

## پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی: بررسی نقش فروپتوز با استفاده از آنالیزهای

## بیوانفورماتیکی

لاله مودتیان<sup>۱</sup>، محمود تلخابی<sup>\*</sup><sup>۱</sup> گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: محمود تلخابی m\_talkhabi@sbu.ac.ir

**چکیده.** فروپتوز بعنوان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی وابسته به آهن، ارتباط زیادی با پیری دارد. هدف از این مطالعه بررسی نقش فروپتوز در پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) می‌باشد. مجموعه داده GSE97311 (حاوی داده‌های بیان MSCs جنینی و بالغ) آنالیز شده و ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEGs) استخراج شدند. سپس از بین آن‌ها، ژن‌های دارای بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز (FRDEGs) تعیین شدند. در مرحله بعد با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مختلف عملکردهای زیستی، برهمکنش پروتئین-پروتئین، ژن‌های هاب، تنظیم‌کننده‌های بالادست و همچنین فاکتورهای التهابی مرتبط با FRDEGs آنالیز شدند. طبق آنالیزها تعداد ۳۴ ژن بعنوان FRDEGs شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل عملکردهای زیستی نشان داد که این ژن‌ها بیشتر در فعالیت‌های اکسیدودوکتازی، سنتز اسیدهای چرب و پاسخ به یون آهن نقش دارند. همچنین، آنالیزهای مربوط به مسیرهای سیگنال‌دهی نیز نشان داد که این ژن‌ها بیشتر در مسیرهای مربوط به انواع سرطان‌ها و همچنین بیوسنتز اسیدهای چرب درگیر هستند. طبق آنالیزها miR-26b-5p بعنوان مهمترین miRNA و LINC00205 و GAS5 بعنوان مهمترین lncRNA ها شناخته شدند. ژن‌های هاب شامل HMOX1، EZH2، NEDD4L، PTGS2، CDKN2A، ATF3، NOX4، TXNIP، SNCA و MAPK3 بعنوان ژن‌های اصلی فروپتوز مرتبط با پیری MSCs شناسایی شدند. نتایج احتمال مشارکت بالای FRDEGs و تنظیم‌کننده‌های بالا دست آن‌ها در القا التهاب و فنوتیپ پیری در MSCs را نشان دادند. این یافته‌ها ممکن است سرخ‌های جدیدی برای بهبود عملکرد MSCs و کاهش بیماری‌های مرتبط با افزایش سن در آینده ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فروپتوز، پیری، التهاب، lncRNAs، miRNAs

## Mesenchymal stem cells senescence: Investigating the role of ferroptosis using bioinformatics analyses

Laleh Mavaddatiyan<sup>1</sup>, Mahmood Talkhabi<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Corresponding author: Mahmood Talkhabi, m\_talkhabi@sbu.ac.ir

**Abstract.** Ferroptosis is a type of iron-dependent programmed cell death that closely related to aging. The aim of this study is to investigate the role of ferroptosis in the aging of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). GSE97311 dataset (containing expression data of fetal and adult MSCs) was analyzed and differentially expressed genes (DEGs) were extracted. Then, among them, ferroptosis-related differentially expressed genes (FRDEGs) were determined. In the next step, biological functions, protein-protein interactions, hub genes, upstream regulators, and inflammatory factors related to FRDEGs were analyzed using different bioinformatics methods. According to the analysis, 34 genes were identified as FRDEGs. Analysis of biological functions showed that these genes are mostly involved in oxidoreductase activities, fatty acid synthesis and response to iron ion. Also, the analyzes related to the signaling pathways also showed that these genes are mostly involved in the pathways related to types of cancers as well as fatty acid biosynthesis. According to the analysis, miR-26b-5p was identified as the most important miRNA and LINC00205 and GAS5 as the most important lncRNAs. Hub genes including HMOX1, EZH2, NEDD4L, PTGS2, CDKN2A, ATF3, NOX4, TXNIP, SNCA and MAPK3 were identified as the main genes of ferroptosis related to aging of MSCs. The results showed the possibility of high involvement of FRDEGs and their upstream regulators in inducing inflammation and aging phenotype in MSCs. These findings may provide new clues to improve the function of MSCs and reduce age-related diseases in the future.

**Key words.** mesenchymal stem cells, ferroptosis, aging, inflammation, miRNAs, lncRNAs

Received 15.06.2024/ Revised 24.09.2024/ Accepted 01.12.2024/ Published 21.12.2024

دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۵ / اصلاح: ۱۴۰۳/۰۹/۱۱ / پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱ / انتشار: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

## مقدمه

سلول‌های بنیادی/استرومایی مزانشیمی (Mesenchymal Stem/Stromal Cells; MSCs) پیش‌ساز مشتق شده از مزودرم هستند که دارای یکسری ویژگی‌های خاصی مانند مورفولوژی فیروبلاست-مانند، قدرت چسبندگی به فلاسک و توانایی خودنوزایی هستند و قادرند به سلول‌های استخوانی، چربی و غضروفی تمایز یابند (Dzobo, 2021). MSCs به دلیل داشتن قدرت تعدیل‌کننده ایمنی و ظرفیت بازسازی بافت، سلول‌های پرکاربرد و جذابی در زمینه بالینی و سلول درمانی بشمار می‌آیند. از این رو، با طول عمر و عملکرد این سلول‌ها بسیار مهم است (Jimenez-Puerta et al., 2020). عوامل متعددی مانند افزایش سن می‌تواند بر عملکرد و خواص درمانی این سلول‌ها تأثیر منفی بگذارد؛ به طوری که مشخص شده است که از دست دادن تعداد یا عملکرد این سلول‌ها به دلیل افزایش سن ممکن است تأثیر عمیقی بر ظرفیت بازسازی بدن و بروز انواع بیماری‌های مرتبط با سن داشته باشد (Al-Azab et al., 2022). بنابراین، استفاده از راهکارهایی برای افزایش پتانسیل درمانی MSCs برای هدایت فنوتیپ آن‌ها به سمت خواص درمانی مطلوب بسیار ارزشمند است.

پیری، کاهش یا از دست دادن پیش‌رونده عملکردهای فیزیولوژیکی بدن است که همراه با افزایش سن مشخص می‌شود و ممکن است منجر به بیماری و مرگ شود (Boulestreau et al., 2020). برخلاف موجودات اولیه، مانند پروکاریوت‌ها، جلبک‌ها و برخی از حیوانات ساده که از نظر بیولوژیکی جاودانه هستند، انسان‌ها، حیوانات و قارچ‌ها دچار پیری می‌شوند (Al-Azab et al., 2022). پیری یکی از بزرگترین عوامل خطر برای اکثر بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود، به طوری که حدود دو سوم از میزان مرگ و میر روزانه در سراسر جهان به دلیل بیماری‌های مرتبط با افزایش سن رخ می‌دهد (Al-Azab et al., 2022). بنابراین یافتن راه حلی که بتوان پیری را به تاخیر بیندازد و علائم آن را کاهش دهد، امری ضروری است. کاهش توانایی جمعیت سلول‌های بنیادی بالغ برای تولید مثل و بازسازی، یکی از عوامل اصلی فرآیند پیری انسان به حساب می‌آید (Al-Azab et al., 2022). در این زمینه، MSCs یک رویکرد بزرگ در زمینه سلول درمانی می‌باشند (Al-Azab et al., 2022). مطالعات متعددی وجود دارند که رویکردهای مختلفی را برای حمایت از قدرت MSCs در شرایط درون تنی و برون تنی و جلوگیری از وقوع پیری زودرس که ممکن است قدرت درمانی آن‌ها را مختل کند، ارائه می‌دهند. غلبه بر پیری زودرس MSCs با هدف حفظ توانایی تنظیم ایمنی این سلول‌ها

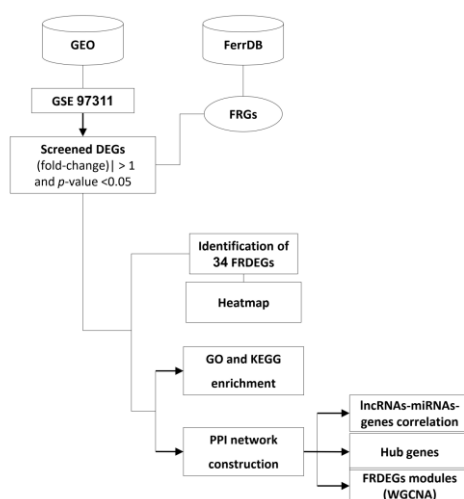
به یک چالش مهم تبدیل شده است؛ چرا که افزایش سن می‌تواند فعالیت‌های حیاتی آن‌ها را متوقف کند (Boulestreau et al., 2020). عوامل متعددی از جمله مسیرهای سیگنال‌دهی مختلف، سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، داروها، ویتامین‌ها و مواد شیمیایی در فرآیند پیری سلولی دخیل هستند (Al-Azab et al., 2022). یکی از عواملی که اخیراً مشخص شده است که ممکن است در پیری سلول نقش داشته باشد، فروپتوز است.

