



اثر تمرین هوازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و ازوون در فتارهای اضطرابی و شبه افسردگی ناشی از القاء استئوآرتربیت در موش‌های صحرایی

لیلا عبدی زاده: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

مقدوس پیری: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) m.peeri@iautcb.ac.ir

محمدعلی آذری‌بایجانی: استاد، گروه آموزش تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

پروین فرزانگی: دانشیار، گروه آموزش تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

ورزش،

استئوآرتربیت،

MSCs

ازون‌درمانی،

اضطراب و افسردگی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۱۱

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۱/۱۵

زمینه و هدف: استئوآرتربیت با کاهش عملکرد فرد بر ابعاد عاطفی تأثیر می‌گذارد، ازین‌رو مطالعه حاضر با هدف بررسی تعیین اثر ورزش، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-MSCs) و ازوون بر فتارهای اضطرابی و شبه افسردگی ناشی از القاء استئوآرتربیت در موش‌های صحرایی صورت گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی نر دو ماهه، با وزن حدود ۲۳۰–۲۵۰ گرم پس از القاء استئوآرتربیت به روش جراحی در گروه ۱ (کنترل) و ۲ (MSCs) ورزش، ۳ (ازون)، ۴ (ورزش+ازون)، ۵ (ورزش+ازون)، ۶ (ورزش+MSCs+) و ۷ (ازون+MSCs+) جایگزین شدند. همچنین جهت بررسی اثرات القاء استئوآرتربیت بر متغیرهای تحقیق ۵ سر موش صحرایی در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. در مدت ۸ هفته گروههای ۱، ۲، ۳ و ۴ به مدت ۳ جلسه در هفته روی نوارگردان دوپیند، گروههای ۵، ۶ و ۷ نگهداری شدند. در مدت ۸ هفته گروههای ۸ و ۹ به مدت ۳ جلسه در هفته روی نوارگردان دوپیند، گروههای ۱ و ۱۰ نگهداری شدند. سلول بر کیلوگرم دریافت نمودند و گروههای ۱، ۲، ۳ و ۴ در ۳ تکرار و قل از شروع تمرین به ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر ازوون دریافت کردند و سپس آزمون محیط باز انجام گرفت.

یافته‌ها: القاء استئوآرتربیت منجر به بروز فتارهای اضطرابی و شبه افسردگی گردید ($p \leq 0.05$). با این حال، ورزش+MSCs+ هریک به باعث کاهش معنی دار گردش در محیط و افزایش معنی دار گردش در مرکز شد ($p \leq 0.05$); ورزش، ازوون و MSCs تنهایی، ورزش+ازون و ورزش+MSCs+ موجب افزایش معنی دار در مسافت کل طی شده گردیدند ($p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ورزش، MSCs و ازوون سبب کاهش اضطراب ناشی از مدل استئوآرتربیتی می‌گردد. همچنین ورزش، ازوون، MSCs هریک به تنهایی، ورزش+ازون و ورزش+MSCs+ دارای اثرات مطلوب‌تری در کاهش افسردگی هستند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Abdizadeh L, Peeri M, Azarbajayani MA, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise, mesenchymal stem cells (MSCs) and ozone therapy on anxiety and depression like behaviors caused by induction of osteoarthritis in rats. Razi J Med Sci. 2021;28(1):12-22.

* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

The effect of aerobic exercise, mesenchymal stem cells (MSCs) and ozone therapy on anxiety and depression like behaviors caused by induction of osteoarthritis in rats

Leila Abdizadeh: Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉ Maghsoud Peeri: Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(* Corresponding author) m.peeri@iauctb.ac.ir

Mohammad Ali Azarbayjani: Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

Parvin Farzanegi: Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Osteoarthritis pain is a type of chronic pain. One of the reasons that make this pain one of the most problematic diseases of the present age is its coexistence with physical diseases and mental disorders. Studies show that anxiety and depression are commonly associated with chronic pain. Needless to say, due to its chronic, painful and debilitating nature, this disease has reduced the quality of life (1,2,3) and increase the prevalence of depression in these patients. Studies show that osteoarthritis pain, through its effect on fatigue and disability, causes a depressed mood. There is an extensive research literature today that shows that although behavioral and psychological factors may not play a significant role in the onset of pain, but these factors in the transformation of acute pain into chronic and its continuation and also in explaining the severity of pain and related problems, including Depression, disability and anxiety play a crucial role (4-7). Because depression is often undiagnosed in patients with chronic pain, this problem is often not treated, and on the other hand, depression is associated with reduced effectiveness of treatments methods (7,10). Studies have shown that osteoarthritis is a chronic inflammatory process with cellular and biochemical changes that justifies drug treatment (12). Accordingly, some studies support the efficacy and safety of ozone injection in the treatment of osteoarthritis (13,14), but there is no clear agreement on this, and ozone at high concentrations is likely to have different effects on osteoarthritis. Today, stem cells are used to treat many diseases, including osteoarthritis, and a recent study looked at their effect on depressive behaviors (15). In addition, exercise is a good way to achieve the desired mental state and improve states of depression, anxiety and self-confidence. Therefore, due to the few and sometimes contradictory studies in this regard and also due to the growing need for new therapies, we examined a new therapeutic approach for depressive disorders associated with osteoarthritis based on MSCs transplantation, ozone therapy and aerobic exercise in osteoarthritis rats.

