

اثر تمرینات استقامتی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان زن FGF2 و MMP13 در بافت‌زانو موش‌های مبتلا به استئواًرتیت

مهناز علی‌نژاد^۱، علیرضا باراری^{۲*}، آسیه عباسی دلویی^۳، پروین فرزانگی^۴

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تمرینات استقامتی و مصرف سلول‌های بنیادی بر بیان زن FGF2 و MMP13 در بافت‌زانو موش‌های مبتلا به استئواًرتیت زانو می‌باشد.

روش بررسی: نوع مطالعه از نوع تجربی است. موش‌های صحرایی نر ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه شامل گروه‌های: کنترل- سالم، کنترل- بیمار، بیمار- سلول بنیادی، بیمار- تمرین و بیمار- ورزش - سلول بنیادی تقسیم شدند. برنامه تمرین شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردیمیل بدون شب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه برای هفته اول بود و هر هفته یک متر بر دقیقه اضافه شد. موش‌های صحرایی Real Time PCR را از طریق تزریق داخل سلولی 1×10^6 سلول/کیلوگرم دریافت کردند. بیان زن FGF2 و MMP13 از طریق روش MSCs تعیین تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تمرینات بدنی و درمان با سلول‌های بنیادی بر بیان زن FGF2 و MMP-13 در موش‌های مبتلا به استئواًرتیت در گروه‌های مختلف افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.000$). همچنین با استفاده از آزمون تعییبی توکی تفاوت سطح تغییرات FGF2 در گروه‌های تمرین- بنیادی نسبت به گروه تمرین و گروه سالین تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.0001$). همچنین با استفاده از آزمون تعییبی توکی تفاوت MMP-13 بین گروه کنترل با گروه سالین، گروه تمرین و بنیادی با تمرین- بنیادی و گروه سالین با گروه تمرین تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سطوح FGF2 و MMP13 در بافت غضروف موش‌های مبتلا به استئواًرتیت افزایش داشت و تمرینات استقامتی و درمان با سلول‌های بنیادی موجب کاهش در سطح فاکتورهای مورد نظر شد.

واژه‌های کلیدی: تمرینات استقامتی، سلول بنیادی، FGF2، استئواًرتیت زانو

ارجاع: علی‌نژاد مهناز، باراری علیرضا، عباسی دلویی آسیه، فرزانگی پروین. اثر تمرینات استقامتی و تزریق سلول‌های بنیادی بر بیان زن FGF2 و MMP13 در بافت‌زانو موش‌های مبتلا به استئواًرتیت. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۳۵۹۹-۳۶۱۰، (۳) ۲۹، ۱۴۰۰: ۳۶۱۰-۳۵۹۹.

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۴- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

*(نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۱۱۲۷۷۹۳، پست الکترونیکی: alireza54.barari@gmail.com، صندوق پستی: ۴۶۱۷۹۷۹۶۳۸)

سوپر اکسید همراه است و ممکن است باعث تسریع تخریب غضروف شود (۳، ۵). در هر دو سلول‌های غضروفی مفصلی و کندروسیت‌های منیسک، FGF-2 باعث تغییر نسبت بین کلازن نوع II و نوع I می‌شود و به طور بالقوه باعث تشکیل فیبروکارتیلاژ، به عنوان جایگزین معیوب برای غضروف هیالین سالم می‌شود (۷). FGF-2 همچنین مسیر NF κ B را فعال می‌کند، که در جهت فعال کردن فاکتور-1 Elk-1 موازی با مسیر MAP کیناز است و رونویسی MMP-13 را تحریک می‌کند (۲). اخیراً، یان و همکاران اظهار داشتند که نقش‌های FGF-2 ممکن است به تفاوت گیرنده‌های FGF در بافت‌ها بستگی داشته باشد (۶). بعد از FGFR3 (FGFR) در بافت‌ها بستگی داشته باشد (۶). اتصال لیگاند توسط FGF-18، نقش مهمی در سنتز غضروف مفصلی دارد، که با تحریک پروستاگلاندین‌ها همراه است (۸). البته اثرات FGF-2 بر غضروف مفصلی ممکن است به گونه‌های مختلف فعال وابسته باشد. به عنوان مثال، در غضروف موس، اثرات آنابولیکی را القا می‌کند (۴). در حالیکه نقش آن در غضروف مفصلی انسان به نظر می‌رسد کاتابولیک و ضد آنابولیک است (۵، ۳). نشانگرهای زیستی مربوط به شروع انحطاط غضروف مفصلی در مرحله اولیه شامل تعدادی آنزیم تخریب‌کننده ماتریس، مانند خانواده متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP)، خانواده متالوپروتئیناز با ترومبوسپوندین نوع ۱ (ADAMTS)، اگریکان‌ها و غیره می‌باشد (۹). بیشترین مطالعه در متالوپروتئینازهای ماتریکس و نقش آن در غضروفدر MMP-13 اتفاق افتاده است، زیرا بهدلیل توانایی قوی آن در برش دادن کلازن نوع II، عامل اصلی کاتابولیک در استئوآرتربیت محسوب می‌شود. در یک مدل OA آزمایشی موس با استفاده از تکنیک میکروسکوپی، سطح MMP-13 با حضور سلول‌های غضروفی پاتولوژیک که در مرحله اولیه توسعه استئوآرتربیت تمایز یافته هایپرتروفیک hypertrophic differentiation ارتباط دارد و بیان بیش از حد آن می‌تواند از طریق افزایش تخریب ECM سبب استئوآرتربیت اولیه گردد (۱). در نمونه‌های بالینی و در مرحله اولیه تنظیم افزایشی MMP-13 غضروف انسانی کاهش می‌یابد. بنابراین،