فروپتوز، نوعی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که با پراکسیداسیون لیپیدی وابسته به آهن ( $Fe^{2+}$ ) مشخص می‌شود (J. Liu et al., 2022). فسفولیپیدهایی با اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PL-polyunsaturated fatty acids; PL-) (PUFA) مانند اسید آراشیدونیک، می‌توانند توسط گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) مورد حمله قرار گرفته و به رادیکال‌های آزاد تبدیل شوند (F. Wang et al., 2023). ROS شامل آنیون سوپراکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، رادیکال‌های هیدروکسیل ( $OH^{\cdot}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و اکسیژن منفرد است (Sahoo et al., 2022). منابع سلولی اصلی ROS، متابولیسم میتوکندری و NADPH oxidase در غشای سلولی است (Endale et al., 2023). تولید ROS میتوکندری عمدتاً در طول فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره انتقال الکترون واقع در غشای داخلی میتوکندری رخ می‌دهد (Endale et al., 2023). در صورت بروز اختلال در هموستاز  $Fe^{2+}$  حوضچه‌های حساس آهن در سیتوزول تشکیل می‌شوند (F. Wang et al., 2023). افزایش استرس اکسیداتیو منجر به افزایش ورود  $H_2O_2$  به سیتوزول و واکنش با  $Fe^{2+}$  طی واکنش فنتون ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ ) می‌شود، که نتیجه این واکنش تولید  $OH^{\cdot}$  مضر می‌باشد (Endale et al., 2023). علاوه بر این، آهن  $Fe^{3+}$  تشکیل شده در واکنش فنتون می‌تواند با  $O_2^{\cdot-}$  طی واکنش هابر ویس (Haber-Weiss reaction) واکنش دهد ( $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ ) و مجدداً  $Fe^{2+}$  را که دوباره می‌تواند وارد واکنش فنتون شود، تولید کند (Kavčič et al., 2017).  $OH^{\cdot}$ ، پرواکسیدان بسیار واکنش‌پذیر، به PL-PUFAs غشا حمله کرده و رادیکال پراکسی لیپیدی (PL-PUFA-OOH) را تشکیل می‌دهد (F. Wang et al., 2023). این ترکیب ناپایدار، هیدروژن را از مولکول لیپیدی دیگری انتزاع می‌کند و به هیدروپراکسید لیپیدی (PL-PUFA-OOH) تبدیل و یک رادیکال لیپیدی جدید، که واکنش زنجیره‌ای را ادامه می‌دهد، را نیز تولید می‌کند (Rodencal & Dixon, 2023). PL-PUFA-OOH‌ها منجر به پراکسیداسیون لیپیدی، از بین رفتن

PC12 مورد بررسی قرار دادند (Li et al., 2021). نتایج این تحقیق نشان داد که  $MPP^+$  باعث پیری سلول‌های PC12 از طریق مسیر سیگنالینگ p53/SLC7A11/GPX4 و وابسته به فروپتوز می‌شود (Li et al., 2021). با این حال، مطالعات کمی در مورد نقش فروپتوز بر روی MSCs و پیری این سلول‌ها گزارش شده است.

مطالعه بیوانفورماتیکی حاضر برای پی بردن به نقش فروپتوز در القا پیری و التهاب مرتبط با پیری MSCs صورت گرفت. در این بررسی ژن‌های مرتبط با فروپتوز بدست آمده از پایگاه داده FerrDb و مجموعه داده GSE97311 بدست آمده از پایگاه داده بیان ژنی اُمنیوس (Gene Expression Omnibus: GEO) جهت بدست آوردن ژن‌های با بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز (Ferroptosis-Related Differentially Expressed Genes: FRDEGs) شناسایی شدند. در ادامه، تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی گسترده‌ای از جمله آنالیز عملکردهای زیستی و سیگنال‌دهی، شناسایی miRNA کلیدی و lncRNAهای احتمالی تنظیم کننده و همچنین فاکتورهای التهابی برای شناسایی و عملکرد ژن‌های اصلی صورت گرفت (شکل ۱). نتایج این مطالعه همبستگی مثبتی را بین فروپتوز و پیری MSCs نشان داد.

یکپارچگی غشاء سلولی و در نهایت بروز فروپتوز می‌شود (F. Wang et al., 2023). گلوکاتیون پراکسیداز ۴ (GPX4)، از طریق خنثی کردن PL-PUFA-OOH، می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدی و فروپتوز جلوگیری کند (F. Wang et al., 2023). این احتمال وجود دارد که فروپتوز در روند پیری و بیماری‌های مرتبط با افزایش سن نقش دارد (Coradduzza et al., 2023). تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که از دست دادن هموستاز آهن می‌تواند عملکرد سلولی را کاهش دهد و منجر به القای فروپتوز و پیری شود (Tian et al., 2022). بررسی‌های اخیر تأثیر فروپتوز در پیری سلول‌ها را گزارش داده‌اند. در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های اپیتلیال عدسی (Lens Epithelial Cells: LECs) افراد پیر انجام شد، محققین دریافتند که القا کننده‌های فروپتوز از جمله ROS، پراکسیداسیون لیپیدی و  $Fe^{2+}$  در این سلول‌ها افزایش یافتند (Wei et al., 2021). با توجه به نتایج این مطالعه، مشخص شد که فروپتوز می‌تواند باعث پیری و آسیب LECs و بروز آب مروارید وابسته به سن (Age-related cataract) در افراد شود (Wei et al., 2021). در مطالعه دیگری که بر روی بیماری پارکینسون (Parkinson's disease: PD) صورت گرفت، تأثیر ۱-متیل-۴-فنیل پیریدینیوم ( $MPP^+$ ) را بر پیری سلول‌های



**شکل ۱- نمودار فلوچارت.** GEO: پایگاه داده ژن بیان اُمنیوس؛ DEGs: ژن‌های دارای بیان افتراقی؛ FRDEGs: ژن‌های دارای بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز؛ PPI: تعامل پروتئین-پروتئین؛ GO: هستی شناسی ژن؛ KEGG: کیوتو دایره المعارف ژن‌ها و ژنوم‌ها؛ lncRNAs: RNAهای طولانی غیر کد کننده؛ miRNAs: RNAهای کوچک غیر کد کننده؛ WGCNA: تجزیه و تحلیل شبکه هم بیان ژن وزنی.

**Figure 1.** Flowchart diagram. GEO: gene expression omnibus database; DEGs: differentially expressed genes; FRDEGs, ferroptosis-related differentially expressed genes; PPI: protein-protein interaction; GO: Gene Ontology; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; lncRNAs: long non-coding RNAs; miRNAs: microRNAs; WGCNA: weighted gene co-expression network analysis.

## مواد و روش‌ها

## اطلاعات داده ریز آرایه (Microarray)

مجموعه داده مورد استفاده در این مطالعه از پایگاه داده GEO به آدرس (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) به دست آمد. مجموعه داده ریز آرایه با شماره دسترسی GSE97311 برای به دست آوردن ژن‌های دخیل در پیری MSCs تجزیه و تحلیل شدند. این مجموعه داده مربوط به مقایسه MSCs از اهداکنندگان جنین و بالغ است. در ادامه ژن‌های مرتبط با فروپتوز، از جمله محرک‌های فروپتوز، سرکوبگرهای فروپتوز، نشانگرهای فروپتوز و ژن‌های طبقه‌بندی‌نشده، از پایگاه داده آنالین FerrDb (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current>) به دست آمدند.

## تعیین ژن‌های دارای بیان افتراقی و ژن‌های دارای بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز

ابزار تجزیه و تحلیل آنالین GEO2R از پایگاه داده (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) برای غربالگری ژن‌های دارای بیان افتراقی (Differentially Expressed Genes; DEGs) استفاده شد و فیلترهای  $|\log FC| > 1$  و  $P \text{ value} < 0.05$  به عنوان معیارهای شناسایی DEGs مورد استفاده قرار گرفتند. ژن‌های دارای بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز (FRDEGs) نیز از طریق اشتراک DEGs مجموعه داده GSE97311 با ژن‌های فروپتوزی بدست آمده از پایگاه داده FerrDb با استفاده از نمودار ون (Venn diagram) مربوط به ابزار آنالین SRplot (<https://www.bioinformatics.com.cn/en>) به دست آمد. نمودار آتشفشان (Volcano plot) و نقشه حرارتی (DEGs hierarchical cluster heatmap) به طور جداگانه توسط پکیج "ggplot2" زبان برنامه نویسی R و SRplot به دست آمد تا به طور مستقیم تفاوت بیان ژن را منعکس کنند.

## تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، عملکردهای زیستی و مسیرهای سیگنال دهی FRDEGs

برای تجزیه و تحلیل برهمکنش پروتئین-پروتئین (Protein-Protein Interaction: PPI)، پایگاه داده STRING (<http://string-db.org>) استفاده شد که اطلاعات برهمکنش تجربی و پیش‌بینی شده بین دو یا چند پروتئین را ارائه می‌دهد. ضریب اطمینان بر روی  $0.4 < \text{تنظیم}$  و گونه homo sapiens برای نوع گونه انتخاب گردید، سپس PPI تشکیل و در ادامه نتایج تجزیه و تحلیل STRING برای تجسم نتایج به نرم افزار Cytoscape نسخه ۳.۱۰.۱

(<https://cytoscape.org/download.html>) ارسال شد. همچنین تجزیه و تحلیل عملکردهای زیستی و آنالیز مسیرهای سیگنال-دهی FRDEGs به ترتیب توسط ژن هستی‌شناسی (Gene Ontology; GO) یک سیستم استاندارد جهانی برای طبقه‌بندی عملکردهای ژن، متشکل از سه دسته: فرآیند بیولوژیکی (Biological Process; BP)، جزء سلولی (Cellular Component; CC) و عملکرد مولکولی (Molecular Function; MF) و دایره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KEGG) توسط ابزار آنالین SRplot انجام شد.

## شناسایی ماژول اصلی و ژن‌های هاب

ماژول اصلی در شبکه PPI با استفاده از تجزیه و تحلیل شبکه هم بیان ژن وزنی (Weighted Gene Co-expression Network Analysis; WGCNA) زبان برنامه نویسی R تعیین شد. WGCNA یک ابزار بیوانفورماتیک سیستماتیک برای شناسایی دسته‌ها یا ماژول‌های ژن‌های بسیار مرتبط با یکدیگر است که به طور گسترده در تشخیص بیومارکرهای مرتبط با انواع بیماری‌ها مانند سرطان‌ها، بیماری‌های عصبی و بیماری‌های ایمنی استفاده شده است (Y. Wang et al., 2022). در مرحله بعد ۱۰ ژن هاب با استفاده از پلاگین cytoHubba موجود در Cytoscape و با استفاده از الگوریتم حداکثر مرکزیت دسته (Maximal Clique Centrality; MCC)، شناسایی شدند.

## شناسایی RNAهای طولانی غیر کد کننده و

## microRNAهای تنظیم کننده FRDEGs

RNAهای طولانی غیر کد کننده (Long non-coding RNAs; lncRNAs) مطالعه حاضر با استفاده از دو پایگاه داده miRNet و starBase بدست آمد (Jing et al., 2020). MiRTarBase واقع در ابزار آنالین Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr>) نیز برای به دست آوردن microRNAها (miRNAs) که در تنظیم FRDEGs نقش دارند، استفاده شد. MiRTarBase یک پایگاه داده است که اطلاعاتی در مورد تعاملات بین miRNAها و ژن‌های هدف ارائه می‌دهد.

