Original Article

The effect of aerobic exercise with ozone and stem cell on anandamide concentration in desert rat with osteoarthritis

Rezaie M[1], Azarbayjani MA[1*], Peeri M[1], Hosseini SA[2]

1- Department of Sport Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Sport Physiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I.R. Iran.

Received: 2021/06/28 | Accepted: 2022/01/31

Abstract:

Background: Aerobic exercise, ozone therapy and cell therapy have each been independently proposed as treatments for osteoarthritis. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of aerobic exercise with ozone and cell therapy on serum levels of anandamide concentration in osteoarthritis rats.

Materials and Methods: Forty-five male rats were randomly divided into 9 groups, including 1 group: healthy control, 2-patient control, 3-exercise, 4-ozone therapy, 5-cell therapy, 6-exercise+ozone therapy, 7-exercise+cell therapy, 8-ozone+cell therapy and 9-ozone+cell therapy+exercise. Cell groups alone and combination cell therapy received 1×10^6cells/kg, and ozone groups alone and ozone combination therapies received 20µg/ml of ozone in 3 replications before exercise. The training program consisted of running on a treadmill at a speed of 16 meters per minute for 8 weeks. Forty-eight hours after the last exercise session, serum levels of anandamide were measured by Elisa.

Results: Findings showed that the serum level of anandamide in the osteoarthritis patient group was significantly reduced compared to the healthy group that exercise and ozone therapy led to a significant increase in the serum anandamide level; but cell therapy could not have a significant effect on increasing serum levels of anandamide. The peak of this increase was seen in ozone+cell therapy and the interaction of all three interventions simultaneously.

Conclusion: Although aerobic exercise and ozone therapy each independently have a positive effect on anandamide in people with osteoarthritis, but the interaction of all three interventions simultaneously with ozone+cell therapy is more effective.

Keywords: Aerobic exercise, Stem cell, Ozone therapy, Osteoarthritis, Anandamide

***Corresponding Author**
Email: ali.azarbayjani@gmail.com
Tel: 0098 912 317 2908
Fax: 0098 218 880 3071

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2022; Vol. 26, No 1, Pages 38-46

Please cite this article as: Rezaie M, Azarbayjani MA, Peeri M, Hosseini SA. The effect of aerobic exercise with ozone and stem cell on anandamide concentration in desert rat with osteoarthritis. ***Feyz*** 2022; 26(1): 38-46.

تأثیر تمرین هوازی همراه با اُزن و سلول بنیادی بر سطح سرمی آناندامید در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت

مریم رضایی [۱]، محمّدعلی آذربایجانی [۱*]، مقصود پیری [۱]، سیدعلی حسینی [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: تمرین هوازی، ازن‌تراپی و سلول‌درمانی هریک به‌طور مستقل به‌عنوان روش درمانی برای استئوآرتریت پیشنهاد شده‌اند. بنابراین، هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر تمرین هوازی همراه با ازن و سلول‌درمانی بر سطح سرمی آناندامید در موش‌های استئوآرتریتی است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۵ سر موش صحرایی نر به‌صورت تصادفی در ۹ گروه، شامل: گروه ۱- کنترل سالم، ۲- کنترل بیمار، ۳- تمرین، ۴- ازن‌تراپی، ۵- سلول‌درمانی، ۶- تمرین + ازن‌تراپی، ۷- تمرین + سلول‌درمانی، ۸- ازن + سلول‌درمانی و ۹- ازن + سلول‌درمانی + تمرین قرار گرفتند. گروه‌های سلول به‌تنهایی و درمان‌های ترکیبی با سلول، تعداد یک میلیون به‌ازای یک کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند و گروه‌های ازن به‌تنهایی و درمان‌های ترکیبی با ازن، در ۳ تکرار و قبل از شروع تمرین به‌مقدار ۲۰μg/ml ازن دریافت کردند. برنامه تمرین شامل دویدن روی نوار گردان با سرعت ۱۶ متر در دقیقه، به‌مدت ۸ هفته بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، سطح سرمی آناندامید به‌روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس سه‌راهه در سطح معنی‌داری آلفای ۰/۰۵ به‌دست آمد.

نتایج: یافته‌های مطالعه نشان داد که سطح سرمی آناندامید در گروه بیمار استئوآرتریتی در مقایسه با گروه سالم کاهش معنی‌داری داشت که تمرین و ازن‌تراپی منجر به افزایش معنی‌دار آناندامید گردید؛ اما سلول‌درمانی نتوانست اثر معنی‌داری بر افزایش سطح سرمی آناندامید داشته باشد. اوج این افزایش در ازن + سلول‌درمانی و تعامل هر سه مداخله به‌طور همزمان دیده شد.

نتیجه‌گیری: هرچند تمرین هوازی و ازن‌تراپی هریک به‌طور مستقل اثر مثبتی بر آناندامید در افراد مبتلا به استئوآرتریت دارند؛ اما تعامل هر سه مداخله به‌طور همزمان و ازن + سلول‌درمانی مؤثرتر است.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، سلول بنیادی، ازن‌تراپی، استئوآرتریت، آناندامید

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۱، صفحات ۴۶-۳۸

مقدمه

استئوآرتریت (Osteoarthritis-OA) بیماری تخریبی پیش‌رونده مفصلی است و به‌عنوان پدیده فعال بیومکانیکی، بیوشیمیایی و سلولی شناخته و [۱،۲] پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۴۰ بیش از ۲۵ درصد جمعیت جهان را به خود مبتلا سازد [۱]. درحال‌حاضر، OA عامل اصلی درد مزمن متوسط تا شدید و ناتوانی در جهان به‌شمار می‌رود [۲]. طبق آمار، ۲۰ درصد مردم جهان از دردهای مزمن متوسط تا شدید رنج می‌برند [۳]. بااین‌حال OA، به‌دلیل عدم توانایی خودترمیمی غضروف مفصلی، ازجمله چالش‌برانگیزترین بیماری‌ها به‌شمار می‌رود [۲].