Methods: In this experimental study, 40 two-month-old male Wistar rats were purchased from Pasteur Institute of Iran-Tehran, weighing about 230-250 g and transferred to the animal room. To prevent stress and change physiological conditions, they were kept under new conditions of temperature($22\pm2^{\circ}\text{C}$), humidity(% 50 ± 5) and light-dark cycle of 12:12 h for one week. Osteoarthritis was surgically treated (1). For this purpose, the animals were first anesthetized using a mixture of ketamine (50-50 mg/kg) and xylazine (3-5 mg/kg). Then, under sterile conditions, a vertical incision was made in the inner part of the knee of the right foot with a surgical blade and other surgical instruments on the skin that had been previously shaved. After removing the skin, the medial collateral ligament of the knee was removed to observe the internal meniscus. The osteoarthritis model was then induced by making an incision that incompletely resulted in rupture and injury to the meniscus, and the area was sutured again with a sterile method. All steps were performed in the least amount of pain to the animal according to the principles of working with laboratory animals. A three-week recovery period was considered after induction of the medial meniscus tear model. After induction of osteoarthritis, subjects were divided into eight groups of five, including 1) osteoarthritis patient control, 2) MSCs, 3) exercise, 4) ozone, 5) exercise+ozone, 6) Exercise+MSCs, 7) Ozone+MSCs, 8) Exercise+Ozone+MSCs were replaced. Also, to investigate the effects of osteoarthritis induction on the research variables, 5 rats were placed in a healthy control group. In order to get acquainted with the treadmill, were trained on the rodent

Keywords

Exercise,

Osteoarthritis,

MSCs,

Ozone,

Anxiety and depression

Received: 01/12/2020

Published: 04/04/2021

treadmill for a week (3 times a week; for 10 minutes, without slope and at a speed of 5-8 m/min; 60%-70% VO_{2max}). The main training program for 8 weeks in aerobic exercise groups, for three sessions per week and 30 minutes of running on a treadmill without slope at a speed of 16 m/min was initiated in the first week, which gradually reached 50 minutes in the eighth week (19). Also, 5 minutes at a speed of 8 m/min at the beginning and end of exercise were performed for Warm-up and cool-down the animals. In this study, bone marrow mesenchymal stem cells were obtained from the National Center for Genetic Resources and then transferred to an incubator under sterile conditions. After 2 days, the supernatant was removed and after washing with PBS, DMEM/F12 warm and fresh medium was gently added to it. The cells were qualitatively examined for morphology and growth process. The cell environment was changed every 2 to 3 days for about 2 weeks until the cells in each group reached the appropriate density. Then the first passage was performed, so that the cells were removed from the bottom of the cultivation dishes using Trypsin/EDTA 0.2% made by the German company Gibco and cultured in a ratio of 3:1. About 10-15 days after each passage, the next passage was done. After filling the bottom of the culture dish and reaching a density of 90%, these cells were frozen in the desired passage to be used for injection purposes in the next stage of research. Then, after complete anesthesia of the animal in the cell therapy groups and during the recovery period, 1×10⁶ cells/kg were injected as a single injection at the model induction site (20). It also injects oxygen into the ozone generator and produced ozone there using electricity. Then a 10 ml syringe was connected to the generator output and 10 ml of the produced gas was used to obtain ozone with a concentration of 20µg/ml. In the ozone treatment groups, 20 µg/ml was injected into the knee tibia-femoral articular line in 3 weeks after surgery, in 3 repetitions, at different times and for 3 consecutive weeks before the start of the training program (21). In the ozone+MSCs group, after intra-articular injection of ozone and in the fourth week, MSCs were injected as a single injection at a dose of 1×10⁶ cells/kg. At the end of the treatment period, open field test was performed to evaluate the level of anxiety and depression in osteoarthritis rats (22). This test was performed for one day at light time. To perform the test, we held the rats from the base of the tail and placed them in one of the four corners of the device, allowing the animal to freely explore the environment of the device for 5 minutes. In this test, the parameters of total travel distance, time spend in periphery and time spent in center were evaluated to assess the level of anxiety and depression in rats. To analyze the results, Shapiro-Wilk statistical tests, independent t-test and 3-way ANOVA were used ($p\geq 0.05$).

Results: Induction of osteoarthritis led to anxiety and like depression behaviors ($p\geq 0.05$). However, exercise+MSCs significantly reduced circulation in the environment and significantly increased circulation in the center ($p\geq 0.05$); exercise, ozone, and MSCs each alone, exercise+ozone, and exercise+MSCs significantly increased the overall distance traveled ($p\geq 0.05$). Therefore, exercise, ozone, MSCs, exercise+ozone interaction and exercise+MSCs had more favorable effects than the combination of MSCs+ozone and the interaction of all 3 interventions in increasing motor index and reducing depression.

Conclusion: Due to the discrepancy in the results of the reported studies, it is not possible to say with certainty, how chronic pain such as osteoarthritis is associated with the occurrence of behaviors related to depression and anxiety and the mechanism of effect of therapeutic interventions in the present study on osteoarthritis. However, exercise may reduce inflammatory factors, increase the activity of the serotonergic system, and reduce oxidative stress, which has anti-depressant effects, by increasing the expression and production of brain-derived neuronal growth factor (28). Also, injection of MSCs and ozone due to its anti-inflammatory properties and increase the oxygen content of the tissue improves the metabolism of cartilage tissue in the knee, which can reduce joint pain and stiffness by improving inflammatory factors, leading to improved function and quality of life in patients (32). On the other hand, ozone causes a feeling of well-being and happiness after ozone therapy by releasing endorphins and possibly increasing serotonin[33]. Overall, the results of this study showed that exercise, MSCs and MSCs+ozone have a protective effect in inducing the osteoarthritis model and modulate their anti-anxiety effects by increasing the circulation time in the center. Also, exercise, ozone, MSCs alone, and exercise+ozone and exercise+MSCs have more favorable effects in reducing depression due to osteoarthritis.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Abdizadeh L, Peeri M, Azarbajani MA, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise, mesenchymal stem cells (MSCs) and ozone therapy on anxiety and depression like behaviors caused by induction of osteoarthritis in rats. Razi J Med Sci. 2021;28(1):12-22.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

اغلب درمان نیز نمی‌شود و در نتیجه‌ی این دو، فرد افسرده با کاهش فعالیت فیزیکی درد بیشتری را تجربه می‌کند. از طرفی، افسرده‌گی با کاهش پایبندی بیماران به مداخلات مؤثر درد و همچنین با کاهش اثربخشی روش‌های درمانی همراه است (۷، ۶).

