

مقاله پژوهشی

اثر تمرینات استقامتی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGF و PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتریت زانو

خدیدجه نیکنام^۱، علیرضا براری^{۱*}، احمد عبدی^۱، پروین فرزانی^۲

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

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

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: استئوآرتریت، شایع‌ترین اختلالات عضلانی-اسکلتی است که با از دست دادن غضروف مفصلی، تغییرات استخوانی و التهاب غشای سینوویال توصیف می‌شود. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تمرینات استقامتی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGF و PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتریت زانو است.

مواد و روش‌ها: برای انتخاب نمونه آماری ۳۵ سر موش صحرایی نر و بیستار به صورت تصادفی به پنج گروه هفت‌تایی: کنترل (سالم)، کنترل (بیمار)، سلول بنیادی، تمرین و تمرین-سلول بنیادی تقسیم شدند. برنامه تمرینی شامل ۲۹-۲۵ دقیقه دویدن بر روی تردمیل با سرعت ۱۵ متر در دقیقه برای هفته اول بود و هر هفته یک متر بر دقیقه اضافه شد تا در هفته هشتم به ۲۲ متر بر دقیقه رسید. ۴۸ ساعت پس از اجرای برنامه تمرینی نمونه‌گیری از بافت زانو انجام شد. بیان ژن PDGF و PDGFr از طریق روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد. از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و در صورت مشاهده تفاوت سطح معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد.

نتایج: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح بیان ژن PDGF و PDGFr در گروه بیمار نسبت به گروه سالم افزایش داشت ($P = 0.00$, $P = 0.00$). همچنین سطوح بیان ژن PDGF در گروه‌های تمرین، سلول بنیادی و تمرین-سلول بنیادی نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری ($p = 0.05$, $p = 0.025$) داشت؛ در حالی که سطوح بیان ژن PDGFr فقط در گروه سلول بنیادی و تمرین-سلول بنیادی نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری ($P = 0.039$, $P = 0.043$) داشت. نتیجه‌گیری: فاکتورهای رشد مانند PDGF اثرات آنابولیکی و ضدالتهابی خود را برای حفظ پتانسیل کندروژنیک در کندروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی از طریق مهار مسیر سیگنالی NF-kB اعمال می‌کند.

کلمات کلیدی: تمرینات استقامتی، سلول‌های بنیادی، PDGF و PDGFr، استئوآرتریت

مقدمه

انجمن روماتولوژی آمریکا، اعلام کرده است که زمین خوردن مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر و ناتوانی در سالمندان است؛ به طوری که یک‌سوم از افراد بالای ۶۵ سال و ۵۴ درصد از افراد بالای ۸۰ سال، حداقل سالی یک‌بار زمین خوردن را تجربه کرده‌اند و جراحات ناشی از آن، سالانه بیش از ۲۴ میلیون دلار هزینه بر سیستم‌های بهداشتی تحمیل می‌کند که باعث افت کیفیت زندگی، بالا رفتن هزینه‌های نگهداری، عوارض جسمانی، روانی، اجتماعی و اقتصادی زیادی می‌شود؛ به گونه‌ای که حتی ممکن است موجب مرگ آن‌ها شود (۲). با توجه به روند روبه رشد چاقی و سالمندی، شیوع این بیماری و هزینه‌های اقتصادی

استئوآرتریت یکی از شایع‌ترین اختلالات مفصلی است که مطالعات نشان می‌دهد اکثر افراد در طول ۶۵ سالگی دارای شواهد رادیولوژیک و یا علائم بالینی آرتروز هستند. مفاصلی همچون زانوها، لگن و ستون فقرات غالباً تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱). علائم اغلب با اختلالات عملکردی همراه است. از علائم و نشانه‌های استئوآرتریت می‌توان به نشانه‌های التهابی از جمله درد، سفتی و از دست دادن تحرک اشاره کرد.

*نویسنده مسئول: علیرضا براری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
Email: alireza54.barari@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-5199-463x