مقدمه

استئوآرتربیت به عنوان یکی از بیماری‌های رایج است که میلیون‌ها انسان را در سال درگیر می‌کند. این بیماری به صورت از دست دادن غضروف مفصلی، تغییرات استخوانی هایپرتروفیک و التهاب غشای سینوویال توصیف می‌شود (۱). اگرچه علت اصلی ابتلا به استئوآرتربیت (OA) هنوز کاملاً درک نشده است، اما یک بیماری مفصلی دژنراتیو مفصل است که با تجزیه ماتریکس خارج سلولی غضروف (ECM) مشخص می‌شود. در شرایط عادی، در سلول‌های غضروف مفصلی تعادل پویا بین سنتز و تخریب اجزای ECM، از جمله فیبرهای کلازن نوع II و پروتئوگلیکان (PG) وجود دارد (۱). در OA، اختلال در تعادل ماتریس وجود دارد که منجر به از دست رفتن تدریجی بافت غضروف و گسترش کلونال سلول‌ها در مناطق تخلیه شده می‌شود. متابولیسم سلول‌های غضروفی بهدلیل تولید بیش از حد فاکتورهای کاتابولیک تخریب می‌شود، این فاکتورهای کاتابولیک عبارتند از: متالوپروتئینازهای ماتریسی (MMPs) و سایر سیتوکین‌های پیش التهابی هستند که موجب تخریب پروتئوگلیکان در ماتریکس غضروف می‌شود (۲). از طرفی FGF2 عضو خانواده بزرگی از FGF از پروتئین‌های مرتبط است که رشد، تمایز، مهاجرت و بقای طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌ها را تعديل می‌کند (۳). با این حال مطالعات در مورد FGF-2 با توجه به نقش آنابولیک یا کاتابولیک آن در هموستاز غضروف مفصلی نتایج متناقض را به همراه داشته است (۳). محققان متعددی نقش محافظت کننده FGF-2 را در متابولیسم غضروف پیشنهاد کرده‌اند. به عنوان مثال FGF-2 پس از آسیب دیدگی مکانیکی ECM آزاد می‌شود و اثرات محافظتی و مفیدی را در مفاصل موس ایجاد می‌کند. در موس‌های فاقد FGF-2 با افزایش سن و بی ثبات کردن مفصل درگیری استئوآرتربیت افزایش می‌یابد (۴). در مقابل محققان دیگر نقش کاتابولیک FGF-2 را در هموستاز غضروف مفصلی نشان داده‌اند (۳، ۵، ۶). در غضروف مفصلی انسان FGF-2 با تخریب مفاصل از طریق تنظیم MMPs، آگریکان‌ها و همچنین aggrecanases تحریک گونه‌های اکسیژن فعل مانند نیتریک اکسید و آنیون

انجام تمرینات مختلف ورزشی و شیوه زندگی فعال، برای کاهش نشانه‌ها و عوارض استئوآرتیت مفید است و همچنانی سبب بهبود تعادل، انعطاف‌پذیری، قدرت و دامنه حرکتی مفصل در عضو صدمه می‌گردد. البته سلول‌های بنیادی، توانایی تکثیر و تمایز را دارند. سلول درمانی، روش رساندن مستقیم و موضعی سوسپانسیون سلولی به محل است. تزریق مستقیم سلول به محل آسیب می‌تواند مانع ادامه تخریب بافت شود و در کنار آن ترمیم را تحریک کند. با این حال، نتایج سلول درمانی به میزان آسیب، نوع سلول درمانی، وسیله تزریق، مقدار و روش تزریق وابسته است (۱۶). امروزه نقش سلول بنیادی در پژوهشی، افزایش یافته است، زیرا که منجر به تولید سلول‌های مورد نظر و بافت قابل پیوند می‌گردد (۱۷). با توجه به روند رو به رشد چاقی و سالمندی، شیوع استئوآرتیت و هزینه‌های اقتصادی آن نیز رو به افزایش است. از این رو، نیاز به اعمال مداخله‌های مناسب برای سالمندان مبتلا به استئوآرتیت زانو، بیش از پیش نیاز است. با توجه به نیاز جامعه در پیشگیری و درمان استئوآرتیت و نتایج ضد و نقیض در مقالات مختلف محقق به دنبال این هدف است که آیا اثر تمرینات استقامتی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن PDGF و PDGFr در بافت زانو موش‌های مبتلا به استئوآرتیت زانو موثر است.

روش بررسی

آزمودنی‌های این طرح پژوهشی شامل موش‌های صحرایی نر بالغ ۱۲-۸ هفته‌ای ویستار بودند که در این طرح تجربی ۳۵ سر موش با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از مرکز تحقیقات آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب و به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. موش‌ها به صورت گروه‌های ۳ تایی در هر قفس در شرایط اتاق (قفس‌هایی از جنس پلی کربنات شفاف به ابعاد $۱۵ \times ۲۶/۵ \times ۴۲$ ، دمای ۲ ± ۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵ ± ۵ درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهییه مناسب نگهداری شدند. در طول زمان تحقیق حیوانات از غذای پلت ساخت شرکت به پرورکرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به وزن