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:

تهران، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۹۱۲۳۱۷۲۹۰۸ دورنویس: ۰۲۱۸۸۸۰۳۰۷۱

پست الکترونیک: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۷ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱

اگرچه اثرات ضددرد ناشی از فعالیت ورزشی مستند شده، اما همچنان مکانیسم‌های آن به‌خوبی مشخص نشده است. برخی از مطالعات نشان داده که اکسید نیتریک و نوراپی‌نفرین در این اثر نقش دارند، اما سایر واسطه‌های ضددردی درون‌زا نیز ممکن است در آن سهیم باشند [۳]. در این میان، اندوکانابینوئیدها (Endocannabinoids) بسیار موردتوجه قرار گرفته‌اند و چندین مطالعه اهمیت آن‌ها را در کنترل درد نشان داده است [۴]. سیستم اندوکانابینوئید (Endocannabinoids System-ECS)، سیستم تنظیم‌کننده عصبی است که مطالعات پیش‌بالینی نشان می‌دهد توانایی تبدیل‌شدن به موارد جدید مولکولی برای تهیه دارو با هدف بهبود درد مزمن، مانند درد ناشی از OA را دارند [۲]. ECS شامل گیرنده‌های کانابینوئید، لیگاندهای داخلی آن‌ها و آنزیم‌های سنتزی و متابولیکی است. گیرنده‌های کانابینوئید از نوع یک (CB1) و نوع دو (CB2) تشکیل می‌شوند. همچنین مهم‌ترین لیگاندهای گیرنده درون‌زا شامل آناندامید (Anandamide-AEA) و دو آراشیدونوئیل گلیسرول (2-Arachidonoylglycerol-2-AG) می‌شوند [۳،۴]. Petrosino و همکاران [۵] و Starowicz و همکاران [۶] در مطالعات خود

نشان دادند که سطوح آناندامید در نخاع حیوانات نوروپاتیک و OA تغییر یافته که تأکید بر اهمیت آن در پردازش دردهای مزمن دارد. در این‌راستا، نتایج مطالعه Bryk و همکاران [۲] نشان داد که سطوح بیان ژن گیرنده‌های کانابینوئید در سطح نخاعی و TRPV1 و همچنین آنزیم‌های دخیل در سنتز و تجزیه آناندامید در مرحله OA پیشرفته افزایش یافت. Valastro و همکاران [۷] نشان دادند که آناندامید در مایع سینوویال زانو در سگ‌های استئوآرتریتی وجود دارد. علاوه‌براین، Richardson و همکاران [۸] نیز افزایش سطح آناندامید را در مایع مفصلی جمع‌آوری‌شده از بیماران مبتلا به OA و روماتوئید آرتریت در مقایسه با گروه کنترل سالم گزارش کردند. بااین‌حال، ECS، از ارتباط بین درد و فعالیت ورزشی پشتیبانی می‌کند. به‌طوری‌که Galdino و همکاران [۳] گزارش کردند که فعالیت ورزشی سیگنالینگ اندوکانابینوئید را افزایش می‌دهد و باعث ایجاد حساسیت در گیرنده‌های کانابینوئیدی در مغز موش می‌شود. همچنین Watkins و همکاران [۹] نشان دادند که سطوح پایین فعالیت جسمانی با سطح آناندامید پلاسما در زنان ارتباط مثبت دارد. در همین‌راستا، Sparling و همکاران [۴] نشان دادند که فعالیت ورزشی حاد با افزایش سطح پلاسمای آناندامید در انسان همراه است. علاوه‌براین، مطالعات اخیر به قابلیت‌های درمانی جدید سلول‌های بنیادی اشاره کرده‌اند [۱۰-۱،۱۴]. قابلیت استخراج و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-MSCs) به مقادیر بالا و امکان تمایز به سلول‌های مختلف، این سلول‌ها را به‌عنوان مناسب‌ترین گزینه برای ترمیم بافت غضروف‌های آسیب‌دیده مطرح ساخته است و مطالعات متعدد نشان‌دهنده اثرات بسیار خوب سلول‌های بنیادی در درد و بهبود کیفیت زندگی بیماران است [۱۴،۱۱،۱]. به‌نظر می‌رسد MSC انواع کموکاین‌ها و سیتوکین‌های ضدالتهابی را در بافت غضروف بیان می‌کند و با تعدیل متابولیسم غضروف و کاهش التهاب در درمان OA مؤثر است [۱۳]. اخیراً اظهار شده است که ازن‌تراپی نیز با مکانیسم کاهش التهاب و افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت آسیب‌دیده اثرات ضددرد ایجاد می‌کند. در این‌راستا، رضایی و همکاران [۱۴] نشان دادند که تمرین هوازی، تزریق ازن و MSCs هر یک به‌تنهایی با افزایش بیان ژن CB1 و GABA منجر به کاهش درد در موش‌های صحرایی مبتلا به OA زانو گردید. همچنین، ترکیباتی از تمرین + ازن‌تراپی و ازن‌تراپی + MSCs اثرات مطلوبی بر مسیر ضددرد در OA مدل حیوانی دارند. با این‌حال، مکانیسم دقیق اثرات ضددرد ازن‌تراپی و MSCs کاملاً شناخته نشده است. تحقیقات در زمینه تزریق ازن و MSCs و نیز قابلیت درمانی آن‌ها بر OA بسیار محدود است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. از آن‌جایی‌که OA با افزایش درد ناشی از آسیب مفصلی در ارتباط است و ازطرفی تمرینات هوازی، تزریق ازن و MSCs با کاهش درد مفاصل درگیر عارضه همراه است، اما تاکنون تأثیر تزریق ازن و MSCs و ترکیب آن با تمرین هوازی بر آناندامید به‌صورت تعاملی موردبررسی قرار نگرفته است. از همین‌روی مطالعه حاضر به‌دنبال بررسی اثرات تعاملی مطلوب‌تر متغیر مذکور است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که در آن از ۴۵ سر موش صحرایی نر سالم بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. نمونه حیوانی از انستیتو پاستور ایران تهیه و در آزمایشگاه مرکز تحقیقاتی بافت و ژن پاسارگاد تهران نگهداری شدند که به‌صورت تصادفی در ۹ گروه پنج‌تایی (طبق مطالعات صورت‌گرفته) [۱۵] شامل گروه‌های: ۱- کنترل سالم، ۲- کنترل بیمار، ۳- بیمار + تمرین، ۴- بیمار + ازن‌تراپی، ۵- بیمار + سلول‌درمانی، ۶- بیمار + تمرین + ازن‌درمانی، ۷- بیمار + تمرین + سلول‌درمانی، ۸- بیمار + ازن + سلول‌درمانی و ۹- بیمار + ازن + سلول‌درمانی + تمرین قرار گرفتند. موش‌های صحرایی در قفس‌هایی با جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو نگهداری شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد کنترل و ثبت می‌شد. چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعت بود. غذای موش‌های صحرایی از خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه شد و به‌روش پلت، به شکل نامحدود در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت. آب موردنیاز نیز به‌صورت آزاد در بطری‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر ویژه حیوانات آزمایشگاهی تأمین شد.