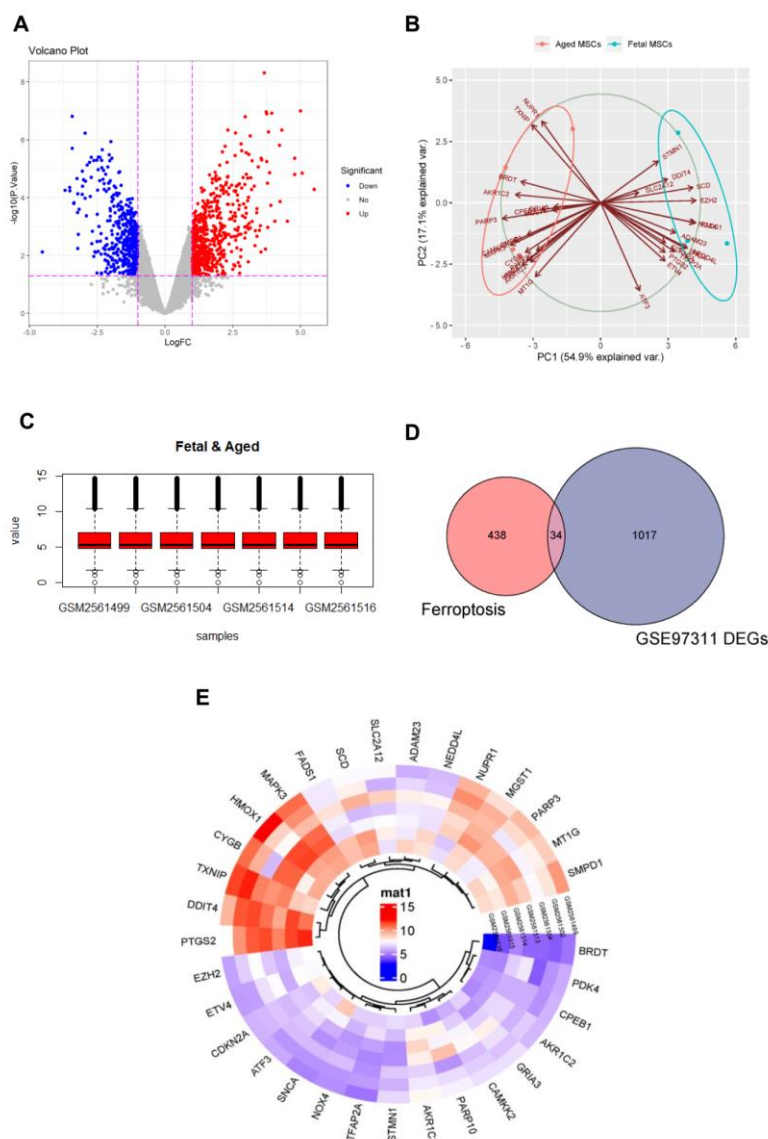
## نتایج

## شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی مرتبط با فروپتوز

نمودار آتشفشانی برای مجموعه داده GSE97311 رسم شد تا ژن‌هایی که دچار افزایش و کاهش بیان شده‌اند را نشان دهد.

ژن‌های فروپتوزی اشتراک گرفته شد (شکل ۲ D) و مشخص شد که GSE97311 دارای ۳۴ ژن مشترک با فروپتوز می‌باشد و این ژن‌ها به عنوان FRDEGs مطالعه ما در نظر گرفته شدند. در ادامه نقشه حرارتی مجموعه داده FRDEGs برای نشان دادن تفاوت بیان FRDEGs ترسیم شد که بر این اساس رنگ قرمز و آبی به ترتیب نشان دهنده افزایش و کاهش بیان ژن‌ها می‌باشد (شکل ۲ E).

تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (Principal component analysis) نشان داد که دو گروه «MSCs پیر» و «MSCs جنینی» به طور قابل توجهی از هم متمایز هستند که با رنگ‌های مختلف مشخص شده‌اند. Box plot نیز می‌تواند نشانه‌ای از تقارن و وجود نقاط پرت باشد که نتایج نشان داد که توزیع داده‌ها بصورت نرمال بوده است (شکل ۲ A-B-C). برای یافتن DEGs، FRDEGs مجموعه داده با



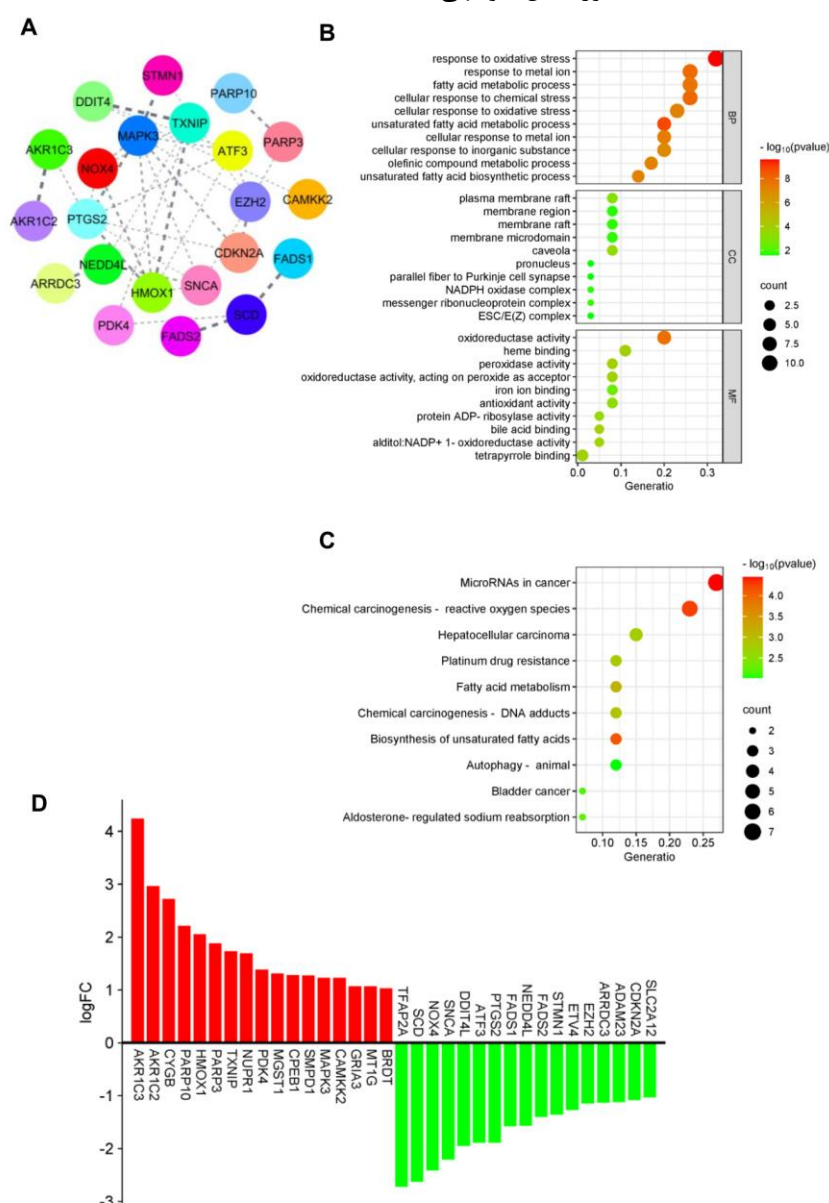
**شکل ۲- تجزیه و تحلیل بیان متفاوت مجموعه داده GSE97311 و FRDEGs بدست آمده.** (A-B) نمودار آتشفشانی، برای تجزیه و تحلیل ژن‌های بیان شده متفاوت که نقاط قرمز و آبی به ترتیب نشان‌دهنده ژن‌هایی که دچار افزایش و کاهش بیان شدند. تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) که از دو مؤلفه اصلی (PC1 و PC2) تشکیل شده و درصد مشخصی از واریانس داده‌ها را توضیح می‌دهد. جهت و طول هر فلش نشان دهنده تأثیر بیان ژن بر مؤلفه‌های اصلی است. (C-D) نمودار جعبه‌ای (Box plot) که نرمال بودن داده‌ها را نشان می‌دهد (توزیع داده‌ها منظم بود) و نمودار ون همپوشانی بین DEGs مجموعه داده و ژن‌های فروپتوز را نشان می‌دهد. (E) نقشه حرارتی (Heatmap) برای نشان دادن بیان ۳۴ FRDEGs در MSCs پیر و جوان در گروه‌های مختلف؛ رنگ قرمز و آبی به ترتیب نشان دهنده افزایش و کاهش بیان ژن‌ها.

**Figure 2.** Differential expression analysis of GSE97311 dataset and obtained FRDEGs. (A-B) Volcanic plot, for the analysis of differentially expressed genes, where the red and blue points indicate the genes that experienced increased and decreased expression, respectively. Principal component analysis (PCA), which consists of two principal components (PC1 and PC2) and explains a certain percentage of the variance of the data. The direction and length of each arrow indicates the effect of gene expression on the main components. (C-D) Box plot showing the normality of the data (the distribution of the data was regular) and the Venn diagram showing the overlap between the DEGs of the data set and the ferroptosis genes. (E) Heatmap to show the expression of 34 FRDEGs in old and young MSCs in different groups; Red and blue colors indicate the increase and decrease of gene expression, respectively.

در فعالیتهای اکسیدوردوکتازی و آنتی اکسیدانی و همچنین اتصال یون آهن مشارکت دارند (شکل ۳ B). در ادامه، از آنالیز KEGG جهت نشان دادن مسیرهای سیگنال دهی FRDEGs استفاده کردیم. نتایج این تجزیه و تحلیل نشان داد که این ژن‌ها به طور قابل توجهی در مسیرهای سیگنال دهی مرتبط با انواع سرطان‌ها و بیوسنتز اسیدهای چرب نقش دارند (شکل ۳ C). تفاوت بیان ژن ۳۴ FRDEGs نیز بر اساس logFC مشخص شد. طبق این شکل نصف ژن‌ها افزایش بیان و نصف دیگر نیز کاهش بیان داشتند (شکل ۳ D).