آن نیز روبه افزایش است. از این رو، نیاز به اعمال مداخله‌های مناسب برای سالمندان مبتلا به استئوآرتریت زانو، بیش از پیش نیاز است. تجزیه و تحلیل آناتومیکی و استفاده از فن‌های هیستوپاتولوژیک و تصویربرداری کمک کرده‌اند که بتوان تغییرات ساختاری غضروف در طول بیماری تشخیص داده شوند (۲، ۳). به نظر می‌رسد که این بیماری یک کمپلکس چندعاملی بوده که فرآیند کاتابولیسم و آنابولیسم غضروف و تغییرات در دیگر بافت‌های مفصل را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر این اساس فرض بر این است که عواملی همچون افزایش فشار مکانیکی و تغییر در فاکتورهای بیوشیمیایی در مفصل مبتلا از دلایل اولیه پیشرفت بیماری باشد (۴). از طرفی ظرفیت ترمیمی محدود در غضروف مفصلی افراد بزرگسال یک فاکتور مهم در پیشرفت دژنراسیون غضروف و آسیب به غضروف مفصلی و در نتیجه ایجاد استئوآرتریت است. فاکتور رشد مشتق از پلاکت، میتوژن اصلی برای فیبروبلاست‌ها و سایر سلول‌های ارگان‌های مزانشیمی است. PDGF به‌طور موضعی تولید می‌شود و بر روی فاکتور رشد عمل می‌کند. PDGF توسط سلول‌های عضلانی صاف، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژها تولید و عمدتاً در پلاکت‌ها ذخیره می‌شوند. PDGF متشکل از دو دی سولفید مجزا که به زنجیره‌های پپتیدی A و B متصل هستند که دارای ۶۰ درصد توالی پروتئین می‌باشند. فاکتور رشد می‌تواند به‌عنوان همودایمر (PDGF-BB یا PDGF-AA) یا به‌عنوان یک هتروداایمر (PDGF-AB) با توده مولکولی تقریبی ۳۰ کیلو دالتون باشد. PDGF نقش مهم و اساسی در فرآیند بهبود زخم بازی می‌کند. PDGF در غلظت‌های زیاد در پلاکت‌ها و در مایعاتی که در طی مراحل اولیه بهبود زخم تولید می‌شوند، وجود دارد (۵، ۶). PDGF فاکتور مستعد میتوژنیک و شیمیایی قوی برای سلول‌های مزانشیمی اولیه شامل فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها و کندروسیت‌ها است و به‌این ترتیب اعتقاد بر این است که PDGF قادر به افزایش بازسازی بافت و ترمیم آن است. گیرنده‌های PDGF در تعدادی از انواع سلول‌ها شامل کندروسیت‌ها و تعدادی از گیرنده‌هایی که به‌واسطه سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۱ تنظیم افزایشی دارند، مشخص شده است. افزایش تکثیر کندروسیت‌ها با غلظت PDGF از ۴/۷ به ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده شده که بیشترین شمار سلول‌ها در ۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر دیده شد (۵).

۱. Platelet-derived growth factor (PDGF).

مثبت ارزیابی شد (۱۷). توسعه روش‌های درمانی کم‌هزینه، غیر دارویی و غیر جراحی برای بهبود بیماران مبتلابه استئوآرتریت زانو به‌عنوان اولویت‌های اصلی توسط افراد مبتلابه استئوآرتریت زانو شناخته شده است. با توجه به موارد یادشده هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تمرینات استقامتی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGFr و PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتریت زانو است.

مواد و روش‌ها

در این طرح تجربی ۳۵ موش نر نژاد ویستار (میانگین سنی ۸-۱۲ هفته و وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم) از مرکز تحقیقات آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب شدند. موش‌ها به‌صورت گروه‌های ۳ تایی در هر قفس در شرایط اتاق (قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات شفاف به ابعاد $۱۵ \times ۲۶/۵ \times ۴۲$ دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب) نگهداری شدند. در طول این تحقیق موش‌ها با غذا و آب استاندارد تغذیه شدند.

استئوآرتریت به روش جراحی همان‌طور که قبلاً توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۴) شرح داده شد القا شد (ژائو و همکاران، ۲۰۱۴). به‌طور مختصر، ابتدا موش‌ها با داروی کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از تراشیدن موهای ناحیه زانوی پای راست توسط تیغ بیسوری یک برش افقی ۱ سانتی‌متری در بخش داخلی مفصل زانو ایجاد شد. مفصل زانو بلافاصله از طریق دررفتگی جانبی کشکک و رباط کشککی باز شد. پس از کنار زدن پوست لیگامان داخلی جانبی زانو کنار زده می‌شود تا مینیسک داخلی مشاهده شود. سپس با ایجاد یک برش به‌صورت ناقص منجر به پارگی و ایجاد آسیب در مینیسک می‌شود و در آخر ناحیه به روش استریل بخیه زده می‌شود.

موش‌های مبتلابه استئوآرتریت به ۴ گروه شم (کنترل - بیمار)، تمرین، سلول‌های بنیادی، تمرین - سلول‌های بنیادی تقسیم شدند. گروه کنترل مفصل زانو طبیعی داشتند و هیچ مورد درمانی دریافت نکردند.

به‌منظور استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم) پس از کشته شدن حیوان از ناحیه استخوان ران و درشت

