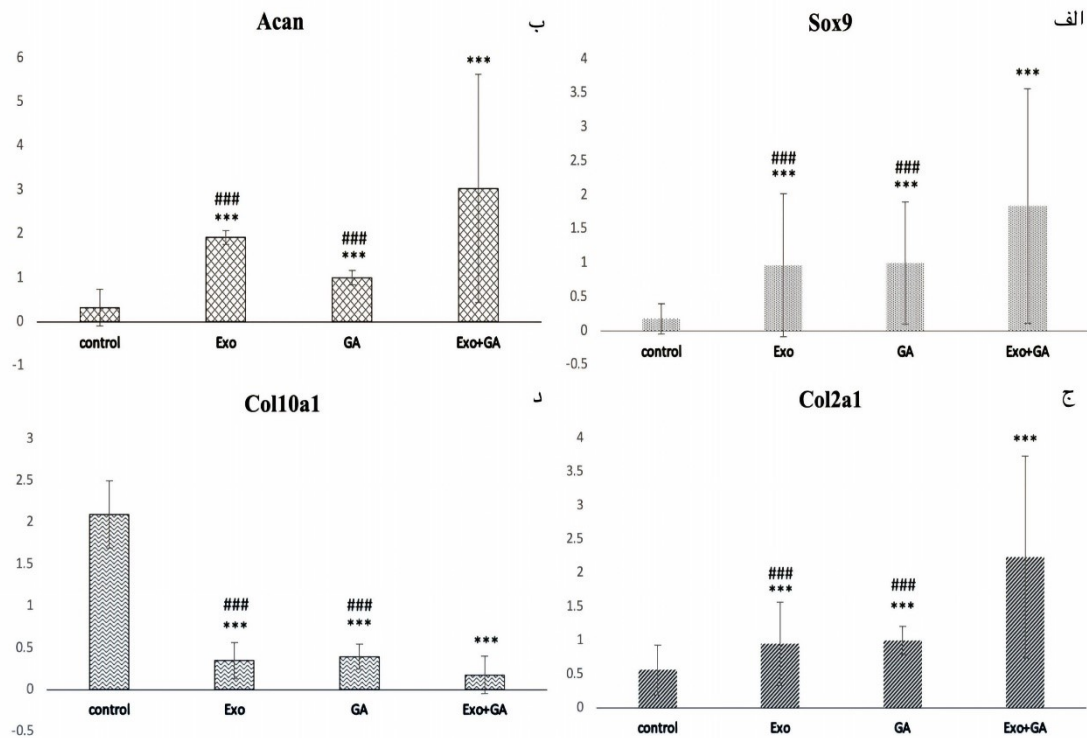
در گروه شاهد سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در محیط کندروژنیک، بدون دریافت اگزوزوم یا گلوکزآمین، عمدتاً سلول‌ها شکل دوکی خود را حفظ کرده‌اند و تجمع سلولی محدودی مشاهده می‌شود. (شکل ۲-الف). در گروه گلوکزآمین سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کندروژنیک، توسط گلوکزآمین تیمار شدند، همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌ها تمایل به تغییر شکل جزئی از حالت دوکی به کروی و تشکیل خوشه‌های کوچک را نشان می‌دهند (شکل ۲-ب). در گروه اگزوزوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کندروژنیک، توسط اگزوزوم تیمار شدند همان‌طور که مشاهده می‌شود تجمع سلولی بیشتر از گروه شاهد و گروه گلوکزآمین دیده می‌شود (شکل ۲-ج). در گروه هم‌افزایی (اگزوزوم + گلوکزآمین)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کندروژنیک، توسط اگزوزوم و گلوکزآمین تیمار شدند و تصاویر بیانگر آن است که سلول‌ها تغییر شکل واضحی به فنوتیپ کندروسیتی با مورفولوژی کاملاً کروی و تشکیل کلونی‌های متراکم نشان دادند (شکل ۲-د).