یک نقش محوری در شبکه تخریب غضروفی است (۱۰). گالویس و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر ورزش با شدت متوسط را در بهبود استئوآرتیت مثبت ارزیابی کردند. نتایج این تحقیقات نشان داد که دویدن با شدت کم و متوسط تاثیر مثبتی بر کاهش زخم‌های غضروفی دارد ولی تمرین با شدت بالا باعث تخریب سطح مفصلی می‌گردد (۱۱). همچنان سیفوئنتس و همکاران، ۲۰۱۰ نیز دویدن با شدت متوسط را بر زانوی موش صحرایی مبتلا به استئوآرتیت مثبت ارزیابی کردند (۱۲). عزت‌پناه و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که ورزش‌های سبک و مفرح مثل پیاده‌روی و شنا برای بهبود استئوآرتیت بیشتر توصیه می‌شوند. ورزش کردن، عضلات اطراف مفاصل را تقویت کرده و سبب افزایش ثبات مفصل می‌گردد (۱۳). البته گالویس و همکاران نشان دادند که فشار زیاد، استفاده بیش از حد و ضربه به مفصل زانو یکی از علل فرسایش مفصل زانو و شروع استئوآرتیت است. اما در بررسی خود در زانوی بازیکنان تنیس به این نتیجه رسیدند که بین ایجاد استئوآرتیت در بازیکنان تنیس و گروه کنترل تفاوتی وجود نداشت (۱۱، ۱۳). رمضانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در زمینه استئوآرتیت زانو در ورزش کشتی نشان دادند که بین میانگین درجه استئوآرتیت زانو در ورزشکاران و غیر ورزشکاران تفاوت زیادی وجود دارد. نتایج این تحقیقات نشان داد که میانگین میزان شدت درد، میزان علایم و مشکلات عملکرد حرکتی در فعالیت‌های روزانه در گروه ورزشکار پایین‌تر از غیر ورزشکار بود (۱۴).

سن تنو و همکاران (۲۰۱۸) به مقایسه تاثیر سلول‌های بنیادی و تمرینات بدنی بر درمان بیماران دارای استئوآرتیت ملایم زانو پرداختند برنامه تمرینی شامل شش هفته تمرین مقاومتی بر اندام تحتانی و همچنان تمرین هوایی پیاده‌روی و قدمزدن در آب بود. نتایج نشان داد که با وجود مادر بودن تمرینات بدنی، نقش تزریق سلول‌های بنیادی بر درمان استئوآرتیت بیشتر بود (۱۵). سازمان جراحان حرفه‌ای آمریکا و انجمن روماتولوژی، مداخله‌های محافظه‌کارانه را به عنوان راهبرد اصلی برای کنترل استئوآرتیت زانو پیشنهاد کردند و

دقیقه دویden بر روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در هفته اول شروع شد که به تدریج به ۵۰ دقیقه در هفته سوم رسید. گرمکردن و سرد کردن در مدت زمان ۵ دقیقه در ابتدا و انتهای تمرین انجام شد. ۸ هفته پس از اجرای تحقیق تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات (جهت حذف اثرات حاد تمرین و مکمل)، یکی از ابزارهای مورد استفاده در این تحقیق تزریق داخل صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بازای هر کیلوگرم) و زایلوزین (۳-۵ میلی‌گرم بازای هر کیلوگرم وزن) بود که به کمک آن موش‌ها بی‌هوش و کشته شدند. از ابزارهای دیگر مورد استفاده نمک بافر فسفات (۰.۰۱ M; pH 7.۰) بود که بافت‌های غضروفی در در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آن جدا و همگن شدند کیت RNX-Plus ساخت شرکت سیناژن، ایران استخراج شد. از ابزارهای دیگر مورد استفاده در این تحقیق: کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪/PBS، استریل و ویال‌های ۱.۵ میلی‌لیتری استریل شده با اتوکلاو بود. ابتدا سلول را از فلاسک با تریپسینه کردن جدا و با سانتریفیوژ رسوب می‌دهیم. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول plusRNA را به نمونه سلولی اضافه می‌گردد. سپس محلول ایجاد شده را ویال ۱.۵ میلی‌لیتری منتقل می‌کنیم سپس این مخلوط را به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه هموژن و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم. سپس مقدار ۲۰۰ لاندا کلروفرم به ویال اضافه می‌کنیم. سپس ویال به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه می‌گردد. ویال در دمای ۴ درجه و با دور ۱۲۰۰ rpm- ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد. در این مرحله سه بخش ایجاد می‌گردد. فاز آبی بالایی شامل RNA است. فاز سفید میانی پروتئین است و فاز پایینی شامل DNA و فنول است. سپس با احتیاط فاز آبی بالایی را برداشته و به یک ویال بدون RNase منتقل می‌گردد. کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی نانو دروپ (Thermo Sci, Newington, CT, USA) ND-1000 در نظر گرفته شد.

کشی هفتگی) تغذیه شدند و به صورت آزاد از بطی‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند. استئوآرتربیت بهروش جراحی و بر اساس روش یامانی و همکاران (۲۰۱۴) القا شد (۱۸). بهطور مختصر، ابتدا موش‌ها با داروی کتامین و زایلوزین بی‌هوش شدند. بعد از شیو کردن زانوی پای راست توسط تیغ بی‌سوری یک برش افقی ۱ سانتی‌متری در بخش داخلی مفصل زانو ایجاد شد. مفصل زانو بالا‌فصله از طریق دررفتگی جانبی کشگک و رباط کشگکی باز شد. پس از کنار زدن پوست لیگامان داخلی جانبی زانو کنار زده می‌شود تا مینیسک داخلی مشاهده شود. سپس با ایجاد یک برش به صورت ناقص منجر به پارگی و ایجاد آسیب در مینیسک می‌شود و در آخر ناحیه به روش استریل بخیه زده می‌شود. موش‌های مبتلا به استئوآرتربیت 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 زنده ویستار (با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۰۰ گرم) پس از کشته شدن حیوان از ناحیه استخوان ران و درشت نئی سلول مغز استخوان جمع‌آوری و MSCs جدا شده در محیطی با DMEM با ۲۰٪ FBS در طول یک شبانه روز برای انتخاب سلول‌های چسبان انکوبه شدند. کشت‌ها از محیط فلاسک هر سه روز تعویض شدند تا سلول‌هایی که نچسبیده بودند جدا شوند و MSCs ها بعد از ۳ تا ۴ بار پاساز 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 خواهد شد و در طول دوره ریکاوری و به عنوان یک بار تزریق در محل القاء مدل سلول‌ها تزریق خواهد شد. گروه موش‌های صحرایی MSCs تزریق داخل سلول‌های ۱۰۶ سلول/کیلوگرم را دریافت کردند. آشنایی با محیط پژوهش و نوار گردان زانو راست تزریق شدند. آشنایی با محیط پژوهش و نوار گردان بود. بدین منظور موش‌ها در این مرحله ۵ روز، یک بار در هفته به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد بر روی تردمیل فعالیت کردند. برنامه تمرینی با ۳۰

نانومتری بود. مرحله نگهداری RT-PCR در ۱۰:۰۰ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد بود. مراحل چرخه به شرح زیر بود: ۴۰ چرخه؛ ۹۵.۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه. توالی های اولیه به شرح زیر سنتز شدند: ΔCT (Delta Ct) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. $\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$. سطح بیان ژن با روش ΔCT تعیین شد.