(۱۲). با این حال گزارش شده است که سلول‌های کندروسیت خارج شده از ماتریکس خارج سلولی طبیعی، توانایی تولید ماتریکس شبیه غضروف را دارند. منطقه سطحی غضروفی در پستانداران و انسان‌ها حاوی سلول‌های بنیادی پیش ساز مزانشیمی است که این منبع با ایجاد آسیب غضروفی از بین می‌رود. روش‌های متداول و قدیمی برای درمان آسیب‌های غضروفی با بهبودی نسبی و کاهش علائم در بیماران همراه است، ولی تا به امروز بافت ایجاد شده توسط این روش‌ها، بافت غضروفی فیروبلاستی بوده است که از لحاظ مکانیکی ضعیف‌تر از بافت طبیعی غضروف است (۱۳، ۱۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های پرتوانی هستند که طی اندام‌زایی، توانایی تولید بافت همبند مثل غضروف، استخوان، تاندون، لیگامان و مغز استروما را دارند. با وجود چالش‌های فراوان در رابطه با سلول‌های مزانشیمی مانند توانایی تمایز خارج از لایه‌ای (Trans differentiation)، این سلول‌ها یکی از مهم‌ترین منابع سلولی برای استفاده در پزشکی بازساختی هستند. در مورد روش‌های غیر دارویی مورد استفاده در درمان استئوآرتریت، می‌توان به ورزش اشاره نمود که تحقیقات متعددی به تأثیر آن بر علائم این بیماری پرداخته‌اند. در این مورد (۱۵)، باید این نکته را مورد توجه قرارداد که نتایج برخی از تحقیقات، از نقش مخرب ورزش شدید در بروز استئوآرتریت حکایت دارند. در حالی که بیشتر مطالعات انجام شده، اثر ورزش با شدت متوسط را مثبت ارزیابی کرده‌اند. تمرینات با شدت متوسط موجب کاهش دردهای مفصلی، افزایش قدرت عضلانی، ثبات مفصلی و بهبود دامنه حرکتی می‌شود. افزایش قدرت عضلانی می‌تواند تغییرات بیومکانیکی را کاهش دهد و در نتیجه موجب کاهش استرس و فشار مفصلی در غضروف‌های مفصلی و کاهش استئوآرتریت زانو شود. علاوه بر این کندروسیت‌ها سلول‌های حساسی هستند که می‌توانند به انواع محرک‌ها پاسخ دهند و موجب سنتز کلاژن نوع ۲ شده که برای حفظ، تقویت و بازسازی غضروف‌ها ضروری است. گالویس و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی نقش شدت‌های مختلف تمرین روی علائم استئوآرتریت زانوی موش صحرایی پرداخته است. این پژوهشگران نتیجه گرفتند که تمرین روی نوارگردان با شدت کم تا متوسط، تأثیر مثبتی روی شدت زخم‌های غضروفی داشته، حال آنکه تمرین با شدت بالا، باعث از بین رفتن این اثر شده است (۱۶). سیفوننتس و همکاران (۲۰۱۰) نقش تمرین روی نوارگردان با شدت متوسط بر استئوآرتریت زانوی موش صحرایی،

وزن) بی‌هوش و کشته شدند. بافت‌های غضروفی در نمک بافر فسفات (pH=7, m=0/01) در دمای 4 درجه سانتی‌گراد جدا و همگن شدند (Hielscher, UP100H). RNA از بافت غضروف با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج شد. کمیت و کیفیت RNAهای استخراج‌شده با استفاده از روش طیف‌سنجی نانودروپ (Thermo Sci. Newington, ND-1000 در نظر گرفته شد. DNA تکمیلی (cDNA) از نمونه‌های RNA با استفاده از RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo science, Germany) در 42 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت و آغازگرهای هگزامر تصادفی (Thermo science, Germany) سنتز شد. یک ترموسیکلر روتور ژن 6000 و Real Q-PCR 29 Master Mix Kit در 40 چرخه برای تقویت استفاده شدند. هر واکنش شامل 5 میکرولیتر میکرون مستر و پرایمرهای 100 نانومتری بود. مرحله نگهداری RT-PCR در 10000 دقیقه 95 درجه سانتی‌گراد بود. مراحل چرخه به شرح زیر بود: 40 چرخه، 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 ثانیه؛ 60 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه. توالی‌های اولیه به شرح زیر سنتز شدند:

'-CCCCTGCCCATTCGGAGGAAGAG-35'

PDGF(forward)

5TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG-3'

PDGF(reverse)

5'-ATCAATCAGCCCAGATGGAC-3'

PDGFr(forward)

5'-TTCACGGGCAGAAAGGTACT-3'

PDGFr(reverse)

(ΔCt) با Delta Ct استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. [$\Delta Ct = CT(\text{target}) - CT$]: سطح بیان ژن با روش $2^{-\Delta Ct}$ تعیین شد.

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری هر یک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد.

نئی سلول مغز استخوان جمع‌آوری و MSCs² جداشده در محیطی با DMEM با FBS20% در طول یک شبانه‌روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت‌ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شدند تا سلول‌هایی که نجسبیده بودند جدا شوند و MSCsها بعد از 3 تا 4 بار پاساژ شدن به درجه خلوص رسیدند و به هدف تزریق انتخاب شدند. پس از کشت در آزمایشگاه برای هر موش تعداد یک میلیون به ازای یک کیلوگرم وزن بدن موش آماده‌سازی شد و در طول دوره ریکاوری و به‌عنوان یک‌بار تزریق در محل القاء مدل سلول‌ها تزریق شدند. گروه موش‌های صحرائی MSCs تزریق داخل سلول‌های 1×10^6 سلول/کیلوگرم را دریافت کردند. MSCsها به مفصل زانو راست تزریق شدند (18، 19).