شکل ۲: مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار با اگزوزوم و گلوکزآمین در محیط کندروژنیک

### بررسی بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real Time PCR

سطح بیان ژن‌های تمایزی Sox9, Acan, Col2a1 و Col10a1 در پاسخ به تیمار با اگزوزوم و گلوکزآمین در روز ۱۴ پس از تیمار توسط Real Time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در گروه اگزوزوم (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) سطح بیان ژن‌های Sox9, Acan و Col2a1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار نشان دادند ( $p < 0.001$ ), اما ژن Col10a1 نسبت به گروه شاهد کاهش بیان معنی دار داشت ( $p < 0.001$ ). در گروه گلوکزآمین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) سطح بیان ژن‌های Sox9, Acan و Col2a1 نسبت به گروه شاهد به‌طور معنادار افزایش یافت ( $p < 0.001$ ) و بیان ژن Col10a1 نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $p < 0.001$ ). در گروه تیماری هم افزایی اگزوزوم (۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و گلوکزآمین (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) افزایش بیان معنی دار در ژن‌های Sox9, Acan, Col2a1 و کاهش بیان معنی دار در ژن Col10a1 نسبت به گروه اگزوزوم و گلوکزآمین به تنهایی مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). (شکل ۲).



شکل ۳: الگوی تغییرات بیان ژن های Sox9، Acan، Col2a1 و Col10a1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با اگزوزوم و گلوکزآمین ۱۴ روز پس از تیمار. (مقدار  $p < 0.001$  (\*\*\*) نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد است. و  $p < 0.0001$  (####) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه توام می‌باشد).

## ۵- بحث

غضروف مفصلی که انتهای استخوان‌ها را می‌پوشاند، وظیفه روان‌سازی حرکت استخوان‌ها در محل مفاصل را بر عهده دارد. این بافت از ماکرومولکول‌هایی مانند کلاژن، پروتئوگلیکان، پروتئین‌های غیرکلاژنی و گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است، اما فاقد هرگونه رگ خونی و عصب می‌باشد (۳). کندروسیت‌ها تنها سلول‌های ساکن در غضروف هستند که مسئول سنتز و بازجذب مایع خارج سلولی می‌باشند (۵). اگزوزوم‌ها وزیکول‌های کوچکی حاوی نوکلئیک اسیدهایی مانند DNA، mRNA، lncRNA، miRNA و نیز پروتئین و لیپید هستند (۲۳). رفتار ترشحی اگزوزوم‌ها ارتباط نزدیکی با سلول مبدأ داشته و برخی ویژگی‌های سلول دهنده را منعکس می‌کنند (۲۴). گلوکزآمین (GA) یک ترکیب گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) در بافت همبند است که به صورت درون‌زا از گلوکز از طریق مسیر هگزوزآمین سنتز می‌شود و همچنین به‌عنوان مکمل غذایی برای کاهش ناراحتی ناشی از استئوآرتریت استفاده می‌شود (۲۵، ۲۶). در دهه گذشته، آزمایش‌های *in vitro* و *in vivo* نشان داده‌اند که تجویز GA یا مشتقات آن در شرایطی که تعادل بین فرآیندهای کاتابولیک و آنابولیک مختل شده و سلول‌ها قادر به جبران کامل از دست

رفتن غضروف نیستند، اثر محافظتی بر غضروف دارد (۲۷). همچنین مشخص شده است که گلوکزآمین در تنظیم متابولیسم کندروسیت‌ها و کاهش فعالیت‌های التهابی آن‌ها موثر است (۲۸).