با توجه به آنچه گفته شد، علائم افسرده‌گی و اضطراب اغلب به عنوان اختلالات همراه با بیماری‌های مزمونی همچون OA مطرح می‌باشند. این همراهی منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای از بهره‌وری و زیان اقتصادی است که نیاز به تشخیص و درمان مناسب را می‌رساند. با یافته‌های جدید درخصوص پاتوفیزیولوژی OA، مشخص شده که شرایط متابولیک در پیدایش و پیشبرد این بیماری نقش عمده‌ای داشته که از آن جمله می‌توان به رادیکال‌های آزاد اشاره کرد. با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در گردش خون سیستمی به واسطه تولید در محل‌های دیگر، باعث سالخوردگی سلولی در مفاصل، آپوپتوز غضروف و در نهایت کاهش ضخامت غضروف در مفصل می‌گردد (۸). در عین حال دگرگونی‌های التهابی در بافت سینوویال در پاسخ به افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اتفاق می‌افتد که منجر به فیبروز این بافت می‌گردد. درواقع، OA یک فرآیند التهابی مزمون با تغییرات سلولی و بیوشیمیایی است که درمان دارویی را توجیه می‌کند (۹). بر این اساس، برخی مطالعات از کارایی و ایمنی تزریق ازون در درمان OA حمایت می‌کند (۱۰، ۱۱). اما در این مورد نیز توافق واضحی وجود ندارد و احتمال می‌رود ازون در غلظت‌های بالا اثرات متفاوتی را بر OA داشته باشد.

امروزه، استفاده از سلول‌های بنیادی (Stem cells) برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله OA استفاده می‌شود و اخیراً در مطالعه‌ای به تأثیر آن‌ها در رفتارهای افسرده‌گی اشاره شده است (۱۲). علاوه بر این، با توجه به نیاز به یافتن درمان‌های غیر جراحی ایمن، ساده و ارزان برای کاهش افسرده‌گی بیماران استئوآرتیتی، تمرینات ورزشی زمینه‌ای مناسب برای دستیابی به وضعیت مطلوب روانی و بهبود حالت‌های افسرده‌گی، اضطراب و اعتماد به نفس است. در مقاله‌ای که به بررسی تأثیر ورزش در افراد مبتلا به OA پرداخته شده بود، بیان شد که ورزش نقش مهمی در کنترل علائم ناشی از OA در این افراد دارد (۱۳). در تضاد با این یافته‌ها بوکاره و

مقدمه

استئوآرتیت (OA–Osteoarthritis) یکی از شایع‌ترین اختلالات مفصلي مطرح در سراسر دنیا می‌باشد که تا سال ۲۰۲۰ با ۶۰٪ افزایش شیوع آن و محدودیت حرکتی مواجه خواهیم شد (۱). درد OA نوعی درد مزمن است. از دلایلی که این درد را در زمرة مسئله‌سازترین بیماری‌های عصر حاضر قرار داده همبودی آن با بیماری‌های جسمانی و اختلالات روانی است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که اضطراب و افسرده‌گی همبودی شایعی در ارتباط با حالت‌های درد مزمن دارند. ناگفته پیدا است که این بیماری به دلیل ماهیت مزمن، دردناک و ناتوان‌کننده‌اش منجر به کاهش کیفیت زندگی (۳، ۲) و افزایش شیوع افسرده‌گی در این بیماران گردیده است. مطالعات حاکی از این است که درد OA از طریق تأثیر آن بر خستگی و ناتوانی، موجب خلق وخوی افسرده می‌شود.

امروزه ادبیات پژوهشی گسترده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد اگرچه ممکن است عوامل رفتاری و روان‌شناختی در شروع درد نقش چندان بارزی نداشته باشند، اما این عوامل در تبدیل درد حاد به مزمن و استمرار آن و نیز در تبیین شدت درد و مشکلات مرتبط با آن از جمله افسرده‌گی، ناتوانی و اضطراب نقش قاطعی ایفا می‌کنند (۸-۵). در این راستا، در پژوهش امیری و همکاران که به منظور بررسی ابعاد روان‌شناختی و اجتماعی در بیماران مبتلا به دردهای مزمن (در جنبه بیماری‌های روماتیسمی در سه حیطه کمردرد، آرتیت روماتوئید و OA) انجام گرفت، تفاوت معنی‌داری را در ابعاد تجربه درد و باورهای ادراکی درد نشان دادند. به طوری که باورهای ادراکی درد در افراد مبتلا به درد مزمن از نوع OA و نیز تجربه درد شدیدتری را در مقایسه با دو گروه دیگر گزارش نمودند. همچنین، تفاوتی در بین زنان و مردان از نظر تجربه درد و باورهای ادراکی درد مشاهده نگردید (۴). عسگری و همکاران نیز در مطالعه‌ای بر روی ۱۶۹ بیمار مبتلا به درد نشان دادند که باورهای بیمار مبنی بر پایان ناپذیر بودن و استمرار درد در آینده و نیز باور به ثبات درد در زمان حال، با ناتوانی جسمی و افسرده‌گی شدیدتر همراه است (۵). از آنجایی که افسرده‌گی در بیماران مبتلا به درد مزمن اغلب تشخیص داده نمی‌شود، این مشکل

سپس تحت شرایط استریل یک برش عمودی در بخش داخلی زانوی پای راست توسط تیغ بیستوری و سایر ابزارهای جراحی بر روی پوست که از قبل شیو شده بود، ایجاد گردید. پس از کنار زدن پوست، رباط جانبی داخلی (Medial Collateral Ligament-MCL) کنار زده شد تا مینیسک داخلی مشاهده شود. سپس با ایجاد یک برش که به صورت ناقص منجر به پارگی و ایجاد آسیب در مینیسک شود مدل استئوآرتربیت القاء شد و مجدداً ناحیه با روش استریل بخیه زده شد. تمام مراحل در کمترین میزان درد واردہ به حیوان طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. سه هفته دوره ریکاوری، پس از القاء مدل پارگی مینیسک داخلی زانو (Medial Meniscus Tear-MMT) در نظر گرفته شد.