کل دوره تمرین شامل دو مرحله، آشنایی با محیط پژوهش و نوار گردان بود. بدین منظور موش‌ها در این مرحله 5 روز، یک‌بار در هفته به مدت 10 دقیقه با سرعت 16 متر بر دقیقه و شیب صفر درصد بر روی تردمیل فعالیت کردند. اختصاراً برنامه تمرینی با 30 دقیقه دویدن بر روی تردمیل

بدون شیب و با سرعت 16 متر در دقیقه در هفته اول شروع شد که به تدریج به 50 دقیقه در هفته سوم رسید. گرم کردن و سرد کردن در مدت‌زمان 5 دقیقه در ابتدا و انتهای تمرین انجام شد (20، 21).

هشت هفته پس از اجرای تحقیق تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال 12 تا 14 ساعت ناشتایی و 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات (جهت حذف اثرات حاد تمرین و مکمل)، با تزریق داخل صفاقی کتامین (50-30 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (5-3 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)

². Mesenchymal cells (MSCs)

بیان ژن PDGF

نتایج نشان می‌دهد که بیشترین سطح بیان ژن PDGF در گروه سالیین و کمترین سطوح آن در گروه سالم مشاهده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تمرینات بدنی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGF موش‌های مبتلابه استئوآرتریت در گروه‌های مختلف تأثیر دارد. همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی نشان داده شد که سطح تغییرات بیان ژن PDGF در گروه‌های بیمار، تمرین و

معنی‌داری برای تمام محاسبات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

نتایج

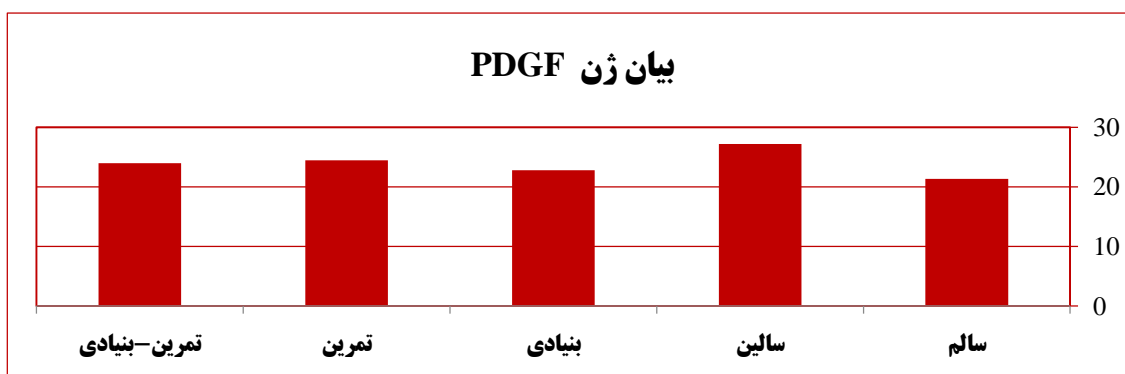
در این بخش داده‌های حاصل از متغیرهای تحقیق برای ۵ گروه در قالب جدول به صورت توصیفی قرار گرفته است (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های متغیرهای تحقیق (میانگین \pm انحراف معیار)

متغیر گروه	PDGF	PDGF α
سالم	۲۱/۳۶ \pm ۰/۸۹	۲۲/۴۶ \pm ۰/۹۹
سالیین	۲۷/۲۲ \pm ۰/۹۳	۲۸/۶۳ \pm ۱/۱۳
سلول بنیادی	۲۲/۸۳ \pm ۱/۱۶	۲۵/۵۴ \pm ۲/۰۰
تمرین	۲۴/۴۷ \pm ۰/۴۳	۲۶/۲۵ \pm ۱/۳۳
تمرین- سلول بنیادی	۲۴/۰۰ \pm ۱/۶۵	۲۵/۵۸ \pm ۱/۳۱

جدول ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن PDGF در گروه‌های مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
بین گروه‌ها	۹۴/۶۴۲	۴	۲۳/۶۶		
درون گروه	۲۳/۸۴۸	۲۰	۱/۱۹۲	۱۹/۸۴۳	* ۰/۰۰۰
مجموع	۱۱۸/۴۹	۲۴			



نمودار ۱- تغییرات بیان ژن PDGF در گروه‌های مختلف

اصلی به جهت ظرفیت ضعیف بهبود غضروف و عدم وجود بیومارکرهای تشخیصی مناسب می‌باشند (۲۲). واسطه‌های التهابی (سایتوکین‌ها، پروستاگلاندین‌ها) می‌توانند فرآیندهای کاتابولیک را به‌منظور تخریب ماتریکس افزایش دهند و موجب افزایش واکنش التهابی در استئوآرتریت شوند. درحالی‌که مداخله‌های فعلی درمان برای کاهش درد و بهبود جزئی هدف‌گذاری شده‌اند، درمان استئوآرتریت باید هدف ترمیم بافت و بازسازی غضروف را موردنظر قرار دهد (۲۳). هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرینات استقامتی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGF و PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتریت زانو بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح بیان ژن PDGF و PDGFr در گروه بیمار نسبت به گروه سالم