در این تحقیق، اثر هم‌افزایی اگزوزوم و گلوکزآمین بر بیان ژن‌های Sox9, Acan, Col2a1 و Col10a1 بررسی شد. نتایج نشان داد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه گلوکزآمین باعث افزایش بیان ژن‌های Sox9, Acan و Col2a1 و کاهش بیان ژن Col10a1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند. در این مطالعه از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده شد که در مطالعه قبلی توسط لطفی و همکاران (۲۰) جداسازی، شناسایی و تعیین غلظت شده بودند. اندازه اگزوزوم‌ها در مطالعه قبلی با روش‌های DLS, AFM, TEM و SEM تایید و حدود ۱۰۰ نانومتر گزارش شد. تمایز کندروسیت‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر محیط خارج سلولی و انواعی از فاکتورهای رشد قرار می‌گیرد TGF- $\beta$  به‌عنوان فاکتور رشد اصلی، توانایی القای تمایز مستقیم این سلول‌ها به غضروف را دارد (۱۰). در مطالعه حاضر نیز از محیط کشت کندروژنیک حاوی TGF- $\beta$  برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت استفاده شد. Sox9 تنظیم‌گر اصلی ترمیم غضروف و تنظیم‌کننده چندین فاکتور کندروژنیک مانند Col2a1, Acan و Col10a1 می‌باشد (۲۹). کلاژن نوع II ستون فقرات ساختاری ماتریس غضروف را تشکیل می‌دهد و بنابراین وجود آن نشان‌دهنده فرآیند غضروف‌سازی است. همچنین، Agcan مسئول تجمع ماکرومولکولی اسید هیالورونیک بوده و مقاومت فشاری را برای بافت غضروف فراهم می‌کند (۳۰).

Zhou و همکاران (۳۱) با استفاده از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی شاخ گوزن (ASC-Exos) به ترمیم آسیب مکانیکی غضروف پرداختند. آزمایش‌های آن‌ها نشان داد که ASC-Exos به‌طور قابل توجهی توانایی تکثیر و مهاجرت سلول‌های غضروفی را افزایش می‌دهد. همچنین، ASC-Exos سطوح بیان mRNA مربوط به Acan, کلاژن نوع II و Sox9 را در سلول‌های غضروفی تنظیم کرد و تاثیر قابل توجهی بر ترمیم آسیب غضروف داشت که ممکن است ناشی از ترویج تکثیر و مهاجرت سلول‌های غضروفی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد (۳۱). Qin و همکاران (۳۲) اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان (hucMSCs) با بیان بیش‌ازحد Sox9 را بر استئوآرتریت بررسی کردند. اگزوزوم‌های مشتق از این سلول‌ها (ExosSOX9) جدا شد و بر روی مدل‌های OA آزمایشگاهی و حیوانی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که ExosSOX9 سنتز ماتریس خارج سلولی غضروف را افزایش داده و از تخریب آن جلوگیری می‌کند. همچنین سطوح بیان Acan, Col2a1 و Sox9 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. Xu و همکاران (۳۳) نقش اگزوزوم‌های مشتق از استئوسیت‌ها (OCY-exos) را در OA بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که OCY-exos زیست‌پذیری و مهاجرت سلولی را تقویت کرده و آپوپتوزیس و رسوب ماتریس خارج سلولی را مهار می‌کنند. علاوه بر این، این اگزوزوم‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های کلاژن نوع II و Sox9 شدند (۳۳). در مطالعه Sevimli و همکاران (۳۴) اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان (hAT-MSCs-Exos) پس از تمایز غضروفی و تحت تاثیر IL-1 $\beta$ ، افزایش سطح بیان ژن‌های Acan, Col2a1 و Sox9 را نشان دادند و پیش‌بینی شد که استفاده از این اگزوزوم‌ها برای بازسازی غضروف مفید باشد.

