

## اثر ازن‌درمانی و تمرین هوازی با شدت متوسط بر مقدار پروتئین‌های شلترین قلب موش‌های مبتلا به استئوآریت زانو

غلامرضا کریمی<sup>۱</sup> - عباسعلی گائینی<sup>۲</sup> - رضا نوری<sup>۳\*</sup> - آزاده گیلانی<sup>۴</sup>

۱ و ۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، تهران، کیش، ایران. ۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ۳. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۳، تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۰۵/۱۵)

### چکیده

استئوآرتریت (OA) از بیماری‌های شایع در جهان است که به دلیل کاهش فعالیت بدنی، احتمال بروز بیماری‌های قلبی عروقی بیماران را افزایش می‌دهد. هدف پژوهش حاضر، مقایسه تمرین هوازی و ازن‌درمانی بر تغییرات پروتئین‌های شلترین بافت قلب موش‌های مبتلا به OA است. این تحقیق از نوع توسعه‌ای و روش آن تجربی بود که در آن ۱۵ سر موش نر ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی  $235 \pm 15$  گرم، پس از القای مدل OA، تصادفی به سه گروه ۵ تایی بیمار (OA)، بیمار و ازن‌درمانی (OAO) (ازن با غلظت  $20 \mu\text{g/ml}$ ، یک بار در هفته در خط مفصلی تیبیوفمورال ۳ مرتبه تزریق شد) و بیمار و تمرین هوازی (OAE) (۳ جلسه تمرین در هفته با سرعت ۱۶ متر در دقیقه به صورت تناوبی ۸ هفته انجام گرفت) تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از پایان تمرین، بافت قلب استخراج و با روش وسترن بلات بیان پروتئین‌های TIN2، RAP1 و TPP1 قلب اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری کوچک‌تر از ۰/۰۵ بررسی شد. نتایج نشان داد گروه OAE بیشترین افزایش مقدار پروتئین‌های TPP1 را در مقایسه با گروه‌های OA ( $P=0.016$ ) و OAO ( $P=0.001$ ) دارد، ولی تفاوت معناداری بین دو گروه OAO و OA ( $P=0.319$ ) مشاهده نشد. در سه گروه نیز تغییرات معناداری در مقدار پروتئین RAP1 ( $P=0.051$ ) مشاهده نشد. همچنین افزایش مقدار پروتئین TIN2 در گروه OAE در مقایسه با گروه OA ( $P=0.029$ ) معنادار گزارش شد، اما تفاوت معناداری بین گروه OA و OAO ( $P=0.277$ ) و OAE ( $P=0.219$ ) وجود نداشت. در مجموع، نتایج نشان داد ۸ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط سبب افزایش مقدار پروتئین‌های TPP1، TIN2 و RAP1 بافت قلب موش‌های OA می‌شود. اما در خصوص آثار ازن‌درمانی بر تغییرات پروتئین‌های شلترین بافت قلبی، به تحقیقات بیشتری نیاز است.

### واژه‌های کلیدی

ازن‌درمانی، فعالیت هوازی، TPP1، TIN2 و RAP1.

## مقدمه

شناسایی سلول‌های جوان ساز می‌شود. از آنجا که این یافته‌ها تأثیر TL در عملکرد قلب را نشان می‌دهد (۲)، تحقیقات جدید، کاهش طول تلومر را به‌عنوان یک عامل اپی‌ژنتیک بارز و شایان توجه در بیماران OA عنوان می‌کنند (۱۰) و سؤال مهم این است در درمان بیماران مبتلا به OA کدام روش موجب آسیب کمتر به طول تلومر قلبی می‌شود. درمان OA زنان شامل کم کردن درد و ترمیم ناهنجاری ایجادشده در ناحیه زانوست (۱۰). درمان قطعی این بیماری تعویض مفصل است که بسیار پرهزینه و خطرناک است. با توجه به محدودیت‌های عمر پروتزها و مشکلات جراحی تلاش بر این است تا حد امکان از جراحی پرهیز و با روش‌های درمانی غیرجراحی مانند فعالیت ورزشی، فیزیوتراپی، مصرف گلوکزامین و ازن درمانی روند درمان پیگیری شود (۱۱).