تکمیلی RNA (cDNA) از نمونه های RNA با استفاده از (Thermo science, Germany) RevertAid Reverse Transcriptase در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت و آغازگرهای هگزامر تصادفی (Thermo science, Germ any) Real Q-PCR و Rotor-Gene 6000 در ۴۰ چرخه برای تقویت استفاده شدند. یک ترموسیکل 29 Master Mix Kit هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر میکرون مستر و پرایمرهای ۱۰۰

FGF2:(forward)	5'-CCCTGCCATTGGAGGAAGAG-3'
FGF2:(reverse)	5'-TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG-3'
MMP13:(forward)	5'-ATCAATCAGCCCAGATGGAC-3'
MMP13:(reverse)	5'-TTCACGGGCAGAAAGGTACT-3'

همچنین تفاوت معنی داری در میانگین و انحراف معیار پروتئین MMP13 بین گروه های مختلف مشاهده گردید ($p<0.000$). نتایج نشان می دهد که بیان ژن MMP13 در گروه های سالین روند کاهشی و در گروه سالین و تمرین افزایش داشته است. (جدول ۱). تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که تمرینات بدنی و درمان با سلول های بنیادی بر بیان ژن FGF-2 مosh های مبتلا به استئوآرتیت در گروه های مختلف تاثیر دارد. همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی توکی سطح تغییرات بیان ژن FGF-2 در بین گروه کنترل با گروه سالین، تمرین، بنیادی و تمرین-بنیادی معنی دار بود (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که تمرینات بدنی و درمان با سلول های بنیادی بر بیان MMP-13 مosh های مبتلا به استئوآرتیت در گروه های مختلف تاثیر دارد. همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی توکی تفاوت سطح تغییرات بیان ژن MMP-13 در بین گروه های مختلف نشان داده شده است. این تغییرات بین گروه کنترل با گروه سالین، تمرین و تمرین-بنیادی معنی دار بود. همچنین بین گروه سالین با گروه تمرین، بنیادی و تمرین-بنیادی نیز تفاوت معنی دار وجود داشت و البته بین گروه تمرین با گروه بنیادی نیز معنی دار بود (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک و بررسی تجانس واریانس ها از آزمون لوین استفاده می شود. همچنین برای بررسی تغییرات معنی داری هر یک از متغیرهای تحقیق، بین گروه های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده می گردد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات $P<0.05$ در نظر گرفته می شود. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام می گیرد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به شماره R.IAU.SARI.REC.1397.8 تصویب شد.

نتایج

نتایج نشان می دهد تفاوت معنی داری در میانگین و انحراف معیار سطح بیان FGF2 بین گروه های مختلف مشاهده گردید ($p<0.000$). کمترین بیان FGF2 در گروه مکمل سالم و بیشترین سطوح آن در گروه تمرین و سالین مشاهده شد.

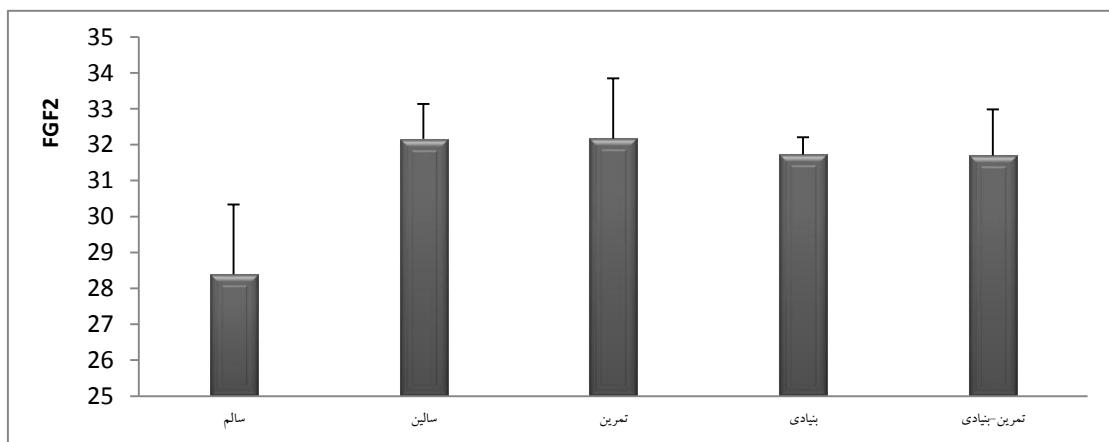
تمرین استقامتی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن FGF2 و MMP13 در موش‌های مبتلا به استئوآرتربیت

جدول ۱: ویژگی‌های توصیفی متغیرهای تحقیق دریافت‌زانو موش‌های مبتلا به استئوآرتربیت (میانگین \pm انحراف معیار)

MMP13	FGF2	متغیر گروه
$17/62 \pm 4/00$	$28/39 \pm 0/36$	سالم
$61/56 \pm 6/57$	$32/16 \pm 1/17$	سالین
$40/8 \pm 7/22$	$32/17 \pm 1/38$	تمرین
$27/6 \pm 5/49$	$31/73 \pm 1/05$	بنیادی
$32/72 \pm 8/73$	$31/7 \pm 1/63$	تمرین-بنیادی