**تجزیه و تحلیل شبکه PPI، GO و KEGG مرتبط با FRDEGs**

شبکه PPI برهمکنش FRDEGs با یکدیگر را نشان می‌دهد و ژن‌هایی که برهمکنش شدیدتری با یکدیگر دارند با خطوط ضخیم‌تری بهم متصل شدند (شکل ۳ A). تجزیه و تحلیل GO برای BP نشان داد که FRDEGs بیشتر در پاسخ به استرس اکسیداتیو، سنتز اسیدهای چرب غیر اشباع و پاسخ به یون فلز نقش دارند. تجزیه و تحلیل CC نشان داد که FRDEGs در کائوولا و غشای سلولی و عمدتاً در رفته‌ها (plasma membrane raft) قرار دارند. در همین راستا، نتایج MF تجزیه و تحلیل GO نیز نشان داد که FRDEGs به طور قابل توجهی



**شکل ۳- تجزیه و تحلیل FRDEGs.** (A) PPI مربوط به FRDEGs. (B-C) تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO و KEGG مربوط به FRDEGs (BP). (D) مقایسه تفاوت بیان FRDEGs با استفاده از logFC. فرایند بیولوژیکی، (CC) جزء سلولی و (MF) عملکرد مولکولی. (D) مقایسه تفاوت بیان FRDEGs با استفاده از logFC.

**Figure 3.** Analysis of FRDEGs. (A) PPI corresponding to FRDEGs. (B–C) GO and KEGG enrichment analysis of FRDEGs. (BP) biological process, (CC) cellular component and (MF) molecular function. (D) Comparison of differential expression of FRDEGs using logFC.

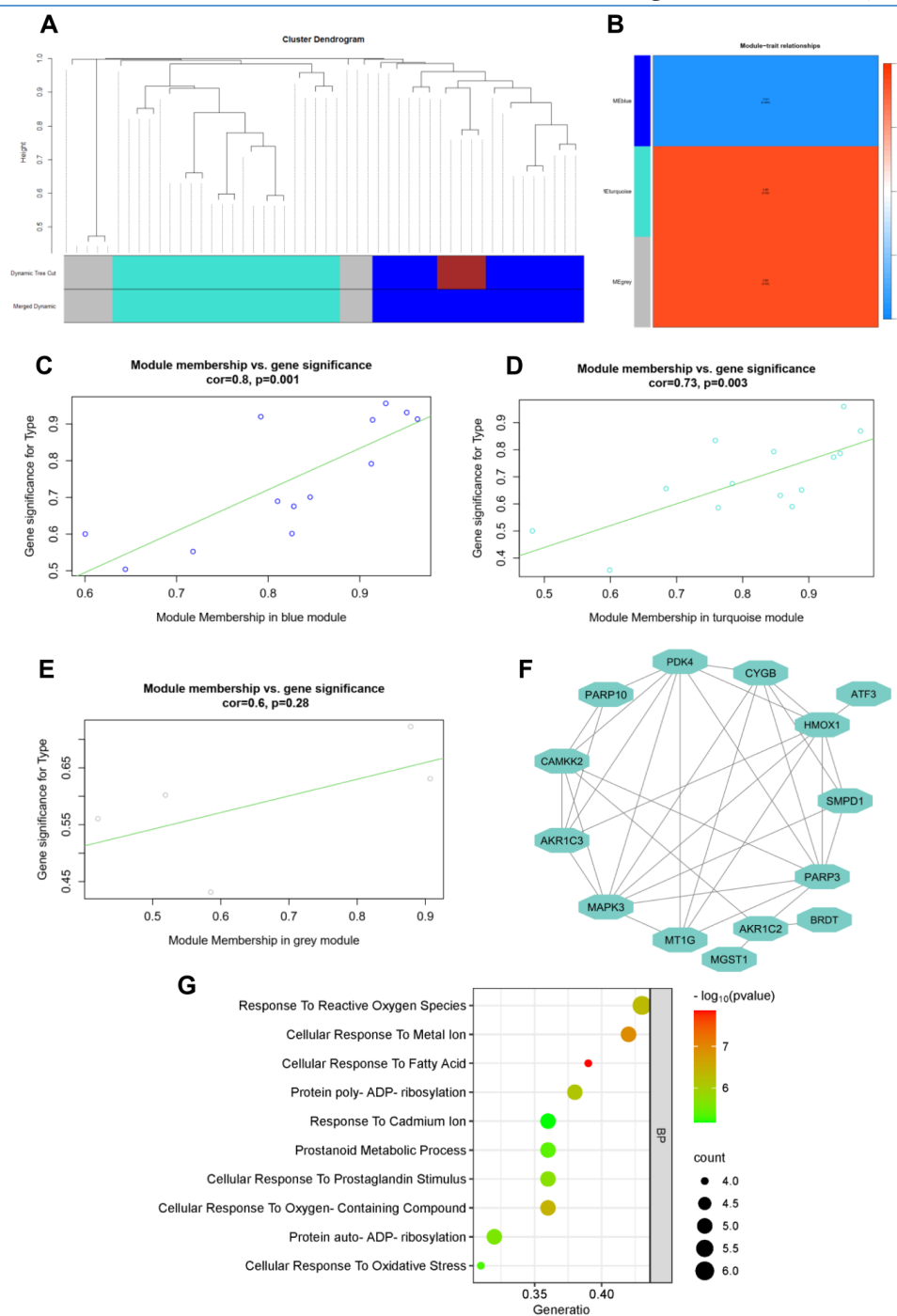
## ماژول اصلی FRDEGs

طبق نتایج بدست آمده از آنالیز Cluster Dendrogram، در نهایت سه ماژول اصلی شناسایی شد (شکل ۴ A). نقشه حرارتی نیز همبستگی بین ژن‌های هر ماژول و پیری MSCs را نشان می‌دهد (شکل ۴ B). در ادامه جهت مشخص شدن ماژول اصلی، آنالیزهای نقشه حرارتی و Module membership vs. Gene significance صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده از این آنالیزها، ماژول آبی نتایج متفاوتی را در دو آنالیز نشان داده و به همین خاطر نمی‌تواند بعنوان ماژول اصلی تایید شود؛ این در حالی است که ماژول فیروزه‌ای نتایج مشابه و همبستگی مثبتی را با بیماری مد نظر ما، پیری MSCs، نشان داده و بعنوان ماژول اصلی انتخاب گردید (شکل ۴ C-D-E). در ادامه برای نشان دادن تعامل و عملکرد زیستی ۱۴ ژن ماژول اصلی، به ترتیب از شبکه پروتئینی و GO استفاده شد (شکل ۴ F-G). طبق آنالیز صورت گرفته این ژن‌ها در پاسخ به ROS، یون آهن و اسیدهای چرب بیشترین نقش را دارند.

## تجزیه و تحلیل شبکه مرتبط با ژن‌های هاب و GO

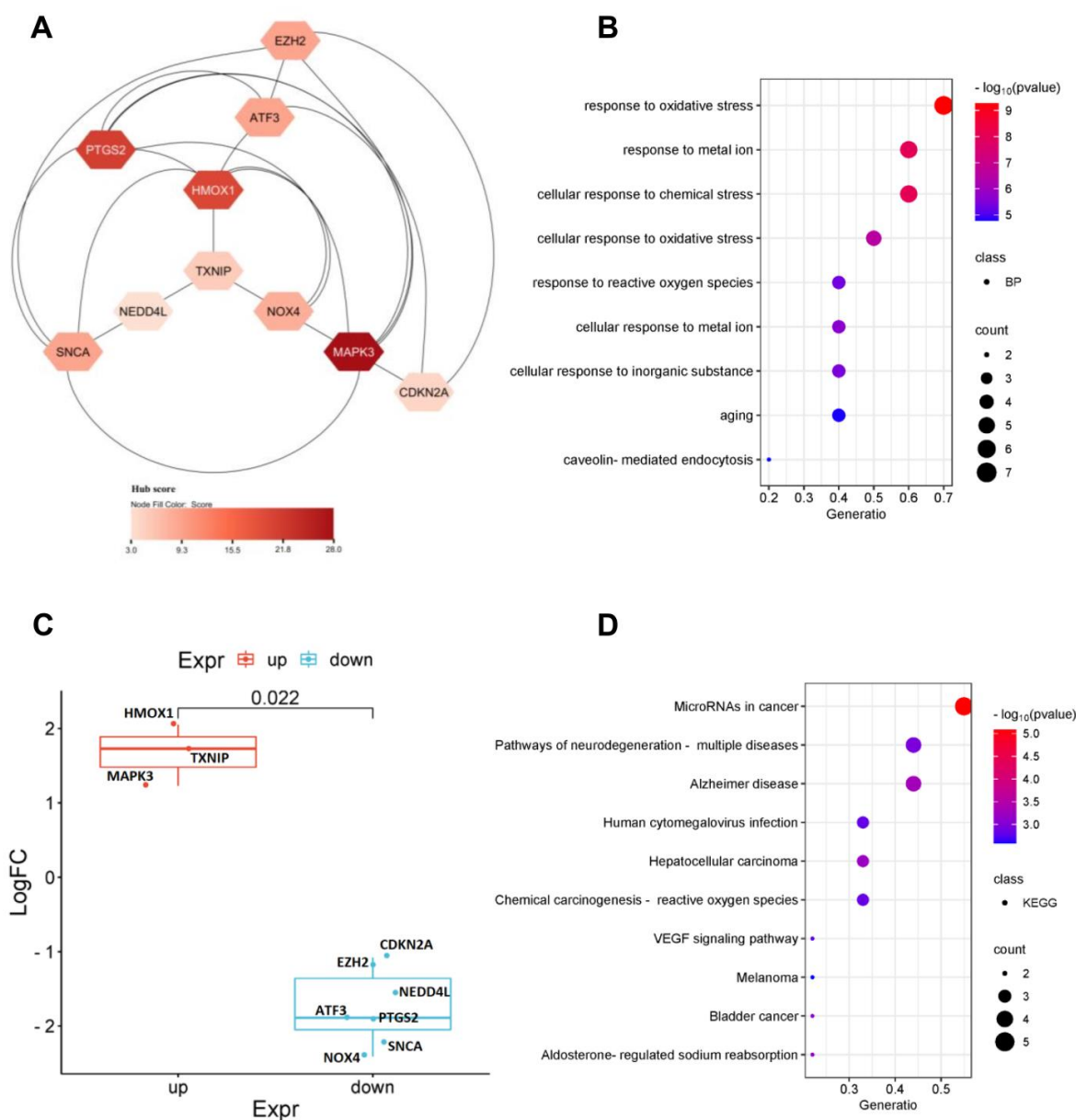
## KEGG مرتبط با ژن‌های هاب

بر طبق آنالیزهای انجام شده ۱۰ ژن هاب شامل HMOX1، NOX4، ATF3، CDKN2A، PTGS2، NEDD4L، EZH2، TXNIP، SNCA و MAPK3 شناسایی شدند (شکل ۵ A). همانطور که در شکل مربوطه مشخص است MAPK3 دارای بیشترین برهمکنش با سایر ژن‌ها بوده و بعنوان مرکزی‌ترین ژن در نظر گرفته می‌شود. برای تعیین عملکردهای زیستی و مسیر سیگنال‌دهی ژن‌های هاب نیز از آنالیزهای GO و KEGG استفاده کردیم. تجزیه و تحلیل GO نشان داد که ژن‌های هاب بیشتر در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو، یون فلز و در پیری نقش دارند (شکل ۵ B). در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل آنالیز KEGG نشان داد که این ژن‌ها به طور قابل توجهی در انواع سرطان‌ها مانند سرطان مثانه و سایر بیماری‌های دیگر مرتبط با پیری درگیر هستند (شکل ۵ C) مقایسه بیان ژن‌های هاب نیز بر اساس logFC نشان داده شد و مشخص شد که HMOX1 و NOX4 به ترتیب بیشترین و کمترین بیان را در بین ژن‌های هاب داشتند (شکل ۵ D).