نحوه القای استئوآرتریت: در مطالعه حاضر، برای ایجاد OA در موش‌ها از روش مداخله مستقیم استفاده شد. ابتدا موش‌ها با داروی کتامین و زایلازین بیهوش شدند و بعد از شیوکردن زانوی پای راست، یک برش افقی در بخش داخلی زانو ایجاد شد. پس از کنارزدن پوست، لیگامان داخلی جانبی زانو کنار زده شد تا مینیسک داخلی مشاهده گردد. سپس یک برش ناقص به‌منظور پارگی و آسیب در مینیسک ایجاد شد و درنهایت ناحیه به روش استریل بخیه زده شد [۱۶]. گفتنی است که تمام مراحل کار توسط دامپزشک و دستیار انجام گرفت.

تهیه و کشت سلولی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت مغز استخوان موش، از استخوان‌های درشت‌نی (تیبیا) و ران (فمور) موش صحرایی

استخراج شد. بدین‌منظور، موش‌های موردنظر به‌وسیله کلروفرم بیهوش و کشته شدند. سپس توسط کیت جراحی، استخوان‌های درشت‌نی و ران آن‌ها جدا شد. در مرحله بعد، قسمت اپی‌فیز استخوان‌ها شکسته و مغز استخوان ازطریق آسپیراسیون با محیط کشت خارج گردید. در ادامه، سلول‌ها در محیط کشت (Gibco, USA) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) DMEM حاوی ۲۰ درصد (Gibco, USA) (Foetal Bovine Serum) FBS و ۱ درصد (Gibco, USA) (Penicilline-Streptomycin) Penstrep در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO_2، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شدند. محیط کشت، هفته‌ای ۳ بار تعویض و برای برداشت‌کردن سلول‌ها از محلول تریپسین / EDTA استفاده شد. درنهایت، سلول‌ها با بقای ۹۸ درصد، پس از بررسی با رنگ تریپان‌بلو، برای هر موش تعداد ۱ میلیون بر کیلوگرم وزن بدن [۱۸]، سلول آماده‌سازی شد و سلول‌ها پس از بیهوشی کامل حیوان در گروه‌های درمان با سلول و در طی دوره ریکاوری (۳ هفته پس از جراحی) به‌عنوان یک‌بار تزریق در محلّ القای مدل، تزریق شدند. همچنین، در گروه ازن + سلول‌درمانی بعد از تزریق ازن و در هفته چهارم تزریق MSCs به‌عنوان یک‌بار تزریق با همین دوز اعمال شد. همچنین این سلول‌ها پس از پاساژ سوم از نظر مارکر CD90، مثبت و از نظر مارکر CD45 منفی بودند و قابلیت تمایزی داشتند که تأییدی بر ماهیت بنیادی‌بودن آن‌ها است. به‌منظور ازن‌تراپی، اکسیژن وارد دستگاه ازن‌ساز و در آن‌جا با استفاده از جریان الکتریسیته ازن تولید شد. سپس سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری به خروجی ژنراتور وصل شد و ۱۰ ml از گاز تولیدشده به‌کار گرفته شد تا ازن با غلظت ۲۰ ηg/ml حاصل شود. در گروه‌های درمان با ازن، ۳ هفته پس از جراحی، در ۳ تکرار، در زمان‌های مختلف و به‌مدت ۳ هفته متوالی قبل از شروع برنامه تمرینی برای هر موش در خطّ مفصلی تیبیوفمورال به‌مقدار 20 ηg/ml تزریق شد [۱۹]. پروتکل تمرین: یک‌ماه بعد از عمل جراحی، یک‌هفته صرف آشنایی و سازگاری با محیط پژوهش و نوار گردان شد. بدین‌منظور موش‌ها در این مرحله سه روز در هفته، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶ متر در دقیقه حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد VO_{2max} و شیب صفر درصد روی تردمیل فعالیت کردند. برای اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max}) به‌دلیل عدم دسترسی به ابزار مستقیم (مانند دستگاه تجزیه‌وتحلیل گازهای تنفسی) و با توجه به مطالعه هویدال و همکاران [۲۰]، پروتکل غیرمستقیم با دقت زیاد مورداستفاده قرار گرفت. گفتنی است که برای دویدن موش‌ها از محرک اجباری استفاده نشد. برنامه تمرین، شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در هفته اوّل با رعایت اصل اضافه‌بار به‌صورت پیش‌رونده بود که به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید. همچنین، پنج دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه، قبل و بعد از تمرین برای گرم‌وسرد کردن حیوانات اختصاص یافت. گروه کنترل در طول اجرای تمرین فقط روی تردمیل ایستادند و دستگاه روشن نمی‌شد [۲۱].