جدول ۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن FGF2 در گروه‌های مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
بین گروه‌ها			$51/426$	۴	$12/856$
درون گروه			$28/888$	۲۰	$1/444$
مجموع		۲۴	$80/314$		$8/901$

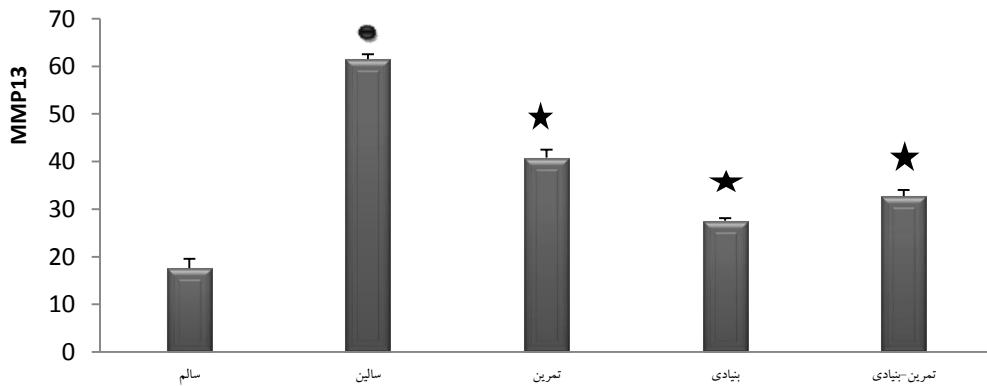


نمودار ۱: مقایسه تغییرات بین مقادیر بیان ژن FGF2 در گروه‌های تحقیق

تفاوت معنادار با گروه سالم

جدول ۳: نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن MMP13 در گروه‌های مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
بین گروه‌ها			$77\ 54/392$	۴	$1269/348$
درون گروه			$871/648$	۲۰	$43/582$
مجموع		۲۴	$6349/040$		$31/420$



نمودار ۲: مقایسه تغییرات بین مقادیر بیان ژن MMP13 در گروههای تحقیق

تفاوت معنادار با گروه سالم * تفاوت معنادار با گروه سالم *

بحث

القاء فوق العاده از ADAMTS-5 mRNA را نشان دادند و نتایج این تحقیق نشان داد که FGF-2 به طور معمول از فعالیت آنزیم آگرگاناز جلوگیری می‌کند البته الاستاز، کلاژنаз و آگرگاناز از آنزیم‌های مخرب سطوح مفصلی هستند که FGF-2 می‌تواند از تخریب غضروف مفصلی جلوگیری کند (۲۰). برخی دیگر استفاده از FGF-2 را سبب احیاء و ترمیم غضروف می‌دانند (۲۱). در مقابل محققان دیگری نقش کاتابولیک و یا ضد آنابولیک FGF-2 را در هموستاز غضروف مفصلی نشان داده‌اند (۳، ۵، ۶). در غضروف مفصلی بزرگسالان، FGF-2 از طریق تنظیم MMPs و aggrecanases و همچنین تحریک گونه‌های اکسیژن فعل مانند نیتریک اکسید و آنیون سوپر اکسید سبب تخریب مفاصل می‌گردد و ممکن است باعث تسريع تخریب غضروف گردد (۳، ۵). در هر دو سلول‌های غضروف مفصلی و کندروسیت‌های منیسک، FGF-2 باعث تغییر نسبت بین کلاژن نوع II و نوع I می‌گردد و به طور بالقوه باعث تشکیل فیبروکارتیلاژ می‌شود و همچنین، یک جایگزین نامناسب برای غضروف هیالین خواهد بود (۸). علاوه بر این، FGF-2 اثرات آنابولیک هم‌افزایی IGF-1 و BMP-7 را از طریق پروتئین کیناز C δ (PKCδ) و همچنین فعل سازی وابسته به چندین کیناز MAP متعدد (2 / ERK1, JNK, P38) در سلول‌های غضروفی مفصلی انسان در بزرگسالان را مهار می‌کند (۵). FGF-2 همچنین مسیر NFκB را فعال و سبب تحریک رونویسی MMP-13 می‌گردد (۲) در این تحقیق استئوآرتیت

در این تحقیق تاثیر تمرينات استقامتی و مصرف سلول‌های بنیادی بر بیان ژن FGF2 و MMP13 در بافت‌زانو موش‌های مبتلا به استئوآرتیت زانو مورد بررسی قرار گرفته است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تمرينات بدنه و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن FGF2 و MMP13 موش‌های مبتلا به استئوآرتیت در گروههای مختلف تفاوت معناداری داشت. همچنین آزمون تعقیبی نشان داد که سطح تغییرات بیان ژن FGF2 در گروه شم نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت؛ در حالی که تمرينات بدنه و سلول‌های بنیادی موجب کاهش سطح FGF2 در گروههای تجربی شد؛ اما به سطح معناداری نرسید. خانواده فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) در تنظیم هموستاز هر دو غضروف مفصلی و دیسک بین مهره‌ای نقش دارد (۱۹). با این حال، نتایج مطالعات مختلف در مورد نقش آنابولیک و کاتابولیک FGF-2 در هموستاز غضروف مفصلی، ضد و نقیض بود (۳). به عنوان مثال FGF-2 پس از آسیب دیدگی یا فشرده سازی مکانیکی ECM آزاد می‌گردد و اثرات محافظتی و مفیدی را در مفاصل موش‌ها ایجاد می‌کند. البته در موش‌های فاقد FGF-2 میزان استئوآرتیت افزایش یافت (با افزایش سن و بی ثبات کردن مفصل) و در برخی مدل‌های تحقیقاتی با تزریق زیر جلدی FGF-2 معکوس شد (۴). در همان مدل، موش‌های بدون استفاده از FGF-2 یک