**شکل ۴- شناسایی ماژول کلیدی و بررسی عملکردهای زیستی.** (A) دندروگرام خوشه‌ای (cluster dendrogram) و نمایش رنگی ماژول‌های شبکه هم بیان. (B) نقشه حرارتی همبستگی بین ژن‌های هر ماژول و پیری MSCs. بر این اساس ماژول فیروزه‌ای (turquoise) بالاترین Pvalue و همبستگی را با پیری MSCs نشان داد. (C-D-E) نمودار پراکندگی (Scatter plot) مربوط به همبستگی ماژول‌ها و پیری MSCs. برای یافتن ژن‌های هاب مرتبط با ویژگی القا پیری MSCs، ابتدا اتصال داخلی ژن‌ها و ماژول محاسبه می‌شود که موقعیت ژن را در ماژول اندازه‌گیری می‌کند. هرچقدر همبستگی بین Module membership (MM) و Gene significance (GS) بیشتر باشد، ماژول با ویژگی پیری MSCs همبستگی مثبت‌تری دارد. بر این اساس ماژول فیروزه‌ای بعنوان ماژول اصلی انتخاب شد. (F-G) شبکه برهمکنش PPI و تجزیه و تحلیل فرآیند زیستی مربوط به ژن‌های ماژول اصلی.

**Figure 4.** Identification of key module and investigation of biological functions. (A) Cluster dendrogram and color display of co-expression network modules. (B) Heatmap of the correlation between the genes of each module and the aging of MSCs. Based on this, the turquoise module showed the highest Pvalue and correlation with the aging of MSCs. (C-D-E) Scatter plot related to correlation of modules and aging of MSCs. To find hub genes related to MSCs senescence-inducing feature, first the internal connection of genes and module is calculated, which measures the position of the gene in the module. The higher the correlation between module membership (MM) and gene significance (GS), the more positive correlation the module has with the aging characteristic of MSCs. Based on this, turquoise module was chosen as the main module. (F-G) PPI interaction network and biological process analysis related to main module genes.



**شکل ۵-** تجزیه و تحلیل برهمکنش و عملکردهای بیولوژیکی ژن‌های هاب. (A) شبکه PPI ژن‌های هاب و تعامل بین آن‌ها. (B-C) تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO مربوط به BP و KEGG ژن‌های هاب. (D) مقایسه بیان ژن‌های هاب بر اساس  $\log_{FC}$ .

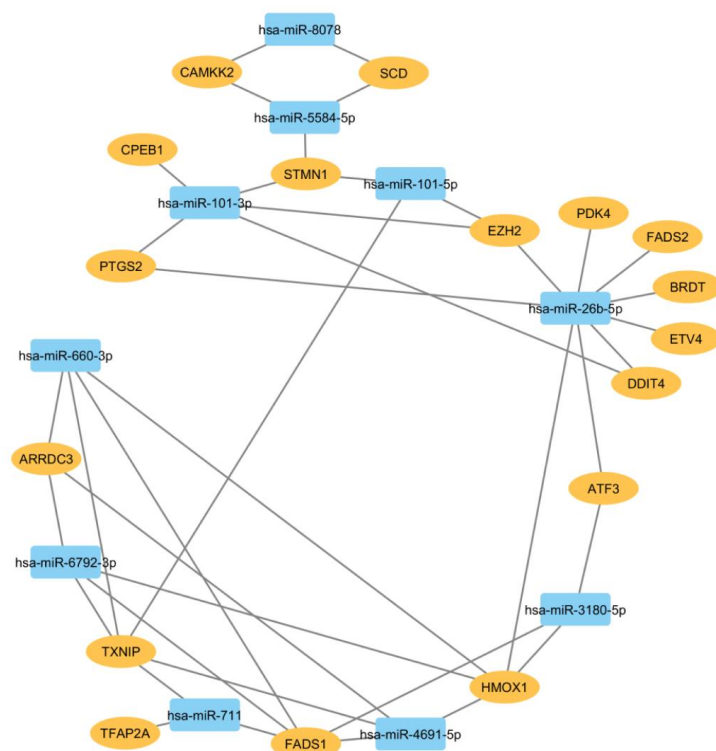
**Figure 5.** Interaction analysis and biological functions of hub genes. (A) PPI network of hub genes and interaction between them. (B–C) GO enrichment analysis of BP and KEGG hub genes. (D) Comparison of the expression of hub genes based on  $\log_{FC}$ .

شناسایی lncRNAها تنظیم کننده‌های بالادست miRNAها شناخته می‌شوند که از طریق اثر بر بیان آن‌ها، بر بیان ژن‌های هدف تاثیر می‌گذارند. در مطالعه حاضر ۱۲ lncRNA بعنوان تنظیم کننده-های بالادست miR-26b-5p شناسایی شدند؛ DLGAP1-، DLX6-AS1، LINC00240، LINC00205، OIP5-، MALAT1، GAS5، SNHG6، HCG11، AS1، WASIR2، SNHG5، AS1 و LINC00847 (Jing et al., 2020). سپس شبکه برهمکنش lncRNAها با miR-26b-5p و ژن‌های هدفش ترسیم شد (شکل ۶ B).

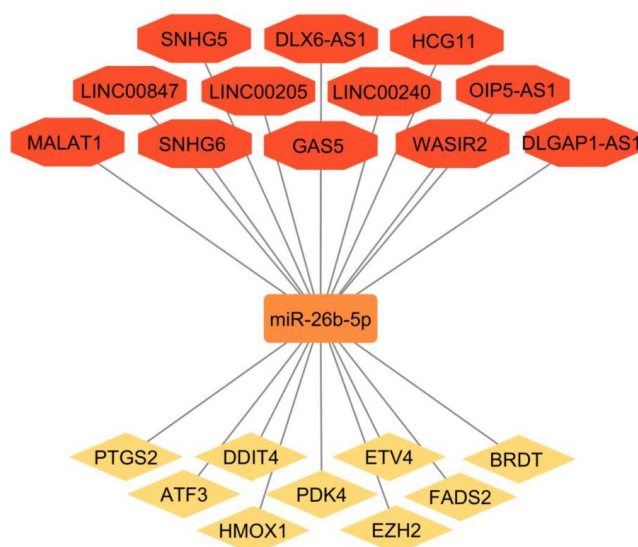
### شناسایی lncRNAها و miRNAهای تنظیم کننده FRDEGs

طبق آنالیزهای صورت گرفته hsa-miR-101-، hsa-miR-711-، hsa-miR-4691-، hsa-miR-101-3p، hsa-miR-8078-5p، hsa-miR-5584-5p، hsa-miR-6792-3p، hsa-miR-3180-5p و hsa-miR-660-3p بعنوان ۱۰ miRNA برتر که ژن‌های بیشتری را هدف قرار می‌دهند، شناسایی شدند (شکل ۶ A). در بین موارد شناسایی شده hsa-miR-26b-5p بیشتر از بقیه با FRDEGs برهمکنش داشته و احتمالاً می‌تواند بعنوان miRNA کلیدی در نظر گرفته شود.

A



B



شکل ۶- فاکتورهای تنظیم کننده بالا دست FRDEGs. (A) شبکه برهمکنش miRNAs با FRDEGs. (B) شبکه برهمکنش lncRNAs-miRNA-genes.

**Figure 6.** Upstream regulatory factors of FRDEGs. (A) Interaction network of miRNAs with FRDEGs. (B) Interaction network of lncRNAs-miRNA-genes

ایفا می‌کند. پیری سلول با از دست دادن پتانسیل تکثیر سلول و بیان یک فنوتیپ پیش التهابی تحت عنوان فنوتیپ ترشحی مرتبط با پیری (Senescence-Associated Secretory Phenotype; SASP) مشخص می‌شود (Boulestreau et al., 2020). SASP شامل سیتوکین‌ها و کموکاین‌های پیش التهابی، پروتئازهای آسیب‌رسان به بافت‌ها و همچنین فاکتورهای رشد

کاهش عملکرد بافت‌ها، کیفیت زندگی و توانایی مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف از جمله تظاهرات اصلی پیری می‌باشند (Boulestreau et al., 2020). پیری فرآیند پیچیده و چندعاملی می‌باشد که در وقوع آن پیری سلول نقش مهمی را

بحث

دهی نشان می‌دهد که اختلال در تنظیم این ژن‌های فروپتوزی ممکن است از طریق مکانیسم‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو و متعاقباً آسیب DNA و سایر اندامک‌ها، پیری ناشی از استرس را در MSCs القا کند.