اندازه‌گیری آناندامید

همه حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به‌دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات، با تزریق داخل‌صفاقی کتامین و زایلون بیهوش و قربانی شدند و سپس نمونه‌های سرم در دمای اتاق به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه لخته و بعد در ۳۰۰۰ – ۲۰۰۰ دور در دقیقه در حدود ۱۰ دقیقه و در ۳ مرحله سانتریفیوژ شدند تا سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ جدا و جمع‌آوری شود. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در دمای ۲۰- درجه فریز شدند. برای اندازه‌گیری میزان آناندامید از کیت‌های تجاری Elisa ساخت شرکت زل‌بایو کشور آلمان با طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شد [۱۶].

روش‌های آماری

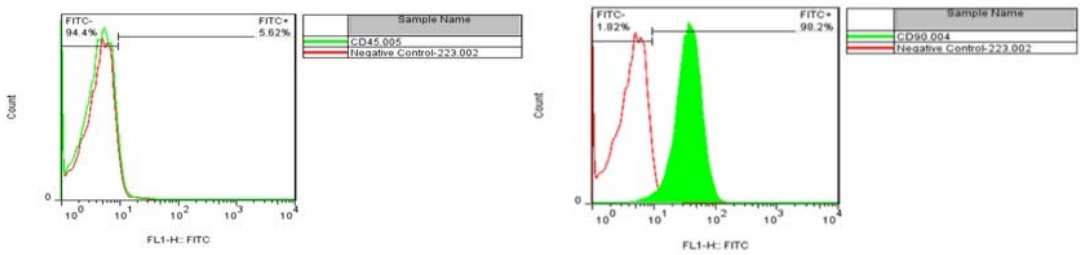
به‌منظور تجزیه‌وتحلیل یافته‌ها از آزمون‌های آماری شاپیرو – ویلک (جهت تعیین نرمال‌بودن توزیع داده‌ها)، بونفرونی (جهت تعیین محلّ اختلاف بین گروهی)، t مستقل (جهت تعیین اثر القای OA بر پیامدهای مورد مطالعه گروه‌های کنترل سالم و بیمار) و آنالیز واریانس سه‌راهه استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ انجام گردید.

کد اخلاق: با توجه به گستردگی کار تحقیقاتی، این کار به‌صورت تیمی انجام شد و جهت پروتکل طرح، کد اخلاق با شناسه IR.IAU.SARI.REC.1398.133 صادر شده است.

نتایج

نتایج فلوسیتومتری

در مطالعه حاضر، پس از پاساژ سوم از روش فلوسایتومتری، به‌منظور تأیید مزانشیمی‌بودن سلول‌های بنیادی استفاده شد. مارکرهای مورد استفاده CD90 و CD45 به‌ترتیب به‌عنوان مارکرهای مثبت و منفی بودند که در شکل شماره ۱ نمودارهای فلوسایتومتری این مارکرها ارائه شده است.



نمودار شماره ۱- نمودار فلوسیتومتری، نشان‌دهنده میزان بیان CD90 (سمت راست) و CD45 (سمت چپ) در سلول‌های مزانشیمی جداشده از مغز استخوان

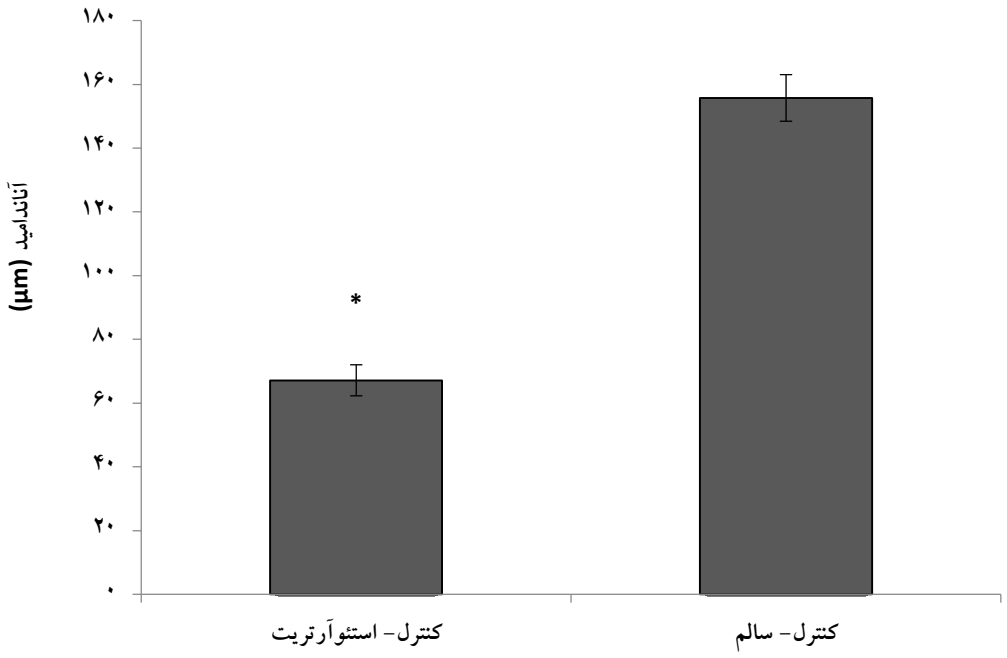
نتایج نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که میزان بیان مارکر CD90 به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۹۷/۸±۰/۴ بود. درصورتی‌که میزان بیان مارکر منفی سلول‌های مزانشیمی یا به‌عبارتی سلول‌های بنیادی خون‌ساز که می‌تواند به‌صورت ناخالص در جمعیت سلول‌های مزانشیمی حضور داشته باشد، به پایین‌ترین حدّ خود یعنی ۲/۱۲ ± ۷/۷۴ رسید.