برنامه تمرینی: قبل از شروع برنامه اصلی و به منظور آشنایی با نوارگردان به مدت یک هفته (سه بار در هفتۀ؛ به مدت ۱۰ دقیقه، بدون شب و با سرعت ۸-۵ متر بر دقیقه؛ حدود ۷۰٪-۶۰٪ $\text{VO}_{2\text{max}}$) بر روی ترمیل جوندگان (نوارگردان هوشمند هشت کاناله مدل ۲۰۱۶ ساخت کشور ایران شرکت تجهیز گستر امید ایرانیان) تمرین داده شدند. برنامه تمرینی اصلی براساس مطالعه لئو و همکاران طراحی گردید (۱۶). برنامه تمرینی اصلی در ۸ هفته و هر هفته به مدت ۳ روز و هر روز ۳۰ دقیقه دویدن بر روی ترمیل بدون شب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در هفته اول با رعایت اصل اضافه بار به صورت پیشرونده مدت تمرین به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید. برنامه تمرینی به مدت ۳ روز در هفته و هر روز ۳۰ دقیقه دویدن بر روی ترمیل بدون شب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در هفته اول آغاز شد که به صورت پیشرونده مدت تمرین به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید (جدول ۱). همچنین پنج دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه زمان قبل و بعد از تمرین برای گرم و سرد کردن حیوانات اختصاص داده شد. گروه کنترل در طول اجرای تمرین فقط بر روی ترمیل ایستادند و دستگاه روش نشد.

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان: در این مطالعه، از سلول‌های رده بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از مرکز ملی ذخایر ژنتیک تهیه و سپس در شرایط استریل، به انکوباتور منتقل گردیدند. بعد از ۲

همکاران مشاهده کردند که ورزش در بُعد اضطراب، استرس و افسردگی اثرگذار نیست (۱۴). لذا، با توجه به مطالعات اندک و گاه متناقض در این رابطه و نیز با توجه به اینکه OA یک بیماری شایع آرتربیتی می‌باشد، شیوع ناتوانایی‌های جسمانی و به تبع آن افسردگی در حال افزایش است؛ که این امر نگرانی‌های جدی را برای پژوهشگران ایجاد کرده است. بنابراین، با توجه به نیاز روزافزون درمان‌های جدید، ما یک رویکرد جدید درمانی برای اختلالات افسردگی همراه با OA مبتنی بر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells)، ازون درمانی و ورزش هوایی را در موش‌های استئوآرتربیتی مورد بررسی قرار دادیم. ازین‌رو، این سوال اساسی مطرح است که آیا ۸ هفته ورزش هوایی به همراه تزریق MSCs و ازون درمانی می‌تواند بر رفتارهای اضطرابی و شباهفشدگی ناشی از OA اثرگذار بوده و موجب تعدیل آن شود؟

روش کار

در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۲۳۰ گرم خریداری گردید و به اتاق حیوانات انتقال داده شد. پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید در قالب ۹ گروه پنج تایی شامل (۱) کنترل بیمار استئوآرتربیتی، (۲) بیمار MSCs^+ ، (۳) بیمار+ورزش، (۴) بیمار+ازون، (۵) بیمار+ورزش+ازون، (۶) بیمار+ورزش+ MSCs^+ ، (۷) بیمار+ازون+ MSCs^+ ، (۸) بیمار+ورزش+ازون+ MSCs^+ جایگزین شدند. همچنین جهت بررسی اثرات القاء استئوآرتربیت بر متغیرهای تحقیق ۵ سر موش صحرایی در گروه کنترل سالم قرار گرفته و در پژوهش حاضر شرکت کردند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمامی روند پژوهش رعایت شد و مطالعه مورد نظر با کد اخلاق به شماره NO.19.33.2018 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی به تصویب رسید.

القاء استئوآرتربیت: در مطالعه حاضر، استئوآرتربیت طبق مطالعه باو و همکاران به روش جراحی صورت گرفت (۱۵). برای این منظور ابتدا حیوانات با استفاده از مخلوط کتابمین (۳۰-۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلazin (۳-۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند.

جدول ۱ - برنامه تمرینی گروه‌های تمرینی (زمان به دقیقه)

متغیرهای تمرینی	سازگاری	زمان به دقیقه	مدت تمرین در هر جلسه	سرعت نوارگردان (متر/دقیقه)	زمان به دقیقه	۳	۴	۵	۶	۷	۸
	۵-۸	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
	۱۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۵۰	۵۰

سلول بر کیلوگرم اعمال شد. در پایان دوره تیمار جهت بررسی میزان اضطراب و افسردگی موش‌های استئوآرتیتی از آزمون اوپن فیلد-فیلد (Open Field Test) OFT استفاده شد.

آزمون محیط باز: اختلال حرکت، اضطراب و افسردگی در حیوانات آزمایشگاهی توسط آزمون محیط باز سنجیده می‌شود. این دستگاه شامل یک جعبه چهارگوش چوبی با ابعاد $100 \times 100 \times 50$ سانتی متر با دیوارهای داخلی به رنگ سیاه بود. کف دستگاه برای ارزیابی تحرك حیوان توسط خطوط خطوط سیاه به ۲۵ مربع مساوی تقسیم شد. این آزمون به مدت یک روز و در زمان روشنایی انجام گرفت. برای انجام آزمون، موش‌ها را از قاعده دم نگهداشتند و در یکی از چهار گوشه دستگاه قرار داده و اجازه دادیم تا حیوان محیط دستگاه را آزادانه به مدت ۵ دقیقه کاوش کند. در این آزمون پارامترهای کل مسافت طی شده، زمان گذرانده شده در محیط و گردش در مرکز جهت بررسی میزان اضطراب و افسردگی موش‌های صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. افزایش زمان گذرانده شده در مرکز می‌تواند به عنوان یک اثر شبه ضداضطرابی محسوب شود، همچنین کل مسافت طی شده به عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی در نظر گرفته می‌شود.^(۱۹).