کلاژن نوع II که جزء اصلی غضروف مفصلی و هیالین است، تا ۵۰ درصد کل پروتئین غضروف و ۸۵ تا ۹۰ درصد کلاژن غضروف مفصلی را تشکیل می‌دهد (۳۵). He و همکاران (۳۶) نشان دادند که درمان با اگزوزوم، تنظیم مثبت پروتئین Col2a1 را در بافت غضروف رت‌های دچار نقص غضروفی به دنبال دارد. Zhao و همکاران (۳۷) گزارش کردند که درمان با اگزوزوم، غضروف‌سازی در سلول‌های پریوست را افزایش داده و نشانگرهای غضروفی از جمله Sox9 و کلاژن را در این سلول‌ها بالا

می‌برد. Kim و همکاران (۲۲) نشان دادند که سیگنال‌دهی دوطرفه میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کندروسیت‌ها با واسطه آگزوزوم‌ها، در افزایش غضروف‌سازی مؤثر است و آگزوزوم‌ها به‌وضوح بیان ژن کلاژن را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌دهند. Zhang و همکاران (۳۸) نیز نشان دادند که آگزوزوم‌های مشتق از BMSC از تخریب غضروف و تشکیل استئوفیت در طول پیشرفت OA در موش جلوگیری کرده و بیان ژن‌های غضروفی کلاژن و Sox9 را افزایش می‌دهند. Ma و همکاران (۱۰) وزیکول‌های خارج سلولی (C-EVs) (را از کندروسیت مفصل انسان جدا کردند و مشاهده نمودند که این وزیکول‌ها تکثیر و تمایز غضروفی سلول‌های hUCMSCs را تقویت می‌کنند که با افزایش بیان Acan، Col2a1 و Sox9 و کاهش بیان پروتئین Col10a1 همراه بود.

در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های Sox9، Acan، Col2a1 و Col10a1 در روز ۱۴ پس از تیمار بررسی شد. مشاهده شد که آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بیان ژن Sox9 و به‌دنبال آن افزایش بیان ژن‌های Col2a1 و Acan شدند که هم‌سو با مطالعات سایر محققان مبنی بر افزایش بیان Acan و Col2a1 تحت تأثیر Sox9 می‌باشد. همچنین مشخص شد که میزان بیان این ژن‌ها در گروه‌های تحت تیمار با آگزوزوم در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری دارد. علاوه بر این، بیان ژن Col10a1 در گروه‌های تیمار شده با آگزوزوم نسبت به گروه شاهد کاهش یافت.

Gasparella و همکاران (۲۷) یک آمینواسید مشتق از GA به نام DCF001 را در رشد و القای غضروفی سلول‌های بنیادی چندتوان بررسی کردند و افزایش بیان ژن Col2a1 را در سلول‌های تحت تیمار با DCF001 مشاهده نمودند. Hsu و همکاران (۲۵) نشان دادند که گلوکزآمین و سیلیبیین هموستاز غضروف را از طریق تاثیر بر گلیکوزیلاسیون و استرس‌های سلولی در کندروسیت‌های انسان تغییر می‌دهند. این ترکیبات تکثیر سلولی، تولید ROS میتوکندری و سیتوزولی، پتانسیل غشای میتوکندری، مشخصات چرخه سلولی و اتوفاژی را به طور متفاوتی تعدیل می‌کنند. Huang و همکاران (۳۹) اثر تزریق ریزدانه‌های کرایوژل ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف گلوکزآمین را بر بیان ژن‌های خاص غضروف و تولید پروتئین بررسی کردند و نتیجه گرفتند که ادغام گلوکزآمین در کرایوژل، بیان ژن‌های خاص غضروف و در نتیجه تمایز سلول‌های غضروفی را به روشی وابسته به دوز افزایش می‌دهد. Agrawal و همکاران (۳۰) نشان دادند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بر روی داربست متخلخل حاوی گلوکزآمین، بیان ژن‌های Sox9، Acan و کلاژن را افزایش می‌دهد که نشان‌دهنده تحریک مؤثرتر این سلول‌ها به سمت دودمان غضروفی است. در مطالعه Dadgar و همکاران (۳۵)، سلول‌های غضروفی کشت شده بر روی داربست‌های ماتریس استخوان‌دمنیرالیزه شده (DBM) حاوی گلوکزآمین، افزایش بیان ژن کلاژن نوع II را نشان دادند، در حالی که در مورد ژن Col10 تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر، علاوه بر افزایش بیان ژن‌های Sox9، Acan و Col2a1 در گروه تیمار شده با گلوکزآمین نسبت به گروه شاهد در روز ۱۴، مشاهده شد که در گروه تیمار هم‌زمان با گلوکزآمین و آگزوزوم، بیان هر سه ژن نسبت به هر یک از گروه‌ها به تنهایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، سنجش بیان ژنی کاهش بیان ژن Col10a1 را در هر سه گروه تیماری نسبت به گروه شاهد و نیز در گروه تیمار توأم نسبت به گروه‌های آگزوزوم و گلوکزآمین به تنهایی نشان داد که هم‌سو با مطالعات پیشین است. در مطالعه Hwang و همکاران (۴۰)، تمایز غضروفی سلول‌های بنیادی جنینی موش در هیدروژل‌های PEG در حضور گلوکزآمین بررسی شد. بیان ژن‌های Sox9، کلاژن نوع II و Acan در روزهای مختلف افزایش یافت، اما بیان Col10a1 تا روز ۲۱ به تاخیر افتاد که نشان می‌دهد GA ممکن است در مهار تمایز هیپرتروفیک سلول‌های غضروفی نقش داشته باشد. در