نتایج اثر تمرین هوازی، ازن‌تراپی و MSCs بر سطح سرمی آناندامید

آزمون t مستقل جهت بررسی میزان اثر القای OA بر آناندامید در دو گروه القای OA و سالم مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج این آزمون در ارتباط با سطح سرمی آناندامید در هر دو گروه بیمار استئوآرتریتی و کنترل سالم در جدول شماره ۱ ارائه شده است. داده‌های جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که t به‌دست‌آمده از t جدول (t=۹/۶۹۳) بزرگ‌تر بود و تفاوت معنی‌داری در آناندامید بین گروه‌های القای OA و سالم در رت‌های نر وجود داشت. به‌گونه‌ای‌که میزان آن در گروه سالم نسبت به گروه بیمار به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P=۰/۰۰۱) که جهت درک بهتر شکل شماره ۲ ارائه شده است. به‌علاوه، نتایج آزمون تحلیل واریانس سه‌راهه جهت تعیین اثر تمرین، MSCs و ازن‌تراپی بر سطح سرمی آناندامید در رت‌های استئوآرتریتی‌شده در جدول شماره ۲ ارائه شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون تحلیل واریانس سه‌راهه مشخص شد که تمرین هوازی (η=۰/۷۴۹، P=۰/۰۰۱، F=۱۱۹/۲۱) و ازن‌تراپی (η=۰/۹۰۹، P=۰/۰۰۱، F= ۳۹۸/۵۳) اثر معنی‌داری بر آناندامید داشتند (P=۰/۰۰۱). از آن‌جایی‌که عامل تمرین در دو سطح انجام تمرین و عدم تمرین یا همان گروه کنترل و نیز ازن‌تراپی در دو سطح ازن‌تراپی و عدم آن یا کنترل در نظر گرفته شد، نتایج آزمون‌های دوبه‌دو در جدول شماره ۳ ارائه شده است که نتایج آزمون بونفرونی نشان داد که آناندامید در پایان دوره به‌طور معنی‌داری در گروه‌های تمرین و ازن‌تراپی بیشتر از گروه کنترل (P= ۰/۰۰۱) بود. به‌علاوه، نتایج نشان داد که MSCs بر سطح سرمی آناندامید در موش‌های صحرایی مبتلا به OA معنی‌دار نبود (η=۰/۰۰۲، P= ۰/۸۰۲، F=۰/۰۶۳). در گروه‌های درمان ترکیبی، تعامل تمرین + MSCs (η=۰/۰۳۱، P=۰/۲۶۲، F= ۱/۲۹) و تعامل تمرین + ازن‌تراپی (η=۰/۰۷۵، P=۰/۰۸۰، F=۳/۲۲) اثر معنی‌داری بر سطح سرمی آناندامید نداشت. با این‌وجود، تعامل MSCs + ازن‌تراپی (η=۰/۵۲۰، P=۰/۰۰۱، F=۴۳/۳۹) و تعامل بین تمرین + MSCs + ازن‌تراپی (η=۰/۲۸۶، P=۰,۰۰۱، F=۱۶/۰۲) بر افزایش سطح سرمی آناندامید در موش‌های صحرایی مبتلا به OA معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۱) که جهت درک بهتر شکل شماره ۳ ارائه شده است.

جدول شماره ۱- نتایج آزمون t مستقل بر سطح سرمی آناندامید

شاخص آناندامید	میانگین	انحراف استاندارد	df	ارزش t	ارزش P
استئوآرتریت	۶۷/۱۴	۴/۹۰	۱۰	۲۴/۶۲	۰/۰۰۱
سالم	۱۵۵/۷۸	۷/۳۲			



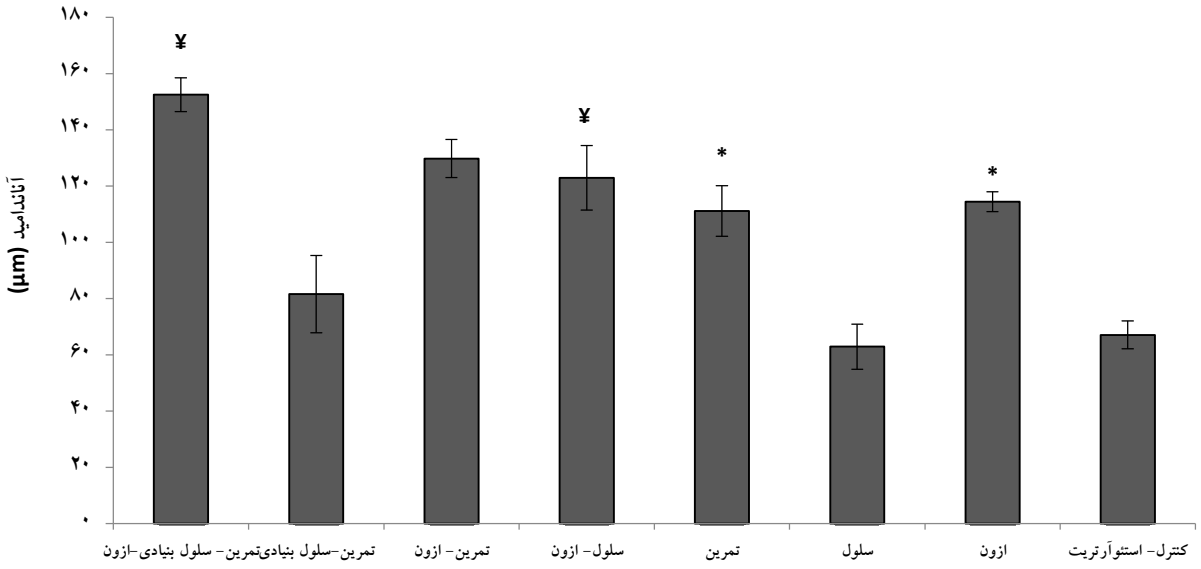
نمودار شماره ۲- مقایسه آناندامید در گروه کنترل سالم و کنترل القای استئوآرتریت * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم