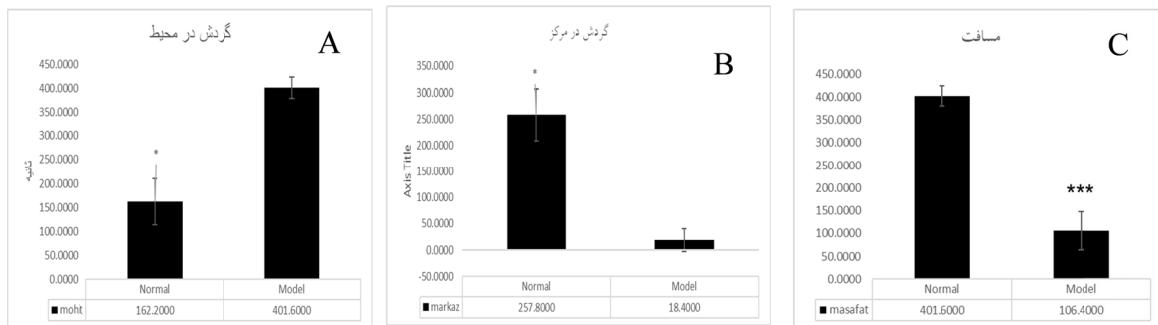
تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون‌های آماری شاپیروویلک، t مستقل و آنالیز واریانس سه‌راهه استفاده شد ($P \leq 0.05$).^(۲۰)

یافته‌ها

نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در اثر القاء OA گردش در محیط به طور معنی‌داری افزایش ($P=0.001$)، گردش در مرکز به طور معنی‌داری کاهش ($P=0.001$) و نیز مسافت کل طی شده به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۱). نتایج آزمون آنالیز واریانس سه‌راهه نشان داد ورزش ($F=35.16$, $P=0.0001$, $F=35.16$, $P=0.0001$)

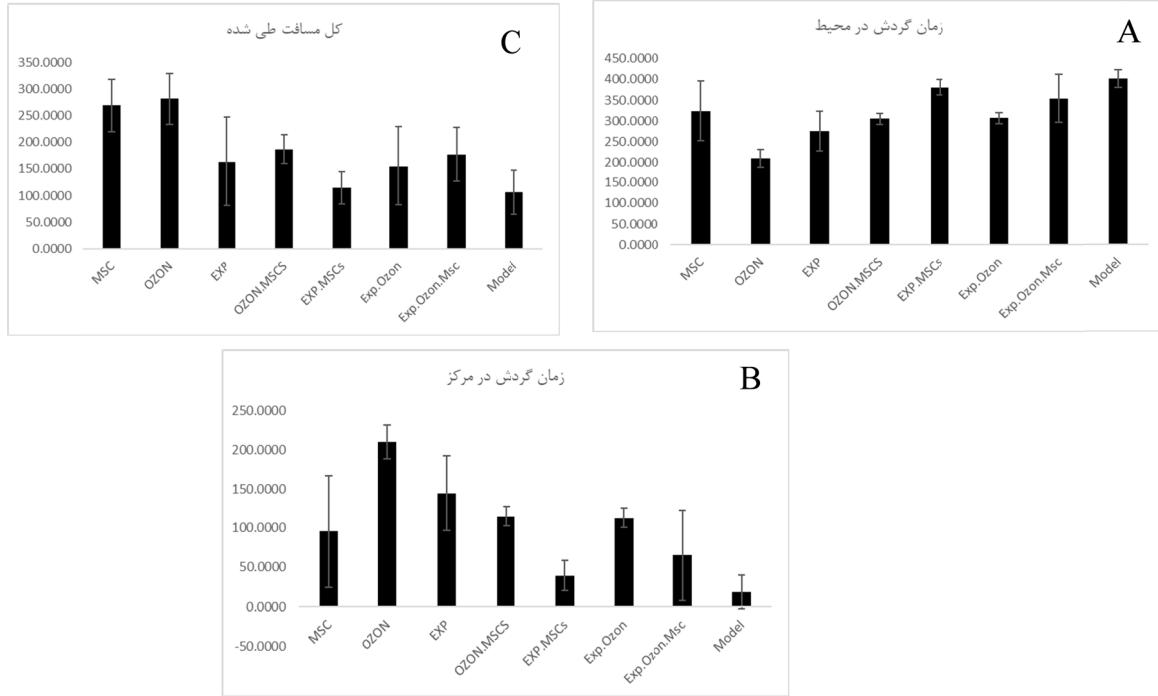
روز، محیط رویی خارج و پس از شستشو با PBS محیط DMEM/F12 گرم و تازه به آرامی به آن اضافه گردید. سلول‌ها از نظر مورفو‌لوزی و روند رشد، مورد بررسی کیفی قرار گرفتند. محیط سلول‌ها هر ۲ الی ۳ روز یکباره به مدت حدود ۲ هفته تعویض شد تا سلول‌ها در هر گروه به تراکم مناسب رسیدند. سپس پاساژ اول صورت گرفت، بدین ترتیب که سلول‌ها با استفاده از $0.2\% / 0.2\%$ Trypsin/EDTA ساخت شرکت Gibco کشور آلمان از کف ظروف کشت کنده و به نسبت ۳ به ۱ کشت داده شدند. در حدود ۱۵-۱۰ روز پس از هر پاساژ، پاساژ بعدی انجام شد. این سلول‌ها پس از پر کردن کف ظرف کشت و رسیدن به تراکم ۹۰٪ در پاساژ مورد نظر منجمد شدند تا در مرحله بعدی تحقیق جهت اهداف تزریقی مورد استفاده قرار گیرند.