مطالعه حاضر نیز کاهش بیان Col10a1 در روز ۱۴ مشاهده شد که با توجه به نتایج مطالعه Hwang و همکاران، احتمالاً بیان Col10a1 پس از گذشت زمان بیشتری آغاز می‌شود.

Kang و همکاران (۴۱) دریافتند که هیدروژل ژله‌ای وارتون حاوی آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، سطح بیان Sox9 و کلاژن نوع II را افزایش داده و غضروف‌زایی و بازسازی ماتریس خارج سلولی منیسک را تقویت می‌کند. Chen و همکاران (۴۲) نشان دادند که کرایوژل حاوی گلوکزآمین و اسید هیالورونیک، سطح بیان بالاتری از Sox9، کلاژن نوع II و Acan را نسبت به گروه اسید هیالورونیک به تنهایی نشان می‌دهد و به‌طور کلی، تنظیم مثبت تمامی ژن‌ها با افزایش محتوای GA در کرایوژل مشاهده شد. در مطالعه حاضر نیز هنگامی که تیمار به‌صورت هم‌زمان با گلوکزآمین و آگزوزوم انجام شد، سطح بیان شاخص‌های غضروفی نسبت به گروه‌های آگزوزوم و گلوکزآمین به تنهایی افزایش یافت.

Vishwanath و همکاران (۴۳) نشان دادند که گلوکزآمین می‌تواند کارایی داربست‌های ترکیبی ابریشم فیبروئین/کیتوزان (SF/CS) را افزایش داده و راه را برای مطالعات بیشتر در زمینه بازسازی بافت غضروف هموار کند. Elbasset و همکاران (۴۴) نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و گلوکزآمین را در درمان استئوآرتریت در موش‌های صحرایی بررسی کردند و نشان دادند که بازیابی ضخامت و بهبود بافت غضروفی در موش‌های درمان شده با گلوکزآمین و سلول‌های بنیادی در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر بود. Zhang و همکاران (۴۵) اثر گلوکزآمین هیدروکلراید همراه با سلوکوکسیب را بر پاسخ التهابی و متابولیسم استخوان در بیماران مبتلا به آرتروز زانو بررسی کردند و نشان دادند که این ترکیب اثر درمانی خوبی داشته و می‌تواند متابولیسم استخوان را بهبود بخشد و پاسخ التهابی را کاهش دهد. همچنین، Zhang و همکاران (۱۶) در مطالعه‌ای دیگر اثر ترمیمی هیدروژل‌های ترکیبی مبتنی بر پروتئین گندم بارگیری شده با سیلیکات منیزیم و گلوکزآمین را بر نقایص غضروفی ارزیابی کردند و مشاهده نمودند که افزودن گلوکزآمین به هیدروژل، بیان ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با تمایز غضروفی را افزایش می‌دهد. Golshayan و همکاران (۴۶) به ارزیابی اثرات گلوکزآمین سولفات بر داربست الکتروریسی شده پلی(۳-هیدروکسی بوتیرات)-کیتوسان/نانولوله‌های کربنی پرداختند و نتیجه گرفتند که افزودن گلوکزآمین سولفات تأثیر مثبتی بر آب‌دوستی الیاف و شروع تمایز غضروفی دارد.