جدول شماره ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس سه‌راهه بر سطح سرمی آناندامید نسبت به گروه کنترل سالم

عامل	مجموع مربعات	Df	میانگین مربعات	F	sig	اندازه اثر
تمرین	۸۷۰۴/۲۷	۱	۸۷۰۴/۲۷	۱۱۹/۲۱	۰/۰۰۱	۰/۷۴۹
سلول بنیادی	۴/۶۰	۱	۴/۶۰	۰/۰۶۳	۰/۸۰۲	۰/۰۰۲
ازن‌تراپی	۲۹۰۹۷/۴۸	۱	۲۹۰۹۷/۴۸	۳۹۸/۵۳	۰/۰۰۱	۰/۹۰۹
تمرین + سلول بنیادی	۹۴/۴۸	۱	۹۴/۴۸	۱/۲۹	۰/۲۶۲	۰/۰۳۱
تمرین + ازن	۲۳۵/۶۸	۱	۲۳۵/۶۸	۳/۲۲	۰/۰۸۰	۰/۰۷۵
سلول بنیادی + ازن‌تراپی	۳۱۶۸/۵۱	۱	۳۱۶۸/۵۱	۴۳/۳۹	۰/۰۰۱	۰/۵۲۰
تمرین + سلول بنیادی + ازن‌تراپی	۱۱۶۹/۶۸	۱	۱۱۶۹/۶۸	۱۶/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۲۸۶

جدول شماره ۳- نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی بر سطح سرمی آناندامید در گروه‌های تمرین، ازن‌تراپی و کنترل

متغیر	گروه	گروه‌ها	میانگین تفاوت‌ها	خطای انحراف	سطح معنی‌داری
آناندامید	تمرین	کنترل	۲۶/۹۳	۲/۴۶	۰/۰۰۱
	ازن‌تراپی	کنترل	۴۹/۲۴	۲/۴۶	۰/۰۰۱



نمودار شماره ۳- تغییرات سطح سرمی آناندامید در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است. (* نشانه اثر معنی‌دار بر افزایش سطح سرمی آناندامید و ¥ نشانه اثرات تعاملی معنی‌دار بر افزایش سطح سرمی آناندامید)

بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات تمرین هوازی همراه با تزریق داخل مفصلی ازن و MSCs بر سطح سرمی آناندامید در موش‌های صحرایی مدل OA انجام گرفت. طبق نتایج این مطالعه، ایجاد مدل استئوآرتریتی در موش‌های صحرایی با کاهش معنی‌دار سطح سرمی آناندامید همراه بود. در مطالعات اخیر به نقش سیستم اندوکانابینوئید در پاتوژنز و پیشرفت OA اشاره شده است و احتمال دارد که درد ازطریق گیرنده‌های کانابینوئیدی تعدیل گردد [۲]. در همین‌راستا، داده‌ها بیانگر این می‌باشد که در طول پیشرفت استئوآرتریت، آنزیم‌های سنتز و تجزیه AEA در سطوح نخاعی و موضعی تغییر می‌کند. بنابراین، فعال‌سازی مسیر اندوکانابینوئید در نتیجه تغییرات آناندامید که لیگاند اصلی گیرنده‌های CB1 و CB2 می‌باشد؛ می‌تواند منجر به کاهش میزان درد در بیماری استئوآرتریت گردد [۵،۶]. تمرینات ورزشی به‌طور فزاینده‌ای توسط مراقبت‌های بهداشتی برای شرایط درد مزمن ترویج می‌شود. با این‌وجود، دانش موجود درمورد پیامدهای بیوشیمیایی تمرینات ورزشی در درد مزمن پایین بوده و پیشنهاد شده است که سیستم اندوکانابینوئید نقشی در پاداش حادّ ناشی از ورزش و مهار درد ایفا کند. در همین‌راستا، Stensson و همکاران [۲۲]، در مطالعه‌ای که به بررسی پیامدهای مزمن تمرین مقاومتی بر سطوح اندوکانابینوئیدها و غلظت پلاسمایی آناندامید در فیبرومیالژیا پرداختند؛ مشخص شد که پس از برنامه تمرینی ۱۵ هفته‌ای، سطوح آناندامید که به‌عنوان فعال‌کننده گیرنده‌های کانابینوئیدی شناخته می‌شود؛ به‌طور معنی‌داری افزایش و درنتیجه شدت درد کاهش یافت. همسو با این مطالعه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در گروه تمرین نسبت به گروه مبتلا به OA، میزان آناندامید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این موضوع نشان می‌دهد که تمرین هوازی موجب تحریک سلول‌های اندوکانوبینوئیدی و درنتیجه ترشح آناندامید می‌شود. بنابر تحقیقات، مسیر سیگنالی ضدّدردی تمرینات ورزشی به توسعه و افزایش بیان نوروترانسمیترها در سیستم عصبی وابسته است که این عوامل شامل افزایش بیان سروتونین، اپیوئیدها، افزایش فعالیت میکرواوپیوئیدها، گیرنده‌های کانابینوئیدی، افزایش N-Methyl-D-aspartate (NMDA) و ناقل سروتونین می‌شود [۲۳]. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، مشخص شد که در گروه ازن‌تراپی سطح سرمی آناندامید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. مشابه نتایج مطالعه حاضر، نتایج مطالعه رضایی و همکاران [۱۴] نشان داد که تزریق درون مفصلی ازن منجر به فعال‌سازی مسیر اندوکانابینوئید در موش‌های صحرایی مبتلا به OA گردید. بر پایه تحقیقات، مشخص شده است که ازن‌درمانی با مکانیسم کاهش التهاب مفصلی و افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت آسیب‌دیده، اثرات ضددردی خود را القا می‌کند [۲۴]. ازطرفی، سلول‌های بنیادی به دلایل مختلفی چون اثرات پاراکرین، فعالیت ضدالتهابی و ظرفیت تعدیل سیستم ایمنی بدن، نقش مهمّی در OA داشته، به‌عنوان روش درمانی جدید در OA محسوب می‌شود [۱۱،۱۲]. در این‌راستا، Mancuso و همکاران [۱۱] در مطالعه خود اظهار داشتند که تزریق MSCs می‌تواند درد را کاهش داده، از غضروف محافظت کند. همچنین، Freitag و همکاران [۲۵] در مطالعه خود