در مرحله بعد جهت به دست آوردن ژن‌های فروپتوز کلیدی مؤثر در پیری MSCs، ژن‌های هاب شامل EZH2، HMOX1، NOX4، ATF3، CDKN2A، PTGS2، NEDD4L، TXNIP، SNCA و MAPK3 شناسایی شدند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل فرآیندهای زیستی و مسیرهای سیگنال‌دهی، مشخص شد که ژن‌های هاب بیشتر در استرس اکسیداتیو و پیری نقش دارند. طبق مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که سطوح ROS و استرس اکسیداتیو ناشی از آن در MSCs پیر افزایش می‌یابد (Al-Azab et al., 2022). در همین راستا در مطالعه‌ای که توسط یان و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که درمان با ملاتونین از MSCs در برابر استرس اکسیداتیو و پیری مرتبط با آن محافظت می‌کند که در واقع این مطالعه به خوبی ارتباط بین استرس اکسیداتیو و پیری را برجسته می‌کند (Yun et al., 2018). از طرفی تجزیه و تحلیل مسیرهای سیگنال‌دهی نیز نشان داد که این ژن‌ها بیشتر با بیماری‌های مرتبط با پیری مانند سرطان و آلزایمر ارتباط دارند و اختلال در این ژن‌ها می‌تواند در بروز این بیماری‌ها در افراد مسن کمک کند.

RNAهای غیر کد کننده (Non-coding RNAs; ncRNAs) گروه متنوعی از مولکول‌های RNA هستند که از ژنوم رونویسی می‌شوند، اما پروتئین‌ها را کد نمی‌کنند (Bridges et al., 2021). miRNAs دسته‌ای از ncRNAs کوچک هستند که نقش حیاتی را در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی ایفا می‌کنند (Ala, 2020). مشخص شده است که رابطه نزدیکی بین متابولیسم آهن، miRNAها و فروپتوز وجود دارد؛ بطوریکه نشان داده شده است که miRNAها می‌توانند روند فروپتوز را تعدیل و بیان ژن‌های هدف درگیر در متابولیسم آهن را تنظیم کنند (Zhang et al., 2024). در مطالعه حاضر طی آنالیزهای صورت گرفته مشخص شد miR-26b-5p با ژن‌های فروپتوزی بیشتری شامل HMOX1، PDK4، DDIT4، FADS2، PTGS2، ETV4، BRDT و EZH2 تعامل دارد و می‌تواند فرآیندهای سلولی و مسیرهای مرتبط با آن‌ها را در ارتباط با پیری MSCs تحت تأثیر قرار دهد. FADS2 در متابولیسم اسیدهای چرب غیر اشباع (R. Liu et al., 2020)، DDIT4 در تنظیم رشد و بقای سلول در شرایط استرس (Zhidkova et al., 2022)، PDK4 در تنظیم متابولیسم

است که همگی در تغییر ریزمحیط بافت و از دست دادن هموستاز بافت دخیل هستند (Boulestreau et al., 2020). با توجه به اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری MSCs، این سلول‌ها پتانسیل لازم برای حفظ هموستاز بافتی و بازسازی یا ترمیم بافت را از خود نشان می‌دهند (Eiro et al., 2022). مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات مرتبط با سن در MSCs با عملکردهای ضعیف این سلول‌ها مرتبط هستند (Choudhery, 2021). از دست دادن سلول‌های بنیادی عملکردی لازم برای حفظ هموستاز بافتی احتمالاً مستقیماً به فرآیند پیری کمک می‌کند (J. Liu et al., 2020). بنابراین یک استراتژی درمانی برای بهبود پیری می‌تواند جوان سازی یا جایگزینی MSCs پیر باشد (J. Liu et al., 2020). جالب توجه است، چندین مطالعه نشان می‌دهد که تغییرات مرتبط با سن در MSCs را می‌توان معکوس کرد؛ بعنوان مثال، مطالعه‌ای نشان داد که افزودن ML141، مهار کننده انتخابی چرخه تقسیم سلولی ۴۲ (Cdc42)، به MSCs پیر، رشد سلولی، چسبندگی پلاستیک و زنده ماندن آن‌ها را افزایش و همچنین نشانگرهای پیری مانند p16، p21، p53 را کاهش می‌دهد و در عین حال تعادل بین سایتوکین‌های پیش التهابی و ضد التهابی را بازیابی می‌کند (Chaker et al., 2018). در همین راستا یک استراتژی درمانی جدید دیگر می‌تواند مهار فروپتوز باشد. فروپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلولی است که مشخصه اصلی آن پراکسیداسیون شدید لیپیدی وابسته به آهن است (Lin et al., 2024). مطالعات بسیاری اثر فروپتوز را در بروز پیری و بیماری‌های مرتبط با آن ثابت کرده‌اند (Coradduzza et al., 2023). از این‌رو، برای پی بردن به نقش فروپتوز در پیری MSCs، در مطالعه بیوانفورماتیک حاضر ژن‌های فروپتوز را در MSCs پیر بررسی کردیم. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته، ۳۴ ژن اصلی مرتبط با فروپتوز شناسایی شدند. به منظور درک نقش این ژن‌ها در پیری MSCs، ما انواع مختلفی از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک را انجام دادیم. آسیب DNA یک عامل القایی کلیدی پیری سلول ناشی از عوامل فیزیکی (اشعه) یا شیمیایی مانند ROS است (Boulestreau et al., 2020). عدم تعادل بین تولید ROS و حذف آن‌ها توسط آنتی اکسیدان‌ها، که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود، و همچنین اختلال متابولیسم آهن و تجمع بیش از حد یون‌های آهن که منجر به تولید ROS می‌شود، نه تنها منجر به آسیب DNA می‌گردد، بلکه به آسیب پروتئین و اختلال عملکرد میتوکندری و در نهایت به از دست دادن هموستاز و پیری سلول نیز می‌انجامد (Boulestreau et al., 2020). بررسی عملکردهای بیولوژیکی و مسیرهای سیگنال-

گلوکز، اسیدهای چرب و هموستاز (X. Wang et al., 2021)، HMOX در تجزیه هم به بلی روبین، مونوکسید کربن و آهن (Puentes-Pardo et al., 2020)، PTGS2 در التهاب (Martín-Vázquez et al., 2023)، ETV4 در تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی (DeSalvo et al., 2021)، ATF3 در پاسخ به استرس و التهاب (B. Wang et al., 2022)، BRDT در بازسازی کروماتین و تنظیم بیان ژن (Her et al., 2021) و EZH2 در تنظیم اپی ژنتیک و بیان ژن (J. Wang et al., 2021) نقش دارند. نشان داده شده است که miR-26b-5p چندین فرآیند پاتولوژیک مهم از جمله تکثیر، رگزایی، التهاب و ترمیم آسیب را تنظیم می کند (L. Liu et al., 2022) و به طور خاص در چندین مطالعه مشخص شده است که یکی از مهمترین miRNAهای درگیر در تنظیم فروپتوز نیز می باشد (Feng et al., 2023). بعنوان مثال نشان داده شده است که miR-26b-5p در القا فروپتوز در انواع بیماری های قلبی عروقی مانند فشار خون ریوی (Pulmonary Hypertension; PH) از طریق اختلال متابولیسم آهن نقش دارد (Feng et al., 2023). تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی صورت گرفته بر روی بیماران مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد (Acute Myocardial Infarction; AMI) نیز نشان داده است که miR-26b-5p با هدف قرار دادن خانواده حامل املاح ۷ عضو ۱۱ (Solute Carrier family 7 member 11: SLC7A11) باعث القا فروپتوز و بروز نارسایی قلبی می شود (Li et al., 2023). SLC7A11 واسطه فعالیت آنتی پورتر سیستمین/گلوتامات است که نقش اساسی در جذب سیستمین و متعاقبا سنتر گلوتامین و GPX4 و در نهایت مقاومت به فروپتوز ایفا می کند (Li et al., 2023). علاوه بر این، مطالعه دیگری همبستگی مثبتی را بین اضافه بار آهن و متابولیسم گلوکز مختل شده نشان می دهد (Zhang et al., 2024). بطور جالبی مشخص شده است که بیماران که دچار مشکل عدم تحمل گلوکز هستند، افزایش بیان miR-26b-5p را همراه با سطح بالای فریتین سرم نشان دادند (Zhang et al., 2024). افزایش miR-26b-5p می تواند منعکس کننده اختلالات متابولیسم گلوکز پس از فروپتوز باشد. اخیرا مطالعات دیگری نقش miR-26b-5p را در القا پیری نیز نشان داده اند. برای مثال یافته های مطالعه ای نشان می دهد که آسپورین، بعنوان یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی، نقش اساسی را در پیری سلول های غضروفی و پیشرفت بیماری استئوآرتریت ایفا می کند (L. Liu et al., 2022). مشخص شده است که آسپورین توسط miR-26b-5p تنظیم می شود و با مهار مسیر TGF- $\beta$ 1-Smad2 پیری و دژنراسیون سلول های غضروف را تسریع و

تشدید می بخشد (L. Liu et al., 2022). lncRNAs RNAهای غیر کد کننده پروتئینی هستند که توسط ژنوم یوکاریوتی رونویسی می شوند (Bridges et al., 2021). lncRNAs با عمل بعنوان تنظیم کننده های بالا دست miRNA یا رقابت برای مکان های اتصال بر روی mRNAها، در پردازش، بلوغ و پایداری mRNAها نقش دارند (Sebastian-delaCruz et al., 2021). برای بررسی بیشتر عواملی که می توانند بیان ژن های فروپتوزی را تحت تاثیر قرار دهند، ما علاوه بر miR-26b-5p، تنظیم کننده های آن یعنی lncRNAها را نیز مورد بررسی قرار دادیم. طبق مطالعات قبلی ۱۲ lncRNA اصلی شامل LINC00205، DLX6-AS1، LINC00240، MALAT1، GAS5، SNHG6، HCG11، DLGAP1-AS1، WASIR2، SNHG5، OIP5-AS1 و LINC00847 شناسایی شدند. در این بین بر اساس مطالعاتی که انجام شده بین LINC00205 و یا GAS5 و miR-26b-5p و تاثیر آنها بر تمایز و احتمالا پیری MSCs ارتباطی وجود دارد. گزارش های متعددی نقش miR-26b-5p را در بیماری های استخوانی نشان داده اند و مشخص شده است که پیری سلول های غضروفی، تخریب غضروف و پیشرفت آرتروز را تسریع می کند (L. Liu et al., 2022). علاوه بر این، miR-26b-5p در طول استخوان سازی MSCs انسانی (hMSCs) تنظیم مثبت شده و در تمایز استخوانی این سلول ها نقش دارد (H. Wang et al., 2023). پوکی استخوان (Osteoporosis: OP) یک بیماری شایع استخوانی است که با کاهش استحکام استخوان مشخص می شود (H. Wang et al., 2023). شواهد فزاینده حاکی از آن است که lncRNAs نقش مهمی در بروز و پیشرفت OP دارند. نتایج مطالعه ای در این زمینه نشان داد که LINC00205 با تعدیل محور سیگنالینگ miR-26b-5p/KMT2C، تمایز استخوانی hMSCs را مهار و پیشرفت OP را تقویت می کند (H. Wang et al., 2023). کلسیفیکاسیون عروقی با بسیاری از بیماری های قلبی عروقی در ارتباط است (Chang et al., 2020). در همین راستا مشخص شده است که بیان بیش از حد GAS5 به طور قابل توجهی تمایز استخوانی و کلسیفیکاسیون سلول های عضله صاف عروق آئورت انسانی را کاهش می دهد (Chang et al., 2020). نتایج این تحقیق تایید کرد که GAS5 با کاهش بیان miR-26b-5p، تمایز استئوبلاستیک HASMCs را از طریق افزایش بیان ژن PTEN، کاهش می دهد (Chang et al., 2020). علاوه بر نقش miR-26b-5p در القا استخوان زایی MSCs، بطور بسیار جالبی مشخص شده است که بیان بیش از حد این miRNA باعث افزایش چربی زایی MSCs مشتق از