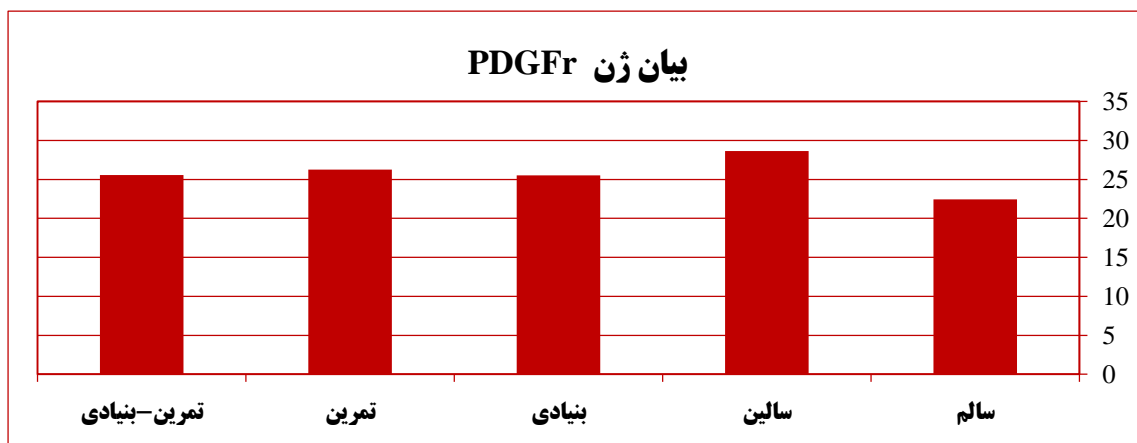
تمرین+بنیادی در مقایسه با گروه بیمار کاهش معنی‌داری ($P=0/025, P=0/05$) دارد (جدول ۲ و نمودار ۱).

بیان ژن PDGFr

نتایج نشان می‌دهد که بیشترین سطح بیان ژن PDGFr در گروه سالمین و کمترین سطوح آن در گروه سالم مشاهده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تمرینات بدنی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGFr موش‌های مبتلابه استئوآرتریت در گروه‌های مختلف تأثیر دارد. همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی نشان داده شد که سطح تغییرات بیان ژن PDGFr در گروه‌های بنیادی و تمرین+بنیادی در مقایسه با گروه بیمار کاهش معناداری ($P=0/039, P=0/043$) دارد (جدول ۳ و نمودار ۲).

جدول ۳- نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن PDGFr در گروه‌های مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	Fنسبت	سطح معناداری
بین گروه‌ها	۹۶/۹۹۹	۴	۲۴/۲۵		
PDGFr درون گروه	۳۹/۲۹۵	۲۰	۱/۹۶۵	۱۲/۳۴۲	* ۰/۰۰۰
مجموع	۱۳۶/۲۹۴	۲۴			



نمودار ۲- تغییرات بیان ژن PDGFr در گروه‌های مختلف

افزایش داشت (۲۴). همچنین سطوح بیان ژن PDGF در گروه‌های مداخله تمرین، سلول بنیادی و ترکیبی نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری داشت؛ درحالی‌که سطوح بیان ژن PDGFr فقط در گروه‌های مداخله سلول بنیادی و ترکیبی نسبت

بحث و نتیجه‌گیری
استئوآرتریت بیماری عمده‌ای مرتبط با اختلال مفصلی دژنراتیو است. گزینه‌های درمان برای استئوآرتریت چالش‌های

آپوپتوز جلوگیری کنند، مکانیسم‌های درگیر در سطح مولکولی هنوز روشن نشده‌اند (۲۹، ۳۰).

علیرغم اهمیت PDGF و IGF-1 به‌عنوان فاکتورهای مؤثر در تحریک تعمیر غضروف، در خصوص اهمیت اثرات آنابولیک مولکول‌ها بر روی کندروسیت‌ها تحقیقات کمی وجود دارد. فعال شدن گیرنده فاکتور رشد منجر به تنظیم بیان ژن درگیر در تکثیر سلول، بقا، مهاجرت یا پاسخ‌های ضدالتهابی می‌شود. تحقیقات نشان دادند که PDGF فعالیت NF-kB ناشی از اینترلوکین ۱ بتا را سرکوب می‌کند. چگونه PDGF فعالیت NF-kB ناشی از اینترلوکین ۱ بتا را در کندروسیت‌ها سرکوب می‌کند کاملاً شناخته‌نشده است. در پاسخ به اینترلوکین ۱ بتا فعال شدن NFkB به‌صورت پیوسته از طریق فعال کردن IKK، فسفوریلاسیون و جایگزینی IκB-α و درنهایت تخریب IκB-α و رهایی NF-kB ادامه می‌یابد (۳۱، ۳۲). البته PDGF می‌تواند فعالیت IKK را مهار کند. مراحل سیگنالی چندگانه که به فعال شدن NF-kB منتهی می‌شود کاملاً شناخته‌نشده است. علاوه بر تحقیقات انجام‌شده اخیر که پروتئین کیناز B (Akt)، IKK را فعال می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که PDGF فعالیت Akt ناشی از اینترلوکین ۱ بتا را مانند سرکوب Akt-IKK مهار می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که ممکن است PDGF فعالیت IKK را از طریق سرکوب فعالیت Akt مهار کند. علاوه بر این نشان داده‌شده است که اینترلوکین ۱ بتا کیناز c-Src را فعال می‌کند که در حقیقت موجب هدایت مسیر سیگنالی پایین‌رونده PI-3K/Akt می‌شود (۳۳). فاکتورهای رشد مانند IGF-1 و یا PDGF اثرات آنابولیکی و ضدالتهابی خود را برای حفظ پتانسیل کندروژنیک در کندروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی از طریق مهار مسیر سیگنالی NF-kB اعمال می‌کند. علاوه بر این چندین محقق گزارش داده‌اند که بسیاری از اثرات پیش‌التهابی اینترلوکین ۱ بتا و فاکتور نکروز تومور آلفا از طریق تحریک فاکتور رونویسی NF-kB تنظیم می‌شود که نقش مهمی در استئوآرتریت دارد که به تخریب غضروف و آسیب مفصلی منتهی می‌شود. سرکوب NF-kB از طریق PDGF فعالیت محصولات ژن تنظیم‌کننده NF-kB (MMP-9 and MMP-13, COX-2, caspase-3 cleavage) را تعدیل کرده که تا حدی اثرات ضدآپوپتوزی و ضدالتهابی PDGF را در کندروسیت‌ها شرح می‌دهد (۳۳، ۳۴). در تحقیق حاضر سطح بیان ژن PDGF