تزریق داخل مفصلی MSCs و ازون: به منظور استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستان و پس از کشت در آزمایشگاه برای هر موش تعداد 10^6 سلول بر کیلوگرم آماده‌سازی شد. پس از بی‌هوشی کامل حیوان در گروه‌های درمان با سلول و در طی دوره ریکاوری به عنوان یک بار تزریق در محل القاء مدل، سلول‌ها تزریق شدند (۱۷). همچنین، اکسیژن را وارد دستگاه ازون ساز کرده و در آنجا با استفاده از جریان الکتریسیته ازون تولید شد. سپس سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری به خروجی ژنراتور وصل شده و ۱۰ میلی‌لیتر از گاز تولید شده بکار گرفته شد تا ازون با غلظت 20 میکرگرم بر میلی لیتر حاصل شود. در گروه‌های درمان با ازون، ۳ هفته پس از جراحی، در ۳ تکرار، در زمان‌های مختلف و به مدت ۳ هفته متوالی قبل از شروع برنامه تمرینی برای هر موش در خط مفصلی تیبیوفمورال به مقدار ۲۰ میکرگرم بر میلی لیتر تزریق شد (۱۸). همچنین، در گروه ازون+سلول بعد از تزریق ازون و در هفته چهارم تزریق MSCs به عنوان یک بار تزریق با دوز 1×10^6 g



شکل ۱ - مقایسه مدت زمان گردش در محیط (A) مدت زمان گردش در مرکز (B) و مسافت کل طی شده (C) در گروههای سالم و استئوازترینی
* یانگر تفاوت معنی دار در مدت زمان گردش در محیط، مدت زمان گردش در مرکز و مسافت کل طی شده در مقایسه با گروه سالم است.

وَالْمُؤْمِنُونَ الْمُؤْمِنَاتُ وَالْمُؤْمِنُونَ الْمُؤْمِنَاتُ



شکل ۲- مقایسه مدت زمان گردش در محیط (A) مدت زمان گردش در مرکز (B) و مسافت کل طی شده (C) در گروههای مختلف تحقیق حاضر. اطلاعات براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

معنی دار گرددش در محیط و افزایش معنی دار گرددش در مرکز شد که نتیجه گیری می شود ازون درمانی موجب افزایش اثرات MSCs بر گرددش در محیط و مرکز می شود. با وجودی که هم ورزش و هم MSCs موجب کاهش معنی دار گرددش در محیط و افزایش معنی دار گرددش در مرکز شدند، ولی همزمانی ورزش و MSCs نتوانست بیشتر از اثر $(F=3.809, P=0.06, \eta^2=0.106)$ تک تک هریک، گرددش در محیط را کاهش و گرددش در

($F=59.02$, $P=0.0001$, $\eta=0.649$) MSCs و $\eta=0.524$) باعث کاهش معنی دار گردش در محیط و افزایش معنی دار گردش در مرکز شدنده همچنین، ورزش معنی دار ($F=4.93$, $P=0.001$, $\eta=0.66$) (F=64.47, P=0.001, η=0.66) ازون درمانی ($F=14.89$, $p=0.034$, MSCs و $P=0.03$, $\eta=0.13$) هریک به تنهایی باعث افزایش معنی دار در مسافت کل طی شده گردیدند. اثر متقابل ازون درمانی و مسافت کل طی شده ($F=5.48$, $P=0.02$, $\eta=0.145$) MSCs موجب کاهش

مبلا به OA انجام دادند که نتایج به دست آمده حاکی از تأثیر مثبت این تمرینات بر روی کیفیت زندگی بود (۲۱). نتایج این پژوهش با مطالعه جعفرزاده باغان و همکاران (۲۲) در ارتباط با تأثیرات مثبت فعالیت بدنی بر رفتارهای شباهفسردگی (۲۲) و نتایج پاتکی و همکاران که بیان‌گر تأثیر ورزش در کاهش رفتارهای شباهفسردگی است (۲۳)، هم راستا، ولی با نتایج پژوهشی صادقی و همکاران که حکایت از عدم تأثیر مطلوب ورزش در این زمینه دارد (۲۴) و همچنین با نتایج بوکارد و همکاران که مشاهده کردند اگرچه ورزش نقش مثبتی در سلامت روانی دارد، ولی در بُعد اضطراب، استرس و افسردگی اثرگذار نیست (۱۵)، غیرهم راستا بود. تحقیقات نشان داده‌اند که ورزش احتمالاً با افزایش بیان و تولید فاکتور رشد نورونی مشتق شده از مغز

Brain-Derived Neurotrophic Factor -BDNF Factor (Factor)، موجب کاهش فاکتورهای التهابی، افزایش میزان فعالیت سیستم سروتونرژیک و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود که اثرات ضدافسردگی دارد (۲۵). همسو با نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه تی فیلین و همکاران تأثیر MSCs بر تحرک موش‌های صحرایی (Flinders sensitive line) FSL برای افسردگی است؛ در ۲ هفته پس از تزریق بررسی شد. نتایج نشان داد که تزریق MSCs منجر به تغییر چشمگیر در رفتار افسردگی موش‌های صحرایی شد و تحرک حیوانات را در گروه MSCs در آزمون محیط باز افزایش داد (۱۲). همچنین، باستوس و همکاران گزارش کردند که MSCs باعث بهبود قابل ملاحظه‌ای در میزان درد، عملکرد و کیفیت زندگی شد (۲۶).