برای تخریب هم مورد نیاز می‌باشد (Moreno-Navarrete et al., 2017). از آنجایی که تخریب هم منجر به تولید بیلی‌وردین،  $Fe^{2+}$  و مونوکسید کربن می‌شود، فعالیت HMOX1 منبع مهم آهن درون سلولی محسوب می‌شود (Moreno-Navarrete et al., 2017). در همین راستا در مطالعه‌ای که بر روی بافت چربی صورت گرفت، مشخص شد که آهن اضافی در بافت چربی باعث اختلال عملکرد بافت چربی شده که در ادامه این امر منجر به کاهش چربی‌زایی، افزایش التهاب سلول‌های چربی و همچنین پلازیاسیون ماکروفاژ بافت چربی از فنوتیپ M2 به M1 می‌شود (Moreno-Navarrete et al., 2017). NEDD4L یک لیگاز E3 بسیار حفاظت شده است که یوبی‌کوئیتیناسیون MEKK2 را ترویج و از پایداری پروتئین MEKK2 که برای سیگنال‌دهی ناشی از IL-17، IL-1 $\alpha$  و TNF- $\alpha$  لازم است، جلوگیری می‌کند. کمبود Nedd4l باعث افزایش بیان سیتوکین التهابی و کموکاین ناشی از TNF- $\alpha$  و IL-1 $\alpha$  می‌شود (Li et al., 2022). TXNIP، تنظیم‌کننده مهم در هموستاز ردوکس، عملکردهای متعددی دارد. TXNIP می‌تواند به تیوردوکسین ۱ و ۲ (TRX1 و TRX2) متصل شود و فعالیت آن‌ها را، بعنوان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و محافظت‌کننده در برابر استرس اکسیداتیو و ROS، مهار کند (Choi & Park, 2023). بنابراین TXNIP می‌تواند تولید ROS و استرس اکسیداتیو را افزایش دهد و التهاب مخرب را القا کند (Domingues et al., 2021).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر برای بررسی نقش فروپتوز در پیری MSCs، با استفاده از مقایسه MSCs پیر و جوان صورت گرفت. نتایج آنالیزها ۳۴ ژن بعنوان FRDEGs را که با استرس اکسیداتیو، متابولیسم یون آهن و سنتز اسیدهای چرب غیراشباع که از ویژگی‌های اصلی فروپتوز هستند را در MSCs پیر شناسایی کردند. این مطالعه همچنین نقش احتمالی miR-26b-5p و تنظیم‌کننده‌های آن را در کنترل ژن‌های فروپتوزی برجسته می‌کند که می‌توانند بیان این ژن‌ها را به نفع پیری MSCs تغییر دهند. ارتباط قوی بین التهاب و پیری وجود دارد که این مطالعه نقش FRDEGs را در القا التهاب و پیری سلولی نشان می‌دهد. در نهایت بر اساس نتایج بدست آمده، این مطالعه فروپتوز را بعنوان عامل احتمالی در پیری MSCs معرفی کرده و مهار فروپتوز را بعنوان یک راهکار درمانی جهت بهبود عملکرد این سلول‌ها پیشنهاد می‌کند.

### سپاسگزاری

این مقاله از طرح CT1402091791 با عنوان "بررسی تاثیر مهار فروپتوز بر پتانسیل تکثیری و تمایزی سلول‌های بنیادی

چربی انسانی (Human adipose-derived MSCs; hADMSCs) نیز می‌شود (Luo et al., 2020). محققین دریافتند که miR-26b-5p از طریق غیرفعال کردن مسیر Wnt/ $\beta$ -catenin تمایز چربی‌زایی این سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی تقویت می‌کند (Luo et al., 2020). احتمالاً نقش‌های متفاوت miR-26b-5p بعلاوه تاثیر lncRNAs مختلف می‌باشد. با توجه به این مطالعات و ژن‌هایی که در این مطالعه مورد هدف قرار می‌گیرند، miR-26b-5p و lncRNAهایی که این miRNA را تنظیم می‌کنند، احتمالاً می‌توانند بر فرآیندهای سلولی مختلف مانند متابولیسم لیپید، پاسخ استرس، متابولیسم گلوکز، التهاب، تکثیر سلولی و تنظیم اپی ژنتیکی تأثیر بگذارند. پر واضح است که اختلال در تنظیم بیان هر یک از این ژن‌ها می‌تواند محرکی برای القا فروپتوز و احتمالاً القا پیری MSCs باشد.

التهاب، بعنوان فرآیند دفاعی بدن، پاسخ بیولوژیکی سیستم ایمنی به محرک‌های مضر است که می‌تواند توسط پاتوژن‌های مختلف (ویروس‌ها، باکتری‌ها)، سموم، ترکیبات سمی و آسیب بافتی ایجاد شود. بنابراین التهاب یک مکانیسم محافظتی محسوب می‌شود که محرک‌های مضر را حذف و روند بهبودی را آغاز می‌کند و هموستاز را به ارگانیسم باز می‌گرداند (L Kiss, 2022). با این حال نشان داده شده است که التهاب نامنظم یا طولانی مدت می‌تواند باعث عدم تعادل سیستم ایمنی، اختلال عملکرد سلولی و در نهایت مرگ شود (Chen et al., 2023). مشخص شده است که با افزایش سن احتمال بروز حالت پیش التهابی مزمن با درجه پایین در افراد مسن افزایش می‌یابد و چنین حالتی می‌تواند بعنوان یک عامل خطر قوی برای بروز انواع بیماری‌ها، ناتوانی جسمی و شناختی، ضعف و مرگ در نظر گرفته شود (Conte et al., 2022). نکروز، مرگ سلولی تصادفی، عمدتاً در پاسخ به عفونت یا سایر اشکال استرس سلولی ایجاد می‌شود و بعنوان یک شکل التهابی مرگ سلولی طبقه‌بندی می‌شود که با تورم سلولی، پارگی غشای پلاسما و انتشار محتوای سیتوپلاسمی مشخص می‌شود (Sun et al., 2020). برخلاف آپوپتوز، فروپتوز بعنوان شکل جدیدی از نکروز، ایمنی‌زا محسوب می‌شود؛ چرا که در طی آن سلول‌های آسیب دیده الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (Damage-Associated Molecular Patterns; DAMPs) را آزاد می‌کنند که مرگ سلولی را تقویت و یکسری واکنش‌های مرتبط با التهاب را ترویج می‌کند (Sun et al., 2020). در این مطالعه مشخص شد که بسیاری از ژن‌های هاب با بروز التهاب ارتباط نزدیکی دارند که به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌کنیم. HMOX1 (HO-1) یک آنزیم القایی است که

## تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچگونه تضاد منافع با شخص یا ارگانی ندارند.

مزانشیمی پیر" استخراج شده است و توسط ستاد توسعه فناوری های پزشکی بازساختی و سلول های بنیادی-معاونت علمی و فناوری و اقتصاد دانش بنیان ریاست جمهوری حمایت شده و در دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شده است.