در تمامی این مطالعات مشخص شده است که گلوکزآمین و آگزوزوم در ترکیب با سایر عوامل، اثرات مؤثرتری بر بیان ژن‌های خاص غضروفی و در نتیجه ساخت و بازسازی غضروف اعمال می‌کنند. نتایج مطالعه حاضر نیز هم‌سو با این مطالعات است و افزایش بیان تمامی ژن‌های مورد مطالعه را در گروه تحت تیمار هم‌زمان آگزوزوم و گلوکزآمین نسبت به هر یک از گروه‌ها به تنهایی نشان می‌دهد. اگرچه پیش از این فرمولاسیون داربست‌های حاوی گلوکزآمین و اثرات آگزوزوم‌ها بر افزایش بیان ژن‌های خاص غضروفی گزارش شده بود، اما ترکیب گلوکزآمین با آگزوزوم‌ها بر بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی پیش از این مطالعه نشده بود. در این تحقیق، با بررسی اثر هم‌زمان این دو عامل، مشاهده شد که بیان ژن‌های کندروژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تأثیر این ترکیب، افزایش قابل توجهی حتی در مقایسه با اثر هر یک از عوامل به‌تنهایی دارد.

## ۶- نتیجه‌گیری

مشاهدات ما نشان داد که آگزوزوم‌ها و گلوکزآمین به‌صورت هم‌افزایی بیان ژن‌های تمایزی غضروف را افزایش می‌دهند. همچنین، تأثیر مثبت آگزوزوم‌ها به‌عنوان فاکتورهای پاراکرین ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در ترکیب با

گلوکزآمین به وضوح تأیید شد. از این رو، می توان از این ترکیب در مطالعات درون تنی برای ارزیابی بازسازی غضروف استفاده کرد و زمینه را برای پژوهش های بالینی آینده فراهم نمود.

## ۷- تشکر و قدردانی

از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی که در انجام این پژوهش تجربی همکاری داشتند صمیمانه تشکر می شود.

## ۸- منابع

1. Li Z, Wang Y, Xiang S, Zheng Z, et al. Chondrocytes-derived exosomal miR-8485 regulated the Wnt/ $\beta$ -catenin pathways to promote chondrogenic differentiation of BMSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;523(2):13-506.
2. Liu Y, Ma Y, Zhang J, Yuan Y, et al. Exosomes: a novel therapeutic agent for cartilage and bone tissue regeneration. *Dose-Response*. 2019;17(4):1559325819892702.
3. Xu X, Liang Y, Li X, Ouyang K, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2021;269:120539.
4. Zarei F, Shafaghi R, Dehghan M, Mostafae F, et al. The Best Autologous Cell Sources for Articular Cartilage Regeneration with Critical Size Defects in an Ovine Knee Joints Model. *Cell and Tissue Journal*. 2023;14(4):72-353.
5. Wang J-F, Zhu Z, Sun L, Shao S-k, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit catabolism in human chondrocytes by activating autophagy via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. 2020.
6. Sheikhi F, Baharara J, Nejad Shahrokhadi K, Lotfi M. Effect of exosomes derived from rabbit bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of collagen, aggrecan, and tumor necrosis factor-alpha genes in nucleus pulposus cells. *Cell and Tissue Journal*. 2023;14(4):92-277.
7. Phan J, Kumar P, Hao D, Gao K, et al. Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1522236.
8. Hosseinzadeh M, Hosseini S, Baghaban Eslaminejad M. The Impact of Different Ratios of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells on Condrogenic Potential of Extracellular Vesicles Derived from Coculture of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Cell and Tissue Journal*. 2023;13(4):84-268.
9. Aheget H, Tristán-Manzano M, Mazini L, Cortijo-Gutierrez M, et al. Exosome: a new player in translational nanomedicine. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(8):2380.
10. Ma K, Zhu B, Wang Z, Cai P, et al. Articular chondrocyte-derived extracellular vesicles promote cartilage differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by activation of autophagy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020;18-18:1.
11. Zhou X, Liang H, Hu X, An J, et al. BMSC-derived exosomes from congenital polydactyly tissue alleviate osteoarthritis by promoting chondrocyte proliferation. *Cell Death Discoverv*. 2020;10:(6):142.