این موضوع تا حدی در مطالعه گیبس و همکاران مشاهده شد (۲۷). این پژوهشگران در پژوهشی اثر ترکیبی ورزش و تزریق پیوند مغز استخوان استرومود و PRP را طی دوره ۱۲ ماهه‌ای در بیماران مبتلا به OA مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که بهبود نتایج حاصل عمل ترکیبی این درمان‌ها می‌باشد. علاوه‌براین، در مطالعه حاضر، تزریق ازون به تنهایی اثری روی رفتارهای اضطرابی نداشت ولی منجر به افزایش کل مسافت طی شده و کاهش افسردگی گردید. این در حالی است که اثر متقابل +ازون منجر به کاهش اضطراب شده ولی تأثیر معنی‌داری بر افزایش

مرکز را افزایش دهد. با این وجود، ازون درمانی ($F=0.39$, $P=0.533$, $\eta^2=0.012$) اثر معنی‌داری بر کاهش گرددش در محیط و افزایش گرددش در مرکز نداشت. اثر متقابل ورزش و ازون درمانی ($F=0.18$, $P=0.67$, $\eta^2=0.006$) نیز بر کاهش گرددش در محیط و افزایش گرددش در مرکز اثر معنی‌داری نداشت. با این وجود، اثر متقابل ورزش و ازون درمانی ($F=15.13$, $P=0.001$, $\eta^2=0.32$) و نیز ورزش به همراه MSCs ($F=9.02$, $P=0.005$, $\eta^2=0.22$) موجب افزایش معنی‌داری بر مسافت کل طی شده در موش‌های مبتلا به OA شدند که نتیجه‌گیری می‌شود، ازون درمانی و نیز MSCs هریک موجب افزایش اثرات ورزش بر مسافت کل طی شده می‌شوند. با وجودی که هم ازون درمانی و هم MSCs موجب افزایش معنی‌دار مسافت کل طی شده شدند، ولی همزمانی ازون درمانی و MSCs (نتوانست بیشتر $F=2.76$, $P=0.10$, $\eta^2=0.08$) از اثر تک هریک، مسافت کل طی شده را افزایش دهد. از طرفی، هنگامی که سه مداخله ورزش، MSCs و ازون درمانی به‌طور همزمان اعمال شدند، اثر معنی‌داری بر کاهش گرددش در محیط، افزایش گرددش در مرکز ($F=0.030$, $P=0.86$, $\eta^2=0.001$) و افزایش مسافت کل طی شده ($F=0.26$, $P=0.60$, $\eta^2=0.008$) نداشتند (شکل ۲).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد ایجاد مدل استئوآرتیتی موجب بروز رفتارهای اضطرابی و شباهفسردگی گردید. با این حال، ورزش و هریک به تنهایی منجر به افزایش فعالیت حرکتی نسبت به گروه کنترل و کاهش اضطراب و افسردگی شدند. در این راستا، در مطالعه دومان و همکاران نشان داده شد که ۸ هفته تمرین هوایی اختیاری در موش‌های صحرایی موجب کاهش رفتارهای مربوط به اضطراب و افسردگی در آزمون شناختی اجباری، تعليق دم و محیط باز شد. در مطالعه آن‌ها نظیر نتایج مطالعه حاضر، پس از تمرینات هوایی در آزمون محیط باز، گرددش در محیط کاهش یافت در حالی که گروه کنترل افزایش مسافت کل طی شده نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (۲۰). گروجم تودت و همکاران نیز مطالعه‌ای را با هدف بررسی تأثیر تمرین هوایی بر روی بیماران

بهبودی و روند درمان، توصیه می‌شود در تدبیر درمانی بیماران مذکور ارزیابی روانپردازی به منظور تشخیص زودرس لحاظ شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم استفاده از گروه تمرين اختیاری به جهت تفاوت اساسی در تمرين اختیاری با تمرين اجباری در بروز ویژگی‌های رفتاری اشاره کرد. از دیگر محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم استفاده از سایر مدل‌های آزمون اضطراب و افسردگی نظری آزمون‌های شناختی اجباری و ماز مرتفع به علاوه‌ای شکل به همراه پارامترهای اندازه‌گیری شده در آزمون محیط باز به جهت اطمینان از نتایج حاصله و تعیین آن به انسان را نام برده که علت عدم بررسی کمبود بودجه پژوهش بوده است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که ورزش، MSCs و +ازون بهبود کاهش اضطراب ناشی از مدل استئوآرتیتی می‌گردد. همچنین ورزش، ازون، هرکدام به تنها یک و ورزش+ازون و ورزش+MSCs دارای اثرات مطلوب‌تری در کاهش افسردگی ناشی از استئوآرتیت می‌باشند.

تقدیر و تشکر

با توجه به اینکه مقاله حاضر مستخرج از رساله مقطع دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد، بدین‌وسیله از حمایت‌های معنوی معاونت پژوهش و فناوری این واحد دانشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Di Domenica F, Sarzi-Puttini P, Cazzola M, Atzeni F, Cappadonia C, editors. Physical and rehabilitative approaches in osteoarthritis. Seminars in arthritis and rheumatism; 2005.
2. Van der Waal JM, Terwee CB, Van der Windt DA, Bouter LM, Dekker J. The impact of non-traumatic hip and knee disorders on health-related quality of life as measured with the SF-36 or SF-12. A systematic review. Qual Life Res. 2005;14(4):1141-55.
3. Salaffi F, Carotti M, Stancati A, Grassi W. Health-related quality of life in older adults with

مسافت طی شده نداشت.

در این راستا، اینورنیزی و همکاران نشان دادند که درمان با ازون ایمنی بهتر و کیفیت زندگی بهتری را در مقایسه با هیالورونیک‌اسید نشان داد (۲۸). مطالعه دجسوس و همکاران اثربخشی ازون را به مدت ۸ هفته و با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر در بهبود عملکرد و کیفیت زندگی افراد مبتلا به OA تأیید می‌کند (۱۹). همچنین، میشرا و همکاران گزارش نمودند که ازون تأثیرات بهتری نسبت به متیل پردنیزولون در تسکین درد و بهبود خشکی مفصلی و کاهش ناتوانی ناشی از بیماری داشت (۱۲).