و همکاران این احتمال وجود دارد که تفاوت‌های خاص گونه‌ها (یعنی موش‌ها در مقابل غضروف انسان) پس از تحریک با FGF-2 احتمالاً با تغییر سطح بیان FGFR همراه است^(۶). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که سطح تغییرات بیان ژن MMP13 در گروه شم نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت؛ در حالی که تمرینات بدنی و سلول‌های بنیادی موجب کاهش معنادار سطح MMP13 در گروه‌های تجربی شد. نشانگرهای زیستی که مربوط به شروع تخریب غضروف مفصلی در مرحله اولیه استئوآرتربیتاست، این موارد شامل تعدادی آنزیم تخریب‌کننده ماتریس، مانند خانواده متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP)، خانواده متالوپروتئیناز با ترومبوپسیوندین نوع ۱ (ADAMTS)، اگر یکان‌ها و غیره است^(۹). از بین این پروتئینازها، توجه به MMP-13 معطوف شده است زیرا در مفاصل و غضروف مفصلی در بیماران مبتلا به OA به طور چشمگیری بیان شده است و به سختی در بافت‌های عادی بزرگسالان قابل تشخیص است. MMP-13 به عنوان یک آنزیم تخریب‌کننده ماتریکس خارج سلول (ECM) در اتصالات OA عمل می‌کند^(۲۴). MMP-13 از لحاظ نقش آن در غضروف، بیشترین مورد مطالعه در مورد متالوپروتئیناز‌های ماتریکسی است، زیرا بدلیل توانایی شدید آن در برش دادن کلژن نوع II، عامل اصلی کاتابولیک در استئوآرتربیت محسوب می‌گردد^(۲۵). نتایج یک تحقیق نشان داد که در یک مدل OA آزمایشی در موش با استفاده از تکنیک میکروسکوپی، سطح MMP-13 با حضور سلول‌های غضروفی پاتولوژیک که در مرحله اولیه توسعه OA تحت تمایز هایپرتروفیک قرار می‌گیرند ارتباط دارد و بیان بیش از حد آن می‌تواند از طریق افزایش تخریب بیش از حد ECM سبب استئوآرتربیت اولیه گردد^(۱). در نمونه‌های بالینی MMP-13 به طور غیرطبیعی در مراحل مختلف فرایند استئوآرتربیت بیان شد و در مرحله اولیه تنظیم افزایشی نشان داد ولی در اواخر OA غضروف انسانی تنظیم کاهشی نشان داد. بنابراین از آنجا که MMP-13 یک نقش مرکزی در شبکه تخریب غضروف دارد^(۱۰). با این وجود MMP-13 به عنوان عامل اصلی تخریب غضروف در

موجب افزایش FGF2 در گروه شم گردید و تمرینات استقامتی و سلول‌های بنیادی نیز موجب کاهش سطح FGF2 گردید که البته به سطح معناداری نرسید. لی و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به بررسی نقش اثرات بیولوژیکی گونه‌های FGF-2 در غضروف مفصلی پرداختند. در غضروف مفصلی انسان، FGF-2 نقش کاتابولیک و ضد آنابولیک در هموستاز غضروف و همچنین تخریب و آرتروزرا دارد. در مفاصل موش، FGF-2 به عنوان یک واسطه آنابولیک شناخته شده است و به عنوان فرسایش ژن FGF-2 حساسیت بیشتری به استئوآرتربیت نشان داده است. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت‌های اساسی در پاسخ‌های سلولی بین بافت‌های انسانی و موش ممکن است برای الگوهای بیان متمایز FGFR در حضور FGF-2 باشد. البته تحقیقات نشان داد که باید در زمینه اثر متقابل FGFRها و آبشارهای سیگنالینگ پایین دست ناشی استفاده FGF-2 در غضروف انسان محتاط بود^(۲۲). اخیراً، یان و همکاران اظهار داشتند که نقش‌های متضاد FGF-2 ممکن است به تفاوت گیرنده‌های FGF در بافت‌ها بستگی داشته باشد که از طریق اعضای چهار گیرنده FGFR1-4 منتقل می‌گردد^(۶، ۲۳). تحقیقات نشان داد که غضروف مفصل زانو در انسان عمدها FGFR1 و FGFR3 را با سطح قابل توجهی از FGFR2 و FGFR4 بیان می‌کند. همچنین FGFR مسئول بسیاری از پیامدهای بیولوژیکی منفی پس از تحریک با FGF-2 است و سبب تنظیم مجدد MMP-13 و مهار تجمع پروستاگلاندین‌ها می‌گردد^(۵). در واقع، در غضروف تخریب شده، یک افزایش FGFR1 به FGFR3 وجود دارد که نقش غالب مسیر FGF-2-FGFR1 در تخریب غضروفها را نشان می‌دهد. از طرف دیگر، FGFR3 بعد از اتصال لیگاند توسط FGF-18، نقش آنابولیکی دارد، و سبب تحریک قوی سنتز پروستاگلاندین FGFR3 و FGFR1 می‌گردد^(۷). این یافته‌ها اثرات متضاد مهم FGFR3 و FGFR1 را در غضروف مفصلی انسان نشان می‌دهد. به عنوان مثال، در غضروف موش، FGF-2 اثرات آنابولیک را نشان می‌دهد^(۴). در حالی که به نظر می‌رسد نقش آن در غضروف مفصلی انسان کاتابولیک و ضد آنابولیک است^(۳، ۵). بر اساس تحقیقات یان