عنوان کردند که MSCs می‌تواند با کاهش سطوح سیتوکین‌های پیش‌التهابی و التهابی و همچنین افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی منجر به تعدیل عوامل رشد و متابولیک استخوان شده، درنتیجه سروتونین و گیرنده‌های کانابینوئیدی در بیماران مبتلا به OA را تعدیل کند. با این‌وجود، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تزریق MSCs در موش‌های صحرایی مدل استئوآرتریتی در افزایش سطح سرمی آناندامید معنی‌دار نبود که با مطالعات ذکرشده ناهمسو بود. از آن‌جایی‌که شکل اصلی افراد مبتلا به OA محدودیت حرکتی ناشی از درد مفصلی می‌باشد که این شرایط منجر به بی‌تحرکی و توسعه روند بیماری و درنتیجه افزایش ناتوانی برای شخص مبتلا می‌گردد؛ بنابراین عبدی‌زاده و همکاران [۲۶] در مطالعه‌ای گزارش کردند که در اثر القای OA مسافت کلّ طی‌شده به‌عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین؛ در صورت افزایش توانایی حرکتی، میزان تولید آناندامید نیز که لیگاند اصلی گیرنده‌های CB-1 و CB-2 می‌باشد، افزایش می‌یابد. اوج افزایش سطح سرمی آناندامید نسبت به گروه کنترل در گروه‌های ترکیبی، در گروه استفاده همزمان از ازن + سلول‌درمانی و تعامل هر سه مداخله نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی این مداخلات بر افزایش سطح سرمی آناندامید در OA بود. اگرچه اطلاعات درمورد چگونگی مکانیسم اثر MSCs بر سطح سرمی آناندامید مشخص نیست، اما به‌نظر می‌رسد که تزریق درون مفصلی ازن و MSCs به‌طور سینرژیستی و با مسیر کاهش التهاب مفصلی و تنظیم عوامل متابولیک و ترمیم استخوان [۱۳،۲۳] موجب افزایش گیرنده‌های کانابینوئیدی گردد [۱۴]. همچنین جلیلیان و همکاران [۱]، گیلانی و همکاران [۲۷]، جلیلیان و همکاران [۱۶] و اسدی و همکاران [۱۳] نیز به حمایت از تعامل هر سه مداخله استفاده‌شده در این مطالعه در بهبود وضعیت OA نمونه‌های حیوانی پرداختند. از آن‌جایی‌که در افراد مبتلا به OA، محدودیت حرکتی ناشی از درد مفصلی، مشکل اصلی این بیماران محسوب می‌شود که می‌تواند با افزایش بی‌تحرکی منجر به توسعه روند بیماری و درنتیجه ایجاد ناتوانی بیشتر گردد. بنابراین، تفاوت مطالعه اسدی و همکاران [۱۳] با مطالعه حاضر را با توجه به مطالعات بیان‌شده می‌توان این‌گونه بیان نمود که سلول‌درمانی و یا ازن‌درمانی با وجود دارابودن ویژگی‌های ضدالتهابی و ضددردی می‌توانند موجب افزایش توانایی فرد برای انجام فعالیت جسمانی گردند [۲۶]؛ که در این‌صورت میزان تولید آناندامید که لیگاند اصلی گیرنده‌های کانابینوئیدی می‌باشد، افزایش می‌یابد. ازطرفی، با توجه به فعال‌شدن مسیر اندوکانابینوئید [۱۴] حاصل از افزایش آناندامید، میزان درد کاهش و تحمل درد افزایش خواهد یافت. بنابراین، با افزایش تحمل درد، توانایی حرکتی این بیماران نیز افزایش [۲۶] و روند بیماری کاهش می‌یابد. باتوجه به مطالعات، می‌توان گفت که مطالعات محدودی در ارتباط با تعامل هر سه مداخله روی مسیرهای درد و ضددرد در مبتلایان به OA صورت گرفته است. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم استفاده از شیوه‌های سنجش درد (آزمون فرمالین، صفحه داغ و پس‌کشیدن دم موش) به‌جهت اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده اشاره کرد که علت عدم بررسی، کمبود بودجه پژوهش بوده است؛ بنابراین توصیه می‌شود در تحقیقات آتی لحاظ گردد.