تحقیقات انجام شده در بررسی مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک در OA نشان داده که استفاده از ازون به دلیل داشتن ویژگی ضدالتهابی و افزایش میزان اکسیزن بافت موجب بهبود متابولیسم بافت غضروف زانو می‌گردد که می‌تواند با بهبود عوامل التهابی درد و سفتی مفاصل را کاهش داده، منجر به بهبود عملکرد و کیفیت زندگی در افراد مبتلا گردد (۲۹). از طرفی، فرض شده که ازون با آزادی اندورفین‌ها و افزایش احتمالی سروتونین موجب احساس تندرنستی و سرخوشی بعد از ازون درمانی می‌شود (۳۰). در ادامه، کاربرد توام ورزش+ازون و ورزش+MSCs اثر معنی‌داری بر افزایش گردنش در مرکز و یا کاهش اضطراب نداشتند ولی منجر به افزایش فعالیت حرکتی و کاهش افسردگی شدند. در نهایت، تعامل هر سه مداخله در کاهش اضطراب و افزایش فعالیت حرکتی معنی‌دار نبود.

در کل نتایج این تحقیق مشخص کرد که بین اضطراب و افسردگی با بیماری‌های استئوآرتیتی ارتباط وجود دارد که ورزش، MSCs و +ازون اثر محافظتی در القای مدل استئوآرتیتی داشته و آثار ضداضطرابی خود را از طریق افزایش زمان گردنش در مرکز تعديل می‌کند. همچنین، ورزش، ازون درمانی، +MSCs، تعامل ورزش+ازون و ورزش+MSCs اثرات مطلوب‌تری را نسبت به ترکیب +ازون و تعامل هر سه مداخله در افزایش شاخص حرکتی و کاهش افسردگی داشته است. بتایرانی، با توجه به لزوم مداخله جهت درمان اضطراب و افسردگی در این بیماران و با در نظر گرفتن شیوع بالای اختلال‌های افسردگی و اضطرابی در بیماران استئوآرتیتی و تداخل آن در

- symptomatic hip and knee osteoarthritis: a comparison with matched healthy controls. *Aging Clin Experim Res.* 2005;17(4):255-63.
4. Amiri S, Isazadegan A, Mahmood Alilo M, Banafsheh M. The Study of Pain Experienced, Social Support and Perceptual Beliefs in Chronic Pain Sufferers Individuals. *J Neyshabur Univ Med Sci.* 2016;4(2):58-68.
5. Asghari A, Nicholas MK. Personality and pain-related beliefs/coping strategies: a prospective study. *Clin J Pain.* 2006;22(1):10-8.
6. Wertli MM, Burgstaller JM, Weiser S, Steurer J, Kofmehl R, Held U. Influence of catastrophizing on treatment outcome in patients with nonspecific low back pain: a systematic review. *Spine.* 2014;39(3):263-73.
7. Axford J, Heron C, Ross F, Victor CR. Management of knee osteoarthritis in primary care: pain and depression are the major obstacles. *J Psychosom Res.* 2008;64(5):461-7.
8. Ziskoven C, Jäger M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K, Krauspe R. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthoped Rev.* 2010;2(2).
9. Bentz M, Zaouter C, Shi Q, Fahmi H, Moldovan F, Fernandes JC, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2012;113(7):2256-67.
10. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. *Am J Neuroradiol.* 2003;24(5):996-1000.
11. Mishra SK, Pramanik R, Das P, Das PP, Palit AK, Roy J, et al. Role of intra-articular ozone in osteo-arthritis of knee for functional and symptomatic improvement. *Ind J Phys Med Rehabilit.* 2011;22(2):65-9.
12. Tfilin M, Sudai E, Merenlender A, Gispan I, Yadid G, Turgeman G. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior. *Mol Psychiatry.* 2010;15(12):1164-75.
13. Bennell KL, Hinman RS. A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee. *J Sci Med Sport.* 2011;14(1):4-9.
14. Bouchard C. Physical activity, fitness, and health. Consensus statement. 1994.
15. Bove S, Laemont K, Brooker R, Osborn M, Sanchez B, Guzman R, et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthr Cartilage.* 2006;14(10):1041-8.
16. Liu SS, Zhou P, 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 Rep.* 2016;13(3):1999-2006.
17. 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):160.
18. Lopes de Jesus CC, dos Santos FC, de Jesus LMOB, Monteiro I, Sant'Ana MSSC, Trevisani VFM. 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.
19. Habr SF, Bernardi MM, Conceição IM, Freitas TA, Felicio LF. Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. *Psychol Neurosci.* 2011;4(1):115-21.
20. Duman CH, Schlesinger L, Russell DS, Duman RS. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res.* 2008;1199:148-58.
21. Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, Moe RH, Haavardsholm E, Holm I, et al. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. *Physic Ther.* 2008;88(1):123-36.
22. Jafarzadeh Baghban A, Peeri M, Azarbaijani MA.. The Effect of 4 Weeks of Voluntary Training on Depression-Like Behavior Induced by Childhood Stress and Oxidative Stress in Rats. *J BioSci Sports.* 2019;11(1):63-81.
23. Patki G, Li L, Allam F, Solanki N, Dao AT, Alkadhi K, et al. Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav.* 2014;130:47-53.
24. Sadeghi M, Peeri M, Hosseini M-J. Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats. *Physiol Behav.* 2016;163:177-83.
25. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol.* 2004;286(3):R505-R11.
26. Bastos R, Mathias M, Andrade R, Bastos R, Balduino A, Schott V, et al. Intra-articular injections of expanded mesenchymal stem cells with and without addition of platelet-rich plasma are safe and effective for knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatol Arthrosc.* 2018;26(11):3342-50.
27. Gibbs N, Diamond R, Sekyere EO, Thomas WD. Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series. *J Pain Res.* 2015;8:799.
28. Invernizzi M, Stagno D, Carda S, Grana E,

Picelli A, Smania N, et al. Safety of intra-articular oxygen-ozone therapy compared to intra-articular sodium hyaluronate in knee osteoarthritis: A randomized single blind pilot study. *Int J Phys Med Rehabil.* 2017;5(385):2.

29. Cuadros MEF, Moro OSP, Florin MJA, Canelo JAM. Ozone improves pain, function and quality of life in patients with knee osteoarthritis: A prospective quasi-experimental before-after study. *Mid East J Rehabil Health.* 2017;4(1).

30. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011;1(1):1-18.