Aین یک گره مرکزی در شبکه تخریب غضروف است. MMP-13 این شبکه‌های نظارتی آن اهداف مناسبی برای توسعه استراتژی‌های درمانی زودرس برای پیشگیری و درمان استئوآرتریت محسوب می‌گردد (۲۹).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استئوآرتریت موجب افزایش سطوح FGF2 و MMP13 در بافت غضروف موش‌های مبتلا به استئوآرتریت شد و تمرینات استقامتی به همراه سلول‌های بنیادی موجب ایجاد روند کاهشی در سطح مقادیر فاکتورهای مورد نظر شد. موارد فوق نشان می‌دهد که FGF2 و MMP13 می‌توانند اهداف مناسبی برای توسعه استراتژی‌های درمانی تشخیص زودرس برای OA باشند.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل نتایج پایان نامه دانشجویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی می‌باشد که از دانشگاه مذکور و تمامی عوامل دخیل و همکار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تشکر می‌شود.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

استئوآرتریت و مشهودترین و مفیدترین کاندیدای متالوپروتئینازهای ماتریسی به عنوان یک نشانگر مهم در این بیماری است. به نظر می‌رسد بیان ژن MMP-13 از طریق تعدادی از مسیرهای مولکولی و از طریق التهاب وارد عمل می‌گردد. یمانی و لوسر (۲۰۱۴) نشان دادند که Nupr1، که در غضروف بیان شده است، برای بیان MMP-13 از طریق آزادسازی IL-1 است (۱۳). در حالیکه این محققان چندین ژن مرتبط با تنظیم MMP را شناسایی کردند، غالب آن‌ها با التهاب همراه بودند. سوگیتا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که فاکتور رونویسی مویی و تقویت کننده اسپلیت ۱ (Hes1) در تنظیم بیشتر بیان MMP-13 نقش دارد (۲۶). معمولاً Hes1 به عنوان یک سرکوب گر رونویسی عمل می‌کند اما تحت تأثیر آن پروتئین کیناز ۲ وابسته به کلسلیم/کالمودولین (CaMK2) آن را به یک فعال کننده رونویسی تبدیل می‌شود، بنابراین بیان MMP-13 را تنظیم می‌کند (۲۷). بنابراین Hes1 برای افزایش بیان MMP-13 عمل می‌کند. جالب است بدانیم که Hes1 از طریق مسیر سیگنالینگ Notch عمل می‌کند (۲۸). هوچبرگ و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی به بررسی بینش جدید در خصوص شبکه تنظیمی MMP-13 در پاتوژنز استئوآرتریت اولیه پرداختند. از بین این پروتئینازها، متالوپروتئیناز ماتریس (MMP-13) بیشترین توجه را به خود جلب کرده است، زیرا

References:

- 1-Nugent M. *Micronas: Exploring New Horizons in Osteoarthritis*. Osteoarthr Cartil 2016; 24(4): 573-80.
- 2-Muddasani P, Norman JC, Ellman M, Van Wijnen AJ, Im Hee-Jeong. *Basic Fibroblast Growth Factor Activates the MAPK and Nfkappab Pathways that Converge on Elk-1 to Control Production of Matrix Metalloproteinase-13 by Human Adult Articular Chondrocytes*. J Biol Chem 2007; 282(43): 31409-21.
- 3-Ellman MB, An HS, Muddasani P, Im HJ. *Biological Impact of the Fibroblast Growth Factor Family on Articular Cartilage and Intervertebral Disc Homeostasis*. Gene 2008; 420: 82-9.
- 4-Chia SL, Sawaji Y, Burleigh A, Mclean C, Inglis J, Saklatvala J, et al. *Fibroblast Growth Factor 2 is an Intrinsic Chondroprotective Agent that Suppresses ADAMTS-5 and Delays Cartilage Degradation in*

- 5-** Im HJ, Li X, Muddasani P, Kim GH, Davis F, Rangan J, et al. **Basic Fibroblast Growth Factor Accelerates Matrix Degradation via a Neuro-Endocrine Pathway in Human Adult Articular Chondrocytes.** *J Cell Physiol* 2008; 215(2): 452-63.
- 6-** Yan D, Chen D, Cool SM, Van Wijnen AJ, Mikecz K, Murphy G, et al. **Fibroblast Growth Factor Receptor 1 is Principally Responsible for Fibroblast Growth Factor 2-Induced Catabolic Activities in Human Articular Chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2011; 13(4): R130.
- 7-** Davidson D, Blanc A, Filion D, Wang H, Plut P, Pfeffer G, et al. **Fibroblast Growth Factor (FGF) 18 Signals through FGF Receptor 3 to Promote Chondrogenesis.** *J Biol Chem* 2005; 280(21): 20509-15.
- 8-** Stewart K, Pabbruwe M, Dickinson S, Sims T, Hollander AP, Chaudhuri JB. **The Effect of Growth Factor Treatment on Meniscal Chondrocyte Proliferation and Differentiation on Polyglycolic Acid Scaffolds.** *Tissue Eng* 2007; 13(2): 271-80.
- 9-** Matyas J, Atley L, Ionescu M, Eyre D, Poole A. **Analysis of Cartilage Biomarkers in the Early Phases of Canine Experimental Osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2004; 50(2): 543-52.
- 10-** Philipot D, Guerit D, Platano D, Chuchana P, Olivotto E, Espinoza F, et al. **P16ink4a and its Regulator Mir-24 Link Senescence and Chondrocyte Terminal Differentiation-Associated Matrix Remodeling in Osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2014; 16(1): R58.
- 11-** Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, et al. **Dose-Response Relationship for Exercise on Severity of Experimental Osteoarthritis in Rats: A Pilot Study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(10): 779-86.
- 12-** Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, et al. **Decrease in Oxidative Stress and Histological Changes Induced by Physical Exercise Calibrated in Rats with Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(8): 1088-95.
- 13-** Ezadpanah A, Moazami M, Khoshraftar Yazdi N. **Effect of a Period of Therapeutic Exercise and Detraining after that on Balance in the Women with Knee Osteoarthritis.** *J Mod Rehabil* 2016; 93(3): 101-9. [Persian]
- 14-** Ramezani M, Nekozad N. **Comparison between the Effectiveness of Glucosamine Sulfate and Zintoma on Clinical Improvement of Knee Osteoarthritis.** *Ebnesina* 2011; 14(3): 29-34. [Persian]
- 15-** Centeno C, Sheinkop M, Stemper I, Williams C, Hyzy M, Ichim T, et al. **A Specific Protocol of Autologous Bone Marrow Concentrate and Platelet Products versus Exercise Therapy for Symptomatic Knee Osteoarthritis a Randomized Controlled Trial with 2 Year Followup.** *J Transl Med* 2018; 16: 355.
- 16-** Ratajczak M. **Advances in Experimental Medicine and Biology, Stem Cells Therapeutic Applications, Springer.** 2019. Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9783030312053>. Accessed April 9, 2021.
- 17-** Askari F, Solouk A, Shafieian M, Seifalian AM. **Stem Cells for Tissue Engineered Vascular Bypass**