ازن اکسیژن با سه اتم است که با هدف درمان به بدن انسان وارد می‌شود، احتمالاً موجب بهبود آثار ضدباکتریایی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌شود که با فعال کردن سوخت‌وساز سلولی، موجب کاهش سنتز پروستاگلاندین و کاهش فشار اکسایشی از راه القای سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز) می‌شود و با افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت، باز شدن عروق و تحریک آنژیوژنز را به‌همراه دارد (۱۲). در کنار ازن‌درمانی، انجام فعالیت ورزشی ملایم نیز آثار چشمگیری در بهتر شدن OA زنان دارد (۱۳). برخلاف فعالیت ورزشی شدید که خطر ابتلا به OA را افزایش می‌دهد (۱۴)، فعالیت ورزشی منظم به افزایش طول تلومر و فعالیت آنزیم تلومراز بافت قلبی منجر می‌شود و در بهتر شدن بیماری قلبی مؤثر است (۱۵) و با کاهش سرعت از بین رفتن سلول‌ها، به بهبود عملکرد فیزیولوژیایی ناشی از افزایش سن منجر می‌شود (۱۶). تحقیقات زیادی به بررسی

استئوآرتریت (OA) از شایع‌ترین بیماری‌های روماتیسمی در سراسر جهان است و زانو رایج‌ترین مفصلی است که دچار این بیماری می‌شود. درد و ناتوانی در انجام فعالیت از مهم‌ترین مشکلات این بیماران محسوب می‌شود (۱). OA با افزایش سن، جنسیت (مؤنث)، آسیب‌دیدگی مفاصل، شغل و نوع فعالیت بدنی ارتباط دارد (۲). به‌نظر می‌رسد OA به دلایل زیادی با بیماری‌های قلبی (CVD) ارتباط داشته باشد. نخستین مورد بی‌حرکتی بدنی در این افراد است که به ضعف عضلانی منجر می‌شود (۲). همچنین مصرف داروهای استروئیدی و التهاب مزمن دلایل اصلی ابتلا به CVD در افراد مبتلا به OA است (۳، ۴). تحقیقات زیادی کوتاه شدن طول تلومرهای تک‌هسته‌ای خون محیطی و سایر بافت‌ها را با فشار خون و سایر عوامل خطر بیماری‌های قلبی در ارتباط می‌دانند (۵). تلومرها ساختارهای نوکلئوپروتئین منحصربه‌فردی در انتهای کروموزوم هستند که هدف اصلی آنها محافظت از DNA است (۶). طول تلومرها<sup>۲</sup> (TL) توسط تلومراز افزایش می‌یابد که شامل دو زیرواحد TERC و TERT است (۷). علاوه بر فعالیت آنزیمی تلومراز، عملکرد آن به عوامل دیگری از جمله پروتئین‌های شلترین که یک مجموعه اتصال‌دهنده DNA در انتهای کروموزوم‌ها هستند، بستگی دارد (۸). اجزای پروتئین‌های شلترین شامل TRF1، TRF2، TPP1، TIN2، POT1 و RAP1 است (۹). عوامل زیادی مانند از بین رفتن پروتئین‌های تلومر، فشار اکسایشی و هیپوکسی سبب کاهش TL قلبی و عملکرد آن می‌شود. از سوی دیگر، مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها، محدودیت کالری مصرفی و انجام فعالیت ورزشی می‌توانند مانع از کاهش تلومر قلبی و پیشرفت بیماری‌های قلبی شوند. TL در قلب سبب افزایش ظرفیت تکثیر و تسهیل