12. Wang Y, Yu D, Liu Z, Zhou F, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):189.
13. Wu J, Kuang L, Chen C, Yang J, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials*. 2019;100-206:87.
14. Li T, Liu B, Chen K, Lou Y, et al. Small molecule compounds promote the proliferation of chondrocytes and chondrogenic differentiation of stem cells in cartilage tissue engineering. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110652.
15. Artuzi FE, Puricelli E, Baraldi CE, Quevedo AS, et al. Reduction of osteoarthritis severity in the temporomandibular joint of rabbits treated with chondroitin sulfate and glucosamine. *PloS one*. (4)15;2020e. 0231734.
16. Zhang H, Yang L, Ma S, Yao B, et al. The Effect of a Wheat Protein-based Magnesium Silicate Hydrogel Loaded with a Glucosamine Composite on the Regeneration of Cartilage. 2024.
17. Derfoul A, Miyoshi A, Freeman D, Tuan R. Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthritis and cartilage*. 2007;15(6):55-646.
18. Yao H, Xue J, Xie R, Liu S, et al. A novel glucosamine derivative with low cytotoxicity enhances chondrogenic differentiation of ATDC<sup>5</sup>. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017;10-28:1.
19. Al-Saadi HM, Pang K-L, Ima-Nirwana S, Chin K-Y. Multifaceted protective role of glucosamine against osteoarthritis: review of its molecular mechanisms. *Scientia Pharmaceutica*. 2019;87(4):34.
20. Lotfi M, Baharara J, Nejad Shahrokhbadi Kh, Khorshid P. Examining the Synergic Effect of Exosomes Derived from Mouse Mesenchymal Stem Cells and Low-frequency Electromagnetic Field on Chondrogenic Differentiation. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2024;14-19:1.
21. Ma Y, Zheng W, Chen H, Shao X, et al. Glucosamine promotes chondrocyte proliferation via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(1): 70-61.
22. Kim YG, Park U, Park BJ, Kim K. Exosome-mediated bidirectional signaling between mesenchymal stem cells and chondrocytes for enhanced chondrogenesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 44-24:734;2019.
23. Wang X, Botchway BO, Zhang Y, Yuan J, et al. Combinational treatment of bioscaffolds and extracellular vesicles in spinal cord injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2019;12:81.
24. Peng H, Ji W, Zhao R, Yang J, et al. Exosome: a significant nano-scale drug delivery carrier. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(34):608-7591.
25. Hsu Y-P, Huang T-H, Liu S-T, Huang S-M, et al. Glucosamine and Silibinin Alter Cartilage Homeostasis through Glycosylation and Cellular Stresses in Human Chondrocyte Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(9):4905.
26. Liu S-Y, Chen L-K, Chung Y-T, Chen C-W, et al. Glucosamine inhibits myoblast proliferation and differentiation, and stimulates myotube atrophy through distinct signal pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2025;135:109762.