به گروه بیمار کاهش معناداری داشت. فاکتور رشد مشتق از پلاکت میتوز اصلی برای فیبروبلاست‌ها و سایر سلول‌های ارگان‌های مزانشیمی است. PDGF فاکتور مستعد میتوزنیک و شیمیایی قوی برای سلول‌های مزانشیمی اولیه شامل فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها و کندروسیت‌ها است و به‌این‌ترتیب اعتقاد بر این است که PDGF قادر به افزایش بازسازی بافت و ترمیم آن است (۲۴، ۲۵). گیرنده‌های PDGF در تعدادی از انواع سلول‌ها شامل کندروسیت‌ها و تعدادی از گیرنده‌هایی که به‌واسطه سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین ۱ تنظیم افزایشی دارند، مشخص شده است. افزایش تکثیر کندروسیت‌ها با غلظت PDGF از ۴/۷ به ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده‌شده که بیشترین شمار سلول‌ها در ۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر دیده شد (۲۶). قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض PDGF موجب افزایش در شمار سلول‌ها می‌شود، اما این اثر در مدت‌زمان ۱۰ روز کاهش می‌یابد و سلول‌های درمانی با PDGF تفاوت معناداری با سلول‌های غیر درمانی ندارند. پوهلرز و همکاران (۲۰۰۶) در پژوهشی به بررسی بیان ژن فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت C و D در غشای سینوویال بیماران مبتلابه روماتوئید آرتريت و استئوآرتریت پرداختند. نتایج تحقیق نشان داد که PDGF-C و PDGF-D توسط فیبروبلاست‌های سینوویال و ماکروفاژها در غشای سینوویال بیماران مبتلابه روماتوئید آرتريت و استئوآرتریت بیان می‌شوند. سطح پروتئین PDGF-D به‌طور معناداری در غشای سینوویال روماتوئید آرتريت بالاتر بود. علاوه بر این PDGF-D تکثیر فیبروبلاست سینوویال و بیان MMP-1 را تحریک می‌کند. این یافته‌ها ممکن است پیامدهای پاتولوژیک برای دگرگونی سلولی و نوآرایی ماتریکس در غشای سینوویال افراد مبتلابه استئوآرتریت زانو باشد (۲۷). همچنین گیرنده‌های PDGFR مانند PDGF-A و PDGF-B در سطوح بالایی در غشای سینوویال ملتهب بیماران مبتلابه آرتريت مزمن (روماتوئید آرتريت) در مقایسه با استئوآرتريت بیان می‌شوند (۲۸). حضور PDGF در غضروف آسیب‌دیده اثرات شیمیایی و میتوزنیک را بر روی سلول‌های احاطه‌کننده غضروف اعمال کرده و می‌تواند نفوذ سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تحریک کند. PDGF همچنین اثر مستقیمی بر روی تکثیر کندروسیت، تمایز و تولید پروتئوگلیکان غضروف دارد. اگرچه فاکتورهای رشد می‌توانند با ایجاد سیگنال‌های ضدآپوپتوز در کندروسیت از

خوک، گوسفند و اسب) با حضور این نوع سلول‌ها نسبت به حالت کنترل بدون سلول، با سرعت و کیفیت بهتری انجام گرفته است. نقش سلول‌های بنیادی در ترمیم غضروف به درستی اثبات شده است، ولی مکانیسم و روش ایجاد این ترمیم تاکنون مشخص نشده است. سلول‌های مزانشیمی بالاترین امنیت در استفاده از سلول درمانی در غضروف را دارند و این نوع سلول‌ها بیشترین استفاده بالینی را دارند (۳۵، ۳۶).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فاکتورهای رشد مانند PDGF اثرات آنابولیکی و ضدالتهابی خود را برای حفظ پتانسیل کندروژنیک در کندروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی از طریق مهار مسیر سیگنالی NF-kB اعمال می‌کند. سرکوب NF-kB از طریق PDGF فعالیت محصولات ژن تنظیم‌کننده NF-kB را تعدیل کرده که تا حدی اثرات ضدآپوپتوزی و ضدالتهابی PDGF را در کندروسیت‌ها شرح می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری در جهت کمک به انجام این تحقیق تشکر می‌نمایم. این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به شماره: R.IAU.SARI.REC.1397.8 تصویب شد.