علوم ورزشی با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1398.076 نیز اخذ شد. پس از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای ایجاد استئوآرتریت در موش‌ها از روش مداخله مستقیم طبق پروتکل آسیس و همکاران استفاده شد. ابتدا موش‌ها با استفاده از داروی بی‌هوشی کتامین  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  و زایلازین  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  بی‌هوش شدند و پس از اصلاح موهای زانوی پای راست یک برش طولی در بخش داخلی زانو به وسیله تیغ بی‌سوری و سایر ابزارهای جراحی به طول یک سانتی‌متر ایجاد شد. پس از کنار زدن پوست، با ایجاد یک برش پارگی و ایجاد آسیب در رباط متقاطع<sup>۱</sup> (ACL) انجام گرفت. آزمون لاجمن برای اطمینان از پارگی رباط انجام گرفت (۱۹) و سرانجام ناحیه به روش استریل بخیه زده شد. موش‌های جراحی‌شده زیر دستگاه تنفس مصنوعی باقی ماندند تا طبیعی به هوش آیند. در نهایت در قفسه‌های مجزا قرار گرفتند. سپس موش‌ها، تصادفی به سه گروه بیمار (OA)، گروه بیمار و تمرین هوازی (OAE) و گروه بیمار و ازن درمانی (OAO (۵ سر در هر گروه) تقسیم شدند و معیار حضور آزمودنی‌ها در پژوهش مبتلا شدن به OA بود (۲۰). پس از گذشت یک هفته از عمل جراحی، بعد از وزن‌کشی، ازن، زیر نظر متخصص به روش کاملاً استریل برای گروه OAO تزریق شد. اکسیژن وارد دستگاه ازن‌ساز شد و با استفاده از جریان الکتریسیته به ازن تبدیل شد. ازن با غلظت  $20 \mu\text{g/ml}$ ، یک بار در هفته و به مدت ۳ هفته در خط مفصلی تییبیوفمورال تزریق شد. همچنین به‌منظور پخش شدن مناسب ازن در مفصل پس از تزریق زانو خم و صاف شد. همچنین، در گروه OAE پس از گذشت یک ماه از عمل جراحی، یک هفته صرف آشنایی و کاهش استرس موش‌ها روی نوار گردان شد. ۳ روز در هفته، به مدت ۱۰ دقیقه با

آثار فعالیت ورزشی بر تغییر پروتئین‌های وابسته به تلومر در قلب پرداخته‌اند. از میان آنها لودلوو و همکاران (۲۰۱۲)، ورنر و همکاران (۲۰۰۸) و ورنر و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند فعالیت ورزشی به افزایش بیان پروتئین‌های شلترین در قلب منجر شده است (۹، ۱۷، ۱۸). در تحقیق دیگری، لودلوو و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند انجام تمرین‌های دویدن روی نوار گردان، به حفظ طول تلومر، افزایش بیان پروتئین‌های شلترین و ترمیم آسیب‌های DNA بافت قلبی موش‌ها منجر شده است (۸). امروزه استفاده از تمرین‌های ورزشی و ازن درمانی در درمان بیماران OA پذیرفته و استفاده می‌شود. با وجود این، هنوز پاسخ و سازگاری فیزیولوژیایی احتمالی بافت قلب به روش درمان در بیماران OA بررسی نشده است. از این‌رو در این پژوهش تأثیر این دو روش بر تغییرات پروتئین‌های شلترین قلب موش‌های مبتلا به OA بررسی و به این پرسش پاسخ داده می‌شود آیا ازن درمانی یا فعالیت ورزشی هوازی بر تغییرات پروتئین‌های RAP1، TPP1، و TIN2 قلب موش‌های مبتلا به OA تأثیر دارد؟

#### مواد و روش کار

در پژوهش حاضر تعداد ۱۵ سر رت نر نژاد ویستار ۱۶ هفته‌ای با وزن ۲۵۶ تا ۳۶۶ گرم از مرکز انستیتو پاستور ایران خریداری شد. در مدت اجرای مداخله‌های درمانی و جراحی، تعداد سه سر رت در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و بسته‌های غذایی، و طبق چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری در مرکز تحقیقات هیستوژن نگهداری شدند. دمای اتاق، در محدوده ۳۰ درجه سانتی‌گراد حفظ و تلاش شد شرایط نگهداری و کار با حیوانات براساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهران انجام گیرد. برای پژوهش حاضر مجوز کمیته اخلاق پژوهشگاه