نتیجه‌گیری

هرچند تمرین هوازی و ازن‌تراپی هریک به‌طور مستقل اثر مثبتی بر آناندامید در افراد مبتلا به استئوآرتریت دارند؛ اما تعامل هر سه مداخله به‌طور همزمان و ازن + سلول‌درمانی مؤثرتر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی عزیزانی که در انجام این مطالعه همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

References:

[1] Jalilian J, Behpoor N, Farzanegi P. Effect of Aerobic Training in Combination with Stem Cells on Inflammatory Biomarker Levels in the Heart Tissue of Rat Model of Osteoarthritis. ***J Ilam Univ Med Sci*** 2020; 28(1): 12-26. [in Persian]

[2] Bryk M, Chwastek J, Kostrzewa M, Mlost J, Pędracka A, Starowicz K. Alterations in anandamide synthesis and degradation during osteoarthritis progression in an animal model. ***Int J Mol Sci*** 2020; 21(19): 7381.

[3] Galdino G, Romero T, da Silva JF, Aguiar D, de Paula AM, Cruz J, et al. Acute resistance exercise induces antinociception by activation of the endocannabinoid system in rats. ***Anesth Analg*** 2014; 119(3): 702.

[4] Sparling P, Giuffrida A, Piomelli D, Rosskopf L, Dietrich A. Exercise activates the endocannabinoid system. ***Neuro Report*** 2003; 14(17): 2209-11.

[5] Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. ***Neuropharmacology*** 2007; 52(2): 415-22.

[6] Starowicz K, Makuch W, Korostynski M, Malek

N, Slezak M, Zychowska M, et al. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. ***PloS One*** 2013; 8(4): e60040.
[7] Valastro C, Campanile D, Marinaro M, Franchini D, Piscitelli F, Verde R, et al. Characterization of endocannabinoids and related acylethanolamides in the synovial fluid of dogs with osteoarthritis: A pilot study. ***BMC Vet Res*** 2017; 13(1): 1-5.
[8] Richardson D, Pearson RG, Kurian N, Latif ML, Garle MJ, Barrett DA, et al. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. ***Arthritis Res Ther*** 2008; 10(2): 1-4.
[9] Watkins BA. Endocannabinoids, exercise, pain, and a path to health with aging. ***Mol Aspects Med*** 2018; 64: 68-78.
[10] Chahal J, Gómez-Aristizábal A, Shestopaloff K, Bhatt S, Chaboureau A, Fazio A, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cell treatment in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation. ***Stem Cells Transl Med*** 2019; 8(8): 746-57.
[11] Mancuso P, Raman S, Glynn A, Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: the critical role of the cell secretome. ***Front Bioeng Biotechnol*** 2019; 9.
[12] Ham O, Lee CY, Kim R, Lee J, Oh S, Lee MY, et al. Therapeutic potential of differentiated mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. ***Int J Mol Sci*** 2015; 16(7): 14961-78.
[13] Asadi S, Farzanegi P, Azarbayjani MA. Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF-α in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. ***Soc Determ Heal*** 2018; 4(3): 162-70. [in Persian]
[14] Rezaie M, Azarbayjani MA, Peeri M, Hosseini SA. The effect of exercise, Ozone, and Mesenchymal stem cells therapy on CB-1 and GABA Gene expression in the cartilage tissue of rats with knee osteoarthritis. ***Pharm Biomed Res*** 2020; 6(1): 45-52. [in Persian]
[15] Kaya A, Sonmez M, Kar T, Haholu A, Yildirim Y, Müftüoğlu T, et al. Efficiency of ozone therapy in a rat model of experimental uveitis. ***Ocul Immunol Inflamm*** 2017; 25(5): 700-5.
[16] Jalilian J, Behpour N, Hosseinpour Delavar S, Farzaneghi P. A Study of the Effect of the Aerobic Training Together with Stem Cells on the Levels of Some of the Apoptosis Indices of the Heart Tissue of the Male Wistar Rats of Osteoarthritis Model. ***Jundishapur J Heal Sci*** 2019; 18(6): 585–602. [in Persian]
[17] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. ***Biotechnic Histochemistry*** 1995; 70(5): 220-33.
[18] Li M, Luo X, Lv X, Liu V, Zhao G, Zhang X, et al. In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. ***Stem Cell Res Ther*** 2016; 7(1): 1-3.
[19] Lopes de Jesus CC, Dos Santos FC, de Jesus LM, Monteiro I, Sant'Ana MS, Trevisani VF. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. ***PloS One*** 2017; 12(7): e0179185.
[20] Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. ***Eur J Preventive Cardiol*** 2007; 14(6): 753-60.
[21] Liu SS, Zhou PU, Zhang Y. Abnormal expression of key genes and proteins in the canonical Wnt/β-catenin pathway of articular cartilage in a rat model of exercise-induced osteoarthritis. ***Mol Med Report*** 2016; 13(3): 1999-2006.
[22] Stensson N, Gerdle B, Ernberg M, Mannerkorpi K, Kosek E, Ghafouri B. Increased anandamide and decreased pain and depression after exercise in fibromyalgia. ***Med Sci Sports Exerc*** 2020; 52: 1617-28.
[23] Lima LV, Abner TS, Sluka KA. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. ***J Physiol*** 2017; 595(13):4141-50.
[24] Cuadros ME, Moro OS, Florin MJ, Canelo JA. Ozone improves pain, function and quality of life in patients with knee osteoarthritis: A prospective quasi-experimental before-after study. ***Middle East J Rehabil Heal*** 2017; 4(1).
[25] Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy–a review. ***BMC Musculoskelet Disord*** 2016; 17(1): 1-3.
[26] Abdizadeh L, Peeri M, Azarbayjani MA, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise, mesenchymal stem cells (MSCs) and ozone therapy on anxiety and like depression behaviors caused by induction of osteoarthritis in rats. ***Razi J Med Sci*** 2021; 28(1): 12-22. [in Persian]
[27] Gilani A, Gaeini A, Nouri R. Effect of aerobic exercise training and ozone therapy on TRF2 and TERT gene expression in heart tissue of rats with osteoarthritis. ***Stud Med Sci*** 2020; 31(3): 169-77. [in Persian]