تعارض منافع

این مقاله حاصل نتیجه پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی است که از دانشگاه مذکور و تمامی عوامل دخیل و همکار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تشکر می‌شود در ضمن حامی مالی ندارد و تعارض در منافع نیز وجود ندارد.

References

1. Gomoll A.H, Minas T. The quality of healing: articular cartilage, Wound Repair Regen.: Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc. 2014, 22 (1), 30–38.

PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتريت زانو بعد از هشت هفته تمرین نسبت به گروه کنترل افزایش یافت؛ درحالی‌که نسبت به گروه بیمار کاهش نشان داد، ولی به سطح معناداری نرسید. در مطالعه فورهاینزر و همکاران (۲۰۱۷) تحریک مکانیکی تحت شرایط استئوآرتريت بیان ژن FGF-2 را کاهش می‌دهد، اثری که ممکن است که یک تحریک مفید برای بیماران استئوآرتريت باشد. باوجوداینکه تحریک مکانیکی ملایم موجب افزایش معنادار در بیان ژن فاکتور رشد نشد، ترویج و مهاجرت سلولی در سلول‌های تحت درمان با محیط محافظت‌شده از سلول‌های تحریک‌شده مکانیکی تحت شرایط استئوآرتريت افزایش یافت (۳۵). فام و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به بررسی تأثیر درمان دارویی دیاسرین^۳ همراه با تحریک مکانیکی بر بیان ژن فاکتورهای رشد در کندروسیت‌ها پرداختند. بیان فاکتور نکروز تومور آلفا (PDGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF-A) در هر دو مداخله تنظیم کاهشی داشت. این احتمال وجود دارد که تحریکات مکانیکی متوسط بتواند تأثیر سودمندی بر سرنوشت سلول‌های کندروسیت داشته باشد (۳۵). در تحقیق حاضر سطح بیان ژن PDGFr و PDGF در بافت زانو موش‌های مبتلابه استئوآرتريت زانو بعد از هشت هفته تزریق سلول‌های بنیادی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت؛ درحالی‌که نسبت به گروه بیمار کاهش معناداری نشان داد. یکی از مهم‌ترین معایب کار با سلول‌های بنیادی مغز استخوان، توانایی حفظ پتانسیل تمایزی آن‌ها در محیط آزمایشگاه است. همچنین در کار با این نوع سلول، پیدا کردن مدل حیوانی مناسب برای تولید غضروف مفصلی، دشوار است که نیازمند مطالعات بیشتر به‌منظور درک بهتر زیست‌شناسی و رفتار این سلول‌ها است. مطالعاتی که به‌عنوان اثباتی مثبت برای استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان در نظر گرفته می‌شوند، نشان داده‌اند که ترمیم در مدل‌های حیوانی (موش، خرگوش،

2. Desai BJ, Gruber HE. Anti-apoptotic actions of cytokines in mammalian cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1999;221: 1–13.

³Diacerein, also known as diacetylrrhein, is a slow-acting medicine of the class anthraquinone used to treat joint diseases such as osteoarthritis



3. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!), *Osteoarthr. Cartil./OARS, Osteoarthr. Res. Soc.* 2013, 21, 16–21.
4. Rezaei FZ, Aslankhani MA, Farsi AR, Abdoli B, ZamaniSani SH. A comparison of three functional tests of balance in identifying fallers from non-fallers in elderly people. *Knowledge Health.* 2010; 4(4): 21-6. [In Persian].
5. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2006; 354:841-8.
6. Fernandez-Cuadros M. E, Perez-Moro O. S, Miron-Canelo J. A. Could Ozone be used as a feasible future treatment in osteoarthritis of the knee. *Diversity Equal Health Care.* 2016, 13(3), 232-9.
7. Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, Castillo J, Goni S, et al. The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 200; 234: 713–725.
8. Cao R, Brakenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Ostman A, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR and receptors. *FASEB J.* 2002; 16: 1575–83.
9. Kieswetter K, Schwartz A, Alderete M, Dean DD, Boyan BD. Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine* 1997; 6(3): 257e64.
10. Lee SJ. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* 2000; 41(6): 704e19.
11. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1237-47.
12. Quasnichka HL, Anderson-MacKenzie JM, Bailey AJ. Subchondral bone and ligament changes precede cartilage degradation- in guinea pig osteoarthritis. *Biorheology.* 2006; 43(3-4): 389-97.
13. Remmers EF, Sano H, Lafyatis R, Case JP, Kumkumian GK, Hla T, et al. Production of platelet derived growth factor B chain (PDGF-B/c-sis) mRNA and immunoreactive PDGF B-like polypeptide by rheumatoid synovium: coexpression with heparin binding acidic fibroblast growth factor-1. *J Rheumatol.* 1991; 18: 7–13.
14. Li S, L'Heureux N, Elisseff JH. Stem cell and tissue engineering. Singapore: World Scientific. 2011; 134: 211-30.
15. Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF_β-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 302–9.
16. Galois L. Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2004; 12: 779-786.
17. Cifuentes DJ. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010; 18: 1088-1095.
18. Mat S, Tan MP, Kamaruzzaman SB, Ng CT. Physical therapies for improving balance and reducing falls risk in osteoarthritis of the knee: A systematic review. *Age Ageing.* 2015, 44(1): 16-24.
19. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Madry H, Cucchiari M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning.* 2014; 7: 1-17.
20. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999; 401: 82–85.
21. Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 839–848.
22. Uutela M, Lauren J, Bergsten E, Li X, Horelli-Kuitunen N, Eriksson U, et al. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes. *Circulation.* 2001; 103: 2242–7.
23. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, et al. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood.* 2004; 104: 3198–204.
24. W. Zhang, H. Ouyang, C.R. Dass, J. Xu, Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis, *Bone Res.* 2016; 4: 15040.
25. Wu CY, Hsieh HL, Sun CC, Tseng CP, Yang CM. IL-1 beta induces proMMP-9 expression via c-Src-dependent PDGFR/PI3K/Akt/p300 cascade in rat brain astrocytes. *J Neurochem.* 2008; 105: 1499–1512.
26. Zwerner JP, May WA. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene.* 2001; 20: 626–33.