اختصاص یافت (۱۹). در این مدت، گروه OA برنامه تمرینی و تزریق نداشتند. ۴۸ ساعت پس از پایان تمرین هوازی با در نظر گرفتن موازین اخلاقی نگهداری حیوانات همگی با گاز دی‌اکسید کربن معدوم و بافت قلب موش‌ها برداشته شده و قسمتی از بطن چپ جدا شد و پس از شست‌وشو بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان سنجش مقدار پروتئین‌های TPP1، RAP1 و TIN2 در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سرعت ۱۰ متر در دقیقه و شیب صفر درصد، روی ۵ خط نوار گردان فعالیت کردند. برنامه تمرین هوازی اصلی شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی نوار گردان بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه (حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد Vo2max) در هفته‌های اول و با رعایت اصل اضافه بار به‌صورت پیش‌رونده بود و مدت تمرین به ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید (جدول ۱). همچنین، پنج دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه، پیش و پس از تمرین برای گرم و سرد کردن حیوانات

جدول ۱. برنامه تمرین هوازی

عوامل تمرینی	سازگاری	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
سرعت نوار گردان (متر/دقیقه)	۱۰	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
زمان فعالیت (دقیقه)	۱۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰

#### وسترن بلات

۳ بار شست‌وشو با محلول TBST، کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک تا دو ساعت انکوبه شد. کاغذ با استفاده از بافر TBS چندین بار شست‌وشو داده شد و در این مرحله کاغذ با محلول سوبسترا (DAB) به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد تا باند موردنظر نمایان شود. در مرحله آخر پس از نمایان شدن باندها روی کاغذ، با آب مقطر شست‌وشو شده و در معرض فیلم رادیوگرافی قرار داده شد و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد و دانسیته باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا اکتین نرمالیزه شد.

#### روش‌های آماری

به‌منظور بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون‌های شاپیرو-ویلک و برای بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس بین‌گروهی یکسویه در سطح معناداری ( $P \leq 0.05$ ) و آزمون تعقیبی توکی ویژه مقایسه درون‌گروهی انجام گرفت. تحلیل آماری به کمک نرم‌افزار

برای سنجش مقدار پروتئین‌های TIN2، RAP1 و TPP1 از روش وسترن بلات استفاده شد. برای تهیه هم‌وزنه ده درصد وزنی حجمی بافت قلب از بافر رپا (سیگما) حاوی مهارکننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش لوری اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دنانوره‌کننده آکریلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات ۱ (SDS) و دستگاه الکتروفورز (شرکت نوژن پارس، مشهد، ایران) تفکیک شدند. پس از تفکیک باندهای پروتئینی، روی غشای پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) (سیگما) منتقل شدند. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین‌های TIN2، RAP1 و TPP1 از آنتی‌بادی‌های اولیه شرکت SANTA CRUZ علیه این پروتئین‌ها استفاده شد. همچنین از آنتی‌بادی GAPDH شرکت SANTA CRUZ به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس کاغذ نیتروسولوز یک شب در آنتی‌بادی اولیه در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در روز دوم پس از