Grafts. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2017; 45(5): 999-1010.

18- Yammani RR, Loeser RF. *Stress-Inducible Nuclear Protein 1 Regulates Matrix Metalloproteinase 13 Expression in Human Articular Chondrocytes.* Arthritis & Rheumatology 2014; 66(5); 1266-71.

19- Friedl A, Chang Z, Tierney A, Rapraeger AC. *Differential Binding of Fibroblast Growth Factor-2 and -7 to Basement Membrane Heparan Sulfate: Comparison of Normal and Abnormal Human Tissues.* Am J Pathol 1997; 150: 1443-55.

20- Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, et al. *Matrix Metalloproteinase 13-Deficient Mice are Resistant to Osteoarthritic Cartilage Erosion but Not Chondrocyte Hypertrophy or Osteophyte Development.* Arthritis Rheum 2009; 60(12); 3723-33.

21- Deng T, Huang S, Zhou S, He L, Jin Y. *Cartilage Regeneration Using A Novel Gelatin-Chondroitinhyaluronan Hybrid Scaffold Containing Bfgf-Impregnated Microspheres.* J Microencapsul 2007; 24(2): 163-74.

22- Li H, Wang D, Yuan Y, Min J. *New Insights on the MMP-13 Regulatory Network in the Pathogenesis of Early Osteoarthritis.* Arthritis Res Ther 2017; 19(1): 1-2.

23- Ornitz DM. *Fgfs, Heparan Sulfate and Fgfrs: Complex Interactions Essential for Development.* Bioessays 2000; 22: 108-12.

24- Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H. *The Role of the C-Terminal*

Domain of Human Collagenase-3 (MMP-13) in the Activation of Procollagenase-3, Substrate Specificity, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Interaction. J Biol Chem 1997; 272(12): 7608-16.

25- Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y. *Matrix Metalloproteinases, a Disintegrin and Metalloproteinases, and a Disintegrin and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs in Non-Neoplastic Diseases.* Pathol Int 2010; 60(7): 477-96.

26- Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobayashi H, et al. *Transcription Factor Hes1 Modulates Osteoarthritis Development in Cooperation with Calcium/Calmmodulin-Dependent Protein Kinase 2.* Proc Nat Acad Sci U S A 2015; 112(10): 3080-85.

27- Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK, et al. *Activating the PARP-1 Sensor Component of the Groucho/ TLE1 Corepressor Complex Mediates a Camkine II-Dependent Neurogenic Gene Activation Pathway.* Cell 2014; 119(6): 815-29.

28- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. *The Hes Gene Family: Repressors and Oscillators that Orchestrate Embryogenesis.* Development 2007; 134(7): 1243-51.

29- Sarav S, Mithoefer K. *Current Applications of Growth Factors for Knee Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment.* Curr Rev Musculoskelet Med 2020; 13(6): 641-50.

Effect of Endurance Training and Stem Cell on Fgf2 and Mmp13 Gene Expression in Knee Tissue of Rats with Osteoarthritis

Mahnaz Alinejad¹, Alireza Barari^{†2}, Asieh Abbasi Daloii³, Parvin Farzanegi⁴

Original Article

Introduction: The aim of this study was to investigate the effect of endurance training and stem cell injection on FGF2 and MMP13 gene expression in knee tissue of rats with knee osteoarthritis.

Methods: The type of study was an experimental one. Male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: control - healthy, control - patient, patient - stem cell, patient - training, and patient - training - stem cell. The training program consisted of 30 minutes of running on a treadmill with no slope at 16 m / min for the first week, with 1 m / min added weekly. Rats received MSCs through intracellular injection of 1*10⁶ cells / kg. Expression of FGF2 and MMP13 genes was measured by Real Time PCR. One way ANOVA and if there was a significant difference, Tukey post hoc test were used to determine the difference between groups. All statistical analyzes were performed using SPSS version 16.

Results: Data analysis showed that training and stem cell therapy have significantly increased in genes expression of FGF2 and MMP-13 in mice with osteoarthritis ($p <0.000$). Moreover, Tukey post hoc test showed a significant difference in the level of FGF2 changes in the training-stem cell groups compared to the training group and the saline group ($p=0.000$). There was also a significant difference between the MMP-13 follow-up test with the control group with the saline group, the training group and the stem cell with the train-stem cell, and the saline group with the training group⁹ ($P=0.000$).

Conclusion: The results showed that FGF2 levels and MMP13 in the cartilage tissue of mice with osteoarthritis have increased and endurance training and stem cells therapy caused a decrease in the level of factors.

Keywords: Endurance Training, Stem Cell, FGF2, Knee Osteoarthritis

Citation: Alinejad M, Barari A, Abbasi Daloii A, Farzanegi P. **Effect of Endurance Training and Stem Cell on FGF2 And MMP13 Gene Expression in Knee Tissue of Rats with Osteoarthritis.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(3): 3599-3610.

¹⁻³Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

⁴Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

*Corresponding author: Tel:09111277793, email:alireza54.barari@gmail.com