27. Pohlers D1, Huber R, Ukena B, KinneRW. Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):788-94.
28. Zhao Y, Liu B, Liu CJ. Establishment of a surgically-induced model in mice to investigate the protective role of progranulin in osteoarthritis. *J Vis Exp.* 2014; 84: 50924.
29. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 403-412.
30. Shapiro F, Koide S, C. ilimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone joint Surg Am.* 1993; 75:532-53.
31. Smith RJ, Justen JM, Sam LM, Rohloff NA, Ruppel PL, Brunden MN, et al. Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 1991;34(6):697e706.
32. Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM. Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res.* 1995;13(2):201e7.
33. Rubin K, Terracio L, Ronnstrand L, Heldin CH, Klareskog L. Expression of platelet-derived growth factor receptors is induced on connective tissue cells during chronic synovial inflammation. *Scand J Immunol.* 1988; 27:285-94.
34. Steinecker-Frohnwieser B, Kaltenegger H, Weigl L, Mann A, Kullich W, Leithner A, & Lohberger B. 2017. Pharmacological treatment with diacerein combined with mechanical stimulation affects the expression of growth factors in human chondrocytes. *Biochemistry and biophysics reports,* 11, 154-160. doi:10.1016/j.bbrep.2017.06.006
35. Pham PV. Stem cells in clinical applications: Bone and cartilage regeneration. Switzerland: Springer; 2017.
36. Uusi-Rasi K, Patil R, Karinkanta S, Tokola K, Kannus P, & Sievänen H. Exercise Training in Treatment and Rehabilitation of Hip Osteoarthritis: A 12-Week Pilot Trial. *Journal of osteoporosis.* 2017.

Original Article

Effect of Endurance Training and Stem Cell Injection on PDGF and PDGFr Gene Expression in Knee Tissue of Rats with Knee OsteoarthritisNiknam Kh¹, Barari A^{1*}, Abdi A¹, Farzanegi P²

1. Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Received: 26 Dec 2020

Accepted: 14 May 2020

Abstract

Background & Objective: Osteoarthritis is the most common musculoskeletal disorder characterized by loss of articular cartilage, bone changes and synovial membrane inflammation. The aim of the present study was to investigate the effect of endurance training and stem cell infusion on PDGF and PDGFr gene expression in knee tissue of rats with knee osteoarthritis.

Materials & Methods: To select the statistical sample, 37 male Wistar rats were randomly divided into five groups of seven: control (healthy), control (patient), stem cell, training and stem cell-training. The training program consisted of 25 to 29 minutes of running on the treadmill at 15 m / min for the first week, and every week 1 m/min was added until it reached 22 m / min in the eighth week. 48 hours after exercise training, samples were taken from the knee tissue. PDGF and PDGFr gene expression was measured by Real-Time PCR. One way ANOVA and Tukey post hoc test were used to determine the difference between groups.

Results: The results of this study showed that PDGF and PDGFr gene expression levels increased in the patient group compared to the healthy group ($P=0.00$, $P=0.00$). Also, PDGF gene expression levels significantly decreased in the training, stem cell and training-stem cell groups compared to the patient group ($P=0.05$, $P=0.025$); However, PDGFr gene expression levels were significantly decreased only in the stem cell and training-stem cell group compared to the patient group ($P=0.043$, $P=0.039$).

Conclusion: Growth factors such as PDGF exert their anabolic and anti-inflammatory effects to maintain chondrogenic potential by inhibiting the NF- κ B signaling pathway.

Keywords: Endurance Training, Stem Cells, PDGF and PDGFr, Osteoarthritis

*Corresponding Author: Barari Alireza, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
Email: alireza54.barari@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5199-463x>