## REFERENCES

- Al-Azab, M., Safi, M., Idiiatullina, E., Al-Shaebi, F., & Zaky, M. Y.** (2022). Aging of mesenchymal stem cell: machinery, markers, and strategies of fighting. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 69.
- Ala, U.** (2020). Competing endogenous RNAs, non-coding RNAs and diseases: an intertwined story. *Cells*, 9(7), 1574.
- Boulestreau, J., Maumus, M., Rozier, P., Jorgensen, C., & Noël, D.** (2020). Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in aging. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 107.
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A.** (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, 220(2), e202009045.
- Chaker, D., Mouawad, C., Azar, A., Quilliot, D., Achkar, I., Fajloun, Z., & Makdissy, N.** (2018). Inhibition of the RhoGTPase Cdc42 by ML141 enhances hepatocyte differentiation from human adipose-derived mesenchymal stem cells via the Wnt5a/PI3K/miR-122 pathway: impact of the age of the donor. *Stem cell research & therapy*, 9, 1-27.
- Chang, Z., Yan, G., Zheng, J., & Liu, Z.** (2020). The lncRNA GAS5 inhibits the osteogenic differentiation and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Calcified Tissue International*, 107, 86-95.
- Chen, Y., Fang, Z.-M., Yi, X., Wei, X., & Jiang, D.-S.** (2023). The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways. *Cell Death & Disease*, 14(3), 205.
- Choi, E.-H., & Park, S.-J.** (2023). TXNIP: A key protein in the cellular stress response pathway and a potential therapeutic target. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(7), 1348-1356.
- Choudhery, M. S.** (2021). Strategies to improve regenerative potential of mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 13(12), 1845.
- Conte, M., Petraglia, L., Poggio, P., Valerio, V., Cabaro, S., Campana, P., Comentale, G., Attena, E., Russo, V., & Pilato, E.** (2022). Inflammation and cardiovascular diseases in the elderly: the role of epicardial adipose tissue. *Frontiers in Medicine*, 9, 844266.
- Coradduzza, D., Congiargiu, A., Chen, Z., Zinellu, A., Carru, C., & Medici, S.** (2023). Ferroptosis and senescence: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3658.
- DeSalvo, J., Ban, Y., Li, L., Sun, X., Jiang, Z., Kerr, D. A., Khanlari, M., Boulina, M., Capecci, M. R., & Partanen, J. M.** (2021). ETV4 and ETV5 drive synovial sarcoma through cell cycle and DUX4 embryonic pathway control. *The Journal of clinical investigation*, 131(13).
- Domingues, A., Jolibois, J., Marquet de Rougé, P., & Nivet-Antoine, V.** (2021). The emerging role of TXNIP in ischemic and cardiovascular diseases; a novel marker and therapeutic target. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1693.
- Dzobo, K.** (2021). Multipotent Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: An Updated Review on Historical Background, Recent Trends and Advances in their Clinical Applications.
- Eiro, N., Fraile, M., González-Jubete, A., González, L. O., & Vizoso, F. J.** (2022). Mesenchymal (stem) stromal cells based as new therapeutic alternative in inflammatory bowel disease: basic mechanisms, experimental and clinical evidence, and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8905.
- Endale, H. T., Tesfaye, W., & Mengstie, T. A.** (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11.
- Feng, S., Tang, D., Wang, Y., Li, X., Bao, H., Tang, C., Dong, X., Li, X., Yang, Q., & Yan, Y.** (2023). The mechanism of ferroptosis and its related diseases. *Molecular Biomedicine*, 4(1), 33.
- Her, Y. R., Wang, L., Chepelev, I., Manterola, M., Berkovits, B., Cui, K., Zhao, K., & Wolgemuth, D. J.** (2021). Genome-wide chromatin occupancy of BRDT and gene expression analysis suggest transcriptional partners and specific epigenetic landscapes that regulate gene expression during spermatogenesis. *Molecular reproduction and development*, 88(2), 141-157.
- Jimenez-Puerta, G. J., Marchal, J. A., López-Ruiz, E., & Gálvez-Martín, P.** (2020). Role of

- mesenchymal stromal cells as therapeutic agents: potential mechanisms of action and implications in their clinical use. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 445.
- Jing, S., Tian, J., Zhang, Y., Chen, X., & Zheng, S.** (2020). Identification of a new pseudogenes/lncRNAs-hsa-miR-26b-5p-COL12A1 competing endogenous RNA network associated with prognosis of pancreatic cancer using bioinformatics analysis. *Aging (Albany NY)*, 12(19), 19107.
- Kavčič, N., Pegan, K., & Turk, B.** (2017). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers. *Biological chemistry*, 398(3), 289-301.
- L Kiss, A.** (2022). Inflammation in focus: the beginning and the end. *Pathology and Oncology Research*, 27, 1610136.
- Li, H., Ding, J., Liu, W., Wang, X., Feng, Y., Guan, H., & Chen, Z.** (2023). Plasma exosomes from patients with acute myocardial infarction alleviate myocardial injury by inhibiting ferroptosis through miR-26b-5p/SLC7A11 axis. *Life sciences*, 322, 121649.
- Li, H., Wang, N., Jiang, Y., Wang, H., Xin, Z., An, H., Pan, H., Ma, W., Zhang, T., & Wang, X.** (2022). E3 ubiquitin ligase NEDD4L negatively regulates inflammation by promoting ubiquitination of MEKK2. *EMBO reports*, 23(11), e54603.
- Li, S., Wang, M., Wang, Y., Guo, Y., Tao, X., Wang, X., Cao, Y., Tian, S., & Li, Q.** (2021). p53-mediated ferroptosis is required for 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced senescence of PC12 cells. *Toxicology In Vitro*, 73, 105146.
- Lin, Z., Long, F., Kang, R., Klionsky, D. J., Yang, M., & Tang, D.** (2024). The lipid basis of cell death and autophagy. *Autophagy*, 20(3), 469-488.
- Liu, J., Ding, Y., Liu, Z., & Liang, X.** (2020). Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 258.
- Liu, J., Kang, R., & Tang, D.** (2022). Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis. *The FEBS journal*, 289(22), 7038-7050.
- Liu, L., Zhao, C., Zhang, H., Lu, Y., Luo, B., Yao, Z., Shao, Y., Zeng, H., Zeng, C., & Zhang, R.** (2022). Asporin regulated by miR-26b-5p mediates chondrocyte senescence and exacerbates osteoarthritis progression via TGF- $\beta$ 1/Smad2 pathway. *Rheumatology*, 61(6), 2631-2643.
- Liu, R., Qiao, S., Shen, W., Liu, Y., Lu, Y., Liangyu, H., Guo, Z., Gong, J., Shui, G., & Li, Y.** (2020). Disturbance of fatty acid desaturation mediated by FADS2 in mesenteric adipocytes contributes to chronic inflammation of Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 14(11), 1581-1599.
- Luo, Y., Ji, H., Cao, Y., Ding, X., Li, M., Song, H., Li, S., WaTableng, C., Wu, H., & Meng, J.** (2020). miR-26b-5p/TCF-4 controls the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 29, 0963689720934418.
- Martín-Vázquez, E., Cobo-Vuilleumier, N., López-Noriega, L., Lorenzo, P. I., & Gauthier, B. R.** (2023). The PTGS2/COX2-PGE2 signaling cascade in inflammation: Pro or anti? A case study with type 1 diabetes mellitus. *International journal of biological sciences*, 19(13), 4157.
- Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Rodríguez, A., Latorre, J., Becerril, S., Sabater-Masdeu, M., Ricart, W., Frühbeck, G., & Fernández-Real, J. M.** (2017). HMOX1 as a marker of iron excess-induced adipose tissue dysfunction, affecting glucose uptake and respiratory capacity in human adipocytes. *Diabetologia*, 60, 915-926.
- Puentes-Pardo, J. D., Moreno-SanJuan, S., Carazo, Á., & León, J.** (2020). Heme oxygenase-1 in gastrointestinal tract health and disease. *Antioxidants*, 9(12), 1214.
- Rodencal, J., & Dixon, S. J.** (2023). A tale of two lipids: Lipid unsaturation commands ferroptosis sensitivity. *Proteomics*, 23(6), 2100308.
- Sahoo, B. M., Banik, B. K., Borah, P., & Jain, A.** (2022). Reactive oxygen species (ROS): key components in cancer therapies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(2), 215-222.
- Sebastian-delaCruz, M., Gonzalez-Moro, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Castellanos-Rubio, A., & Santin, I.** (2021). The role of lncRNAs in gene expression regulation through mRNA stabilization. *Non-coding RNA*, 7(1), 3.
- Sun, Y., Chen, P., Zhai, B., Zhang, M., Xiang, Y., Fang, J., Xu, S., Gao, Y., Chen, X., & Sui, X.** (2020). The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110108.
- Tian, Y., Tian, Y., Yuan, Z., Zeng, Y., Wang, S., Fan, X., Yang, D., & Yang, M.** (2022). Iron metabolism in aging and age-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3612.
- Wang, B., Yang, X., Sun, X., Liu, J., Fu, Y., Liu, B., Qiu, J., Lian, J., & Zhou, J.** (2022). ATF3 in atherosclerosis: A controversial transcription factor. *Journal of Molecular Medicine*, 100(11),

- 1557-1568.
- Wang, F., He, J., Xing, R., Sha, T., & Sun, B.** (2023). Molecular mechanisms of ferroptosis and their role in inflammation. *International Reviews of Immunology*, 42(1), 71-81.
- Wang, H., Xu, W., Chen, X., Mei, X., Guo, Z., & Zhang, J.** (2023). LncRNA LINC00205 stimulates osteoporosis and contributes to spinal fracture through the regulation of the miR-26b-5p/KMT2C axis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 24(1), 262.
- Wang, J., Wang, X., Ding, X., Huang, T., Song, D., & Tao, H.** (2021). EZH2 is associated with cartilage degeneration in osteoarthritis by promoting SDC1 expression via histone methylation of the microRNA-138 promoter. *Laboratory Investigation*, 101(5), 600-611.
- Wang, X., Shen, X., Yan, Y., & Li, H.** (2021). Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): An overview toward clinical applications. *Bioscience Reports*, 41(4), BSR20204402.
- Wang, Y., Zhou, W., Chen, Y., He, D., Qin, Z., Wang, Z., Liu, S., Zhou, L., Su, J., & Zhang, C.** (2022). Identification of susceptibility modules and hub genes of osteoarthritis by WGCNA analysis. *Frontiers in Genetics*, 13, 1036156.
- Wei, Z., Hao, C., Huangfu, J., Srinivasagan, R., Zhang, X., & Fan, X.** (2021). Aging lens epithelium is susceptible to ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 167, 94-108.
- Yun, S. P., Han, Y.-S., Lee, J. H., Kim, S. M., & Lee, S. H.** (2018). Melatonin rescues mesenchymal stem cells from senescence induced by the uremic toxin p-cresol via inhibiting mTOR-dependent autophagy. *Biomolecules & therapeutics*, 26(4), 389.
- Zhang, Q., Wang, Q., Ding, H., Hu, C., & Feng, J.** (2024). Ferroptosis Altered microRNAs Expression in HT-1080 Fibrosarcoma Cells Based on Small RNA Sequencing and Bioinformatics Analysis. *Nutrients*, 16(6), 873.
- Zhidkova, E. M., Lylova, E. S., Grigoreva, D. D., Kirsanov, K. I., Osipova, A. V., Kulikov, E. P., Mertsalov, S. A., Belitsky, G. A., Budunova, I., & Yakubovskaya, M. G.** (2022). Nutritional sensor REDD1 in cancer and inflammation: friend or foe? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9686.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Talkhabi, M. Mavaddatiyan, L.** 2024. Mesenchymal stem cells senescence: Investigating the role of ferroptosis using bioinformatics analyses. *Nova Biologica Reperta* 11: 1-16. (In Persian).

تلخایی، م. مودتیان، ل. ۱۴۰۳. پیری سلول های بنیادی مزانشیمی: بررسی نقش فروپتوز با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی. یافته های نوین در علوم زیستی

۱۱: ۱-۱۶.