27. Gasparella M, Cenzi C, Piccione M, Madia VN, et al. Effects of Modified Glucosamine on the Chondrogenic Potential of Circulating Stem Cells under Experimental Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):10397.
28. Cheleschi S, Veronese N, Carta S, Collodel G, et al. MicroRNA as possible mediators of the synergistic effect of celecoxib and glucosamine sulfate in human osteoarthritic chondrocyte exposed to IL- $\beta$ . *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(19):14994.
29. Bai J, Zhang Y, Zheng X, Huang M, et al. LncRNA MM $\Psi$ P-induced, exosome-mediated transfer of Sox 9 from monocyte-derived cells modulates primary chondrocytes. *Cell Death & Disease*. 2020;11(9):763.
30. Agrawal P, Pramanik K, Biswas A. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on silk fibroin: chitosan–glucosamine scaffold in dynamic culture. *Regenerative medicine*. 2018;13(5):58-545.
31. Zhou J, Zhao J, Wang Y, Jiang Y, et al. Repair of mechanical cartilage damage using exosomes derived from deer antler stem cells. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2024;23(8):309.
32. Qin S, Zhang A, Liu H, Wang F, et al. Exosomes derived from SOX 9 overexpressing human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate osteoarthritis by potentially activating autophagy. 2024.
33. Xu W, Zhang Y, Li L, Pan L, et al. Osteocyte-derived exosomes regulate the DLX $\Psi$ /wnt pathway to alleviate osteoarthritis by mediating cartilage repair. *Autoimmunity*. 2024;57(1):2364686.
34. Sevimli M, Inan U, Seyidova N, Guluzade L, et al. In vitro Chondrogenic Induction Promotes the Expression Level of IL-10 via the TGF- $\beta$ /SMAD and Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathways in Exosomes Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 10-2024:1.
35. Dadgar N, Ghiaseddin A, Irani S, Rabbani S, et al. Cartilage tissue engineering using injectable functionalized Demineralized Bone Matrix scaffold with glucosamine in PVA carrier, cultured in microbio-reactor prior to study in rabbit model. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;120:111677.
36. He L, He T, Xing J, Zhou Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem cell research & therapy*. 2020;15-11:1.
37. Zhao C, Chen J-Y, Peng W-M, Yuan B, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR-145 and miR-221. *Molecular medicine reports*. 9-1881:(4)21;2020.
38. Zhang J, Rong Y, Luo C, Cui W. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):25138.
39. Huang Y-H, Chen H-A, Chen C-H, Liao H-T, et al. Injectable gelatin/glucosamine cryogel microbeads as scaffolds for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;253:126528.
40. Hwang NS, Varghese S, Theprungsirikul P, Canver A, et al. Enhanced chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells in hydrogels with glucosamine. *Biomaterials*. 2006;27(36):23-6015.

41. Kang S, Shi X, Chen Y, Zhang L, et al. Injectable decellularized Wharton's jelly hydrogel containing CD<sup>6+</sup> umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes for meniscus tear healing and cartilage protection. *Materials Today Bio*. 2024;29:101258.
42. Chen C-H, Kuo C-Y, Wang Y-J, Chen J-P. Dual function of glucosamine in gelatin/hyaluronic acid cryogel to modulate scaffold mechanical properties and to maintain chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1957.
43. Vishwanath V, Pramanik K, Biswas A. Development of a novel glucosamine/silk fibroin–chitosan blend porous scaffold for cartilage tissue engineering applications. *Iranian Polymer Journal*. 2017;9-26:11.
44. Mohammed MAE, Manawy SM, Shalaby SA, Elshazly AM, et al. The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and glucosamine in The Treatment of Osteoarthritis induced by Monosodium iodoacetate in Adult Albino Rats. *Benha Medical Journal*. 2024.
45. Zhang C, Mu S, Wang L, Yang Z, et al. Effect of Glucosamine Hydrochloride Combined with Celecoxib on Inflammatory Response and Bone Metabolism in Patients with Knee Osteoarthritis. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2024;27(10):84-1179.
46. Golshayan NS, Karbasi S, Masaeli E, Bahremandi-Toloue E, et al. Evaluation of the effects of glucosamine sulfate on poly ( $\gamma$ -hydroxybutyrate)-chitosan/carbon nanotubes electrospun scaffold for cartilage tissue engineering applications. *Polymer-Plastics Technology and Materials*. 2022;61(11):64-1244.