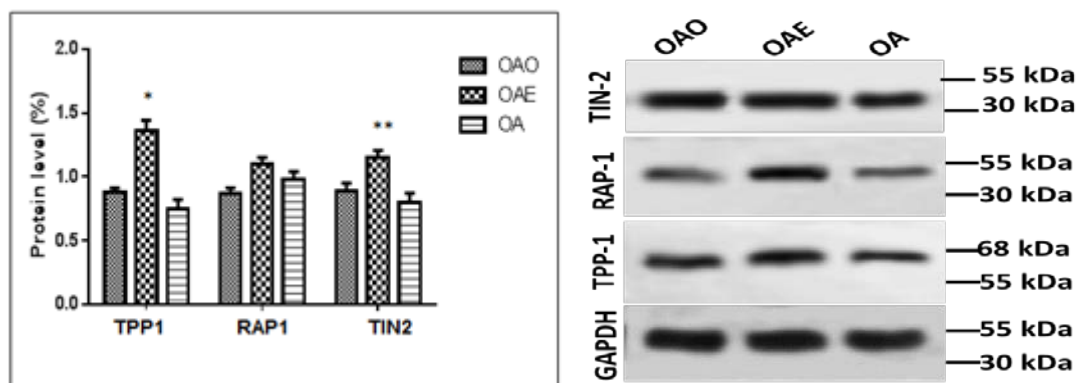
TPP1 را در مقایسه با گروه‌های OA ( $P=0/016$ ) و OAO ( $P=0/001$ ) دارد، ولی تفاوت معناداری بین دو گروه OAO و OA ( $P=0/319$ ) مشاهده نشد. در سه گروه نیز تغییرات معناداری در مقدار پروتئین RAP1 ( $P=0/051$ ) مشاهده نشد.

همچنین، افزایش مقدار پروتئین TIN2 در گروه OAE در مقایسه با گروه OA ( $P=0/029$ ) معنادار بود، اما تفاوت معناداری بین گروه OAO و OA ( $P=0/277$ ) و OAO و OAE ( $P=0/219$ ) مشاهده نشد.

SPSS-22 انجام گرفت و برای رسم نمودار از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۷ استفاده شد.

**یافته‌ها**

مقایسه میانگین مقدار پروتئین‌های RAP1، TPP1 و TIN2 قلب بین سه گروه در شکل ۱ نشان داده شده است (جدول ۲). نتایج آزمون تحلیل واریانس یکسویه در جدول ۳ ارائه شده است و نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد گروه OAE بیشترین افزایش مقدار پروتئین‌های



شکل ۱. مقدار پروتئین‌های RAP1, TPP1, TIN2 و

جدول ۲. تغییرات میانگین و انحراف استاندارد پروتئین‌های RAP1, TPP1, TIN2 و

متغیر	میانگین و انحراف استاندارد OA	میانگین و انحراف استاندارد OAO	میانگین و انحراف استاندارد OAE
پروتئین RAP1	0/873 ± 0/01	0/746 ± 0/16	1/363 ± 0/17
پروتئین TIN2	0/733 ± 0/10	0/985 ± 0/05	1/151 ± 0/12
پروتئین TPP1	0/089 ± 0/07	0/900 ± 0/07	1/58 ± 0/08

جدول ۳. نتایج آزمون ANOVA برای بررسی تغییرات بین گروهی بیان پروتئین‌های RAP1, TPP1, TIN2 و

تغییرات بین گروهی	مجموع مجذورات	میانگین مجذورات	مقدار F	سطح معناداری
پروتئین RAP1	0/0606	0/5303	23/7846	0/051
پروتئین TIN2	0/3873	0/1936	17/507	*0/000
پروتئین TPP1	0/0638	0/0319	0/0582	*0/038

\*  $P \leq 0/05$

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، تأثیر تمرین هوازی و ازن‌درمانی در زیست‌شناسی تلومر بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد فعالیت ورزشی می‌تواند موجب افزایش پروتئین‌های وابسته به طول تلومر بافت قلبی شود. TIN2 به‌عنوان چسبی پروتئین‌های اتصال‌ی تلومری تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای را به هم متصل می‌کند و از نواحی مختلفی به TRF1 و TRF2 متصل می‌شود. همچنین به‌صورت غیرمستقیم به POT1 وصل می‌شود. این اتصالات برای حفاظت از انتهای کروموزوم‌ها مهم است. از آنجا که TPP1 و TIN2 با هم تعامل دارند، ولی تا به امروز TPP1 تنها جزء شلترین است که مستقیم در به‌کارگیری تلومر از افزایش طول تلومر دخالت دارد (۲۱). در پژوهش حاضر پروتئین TPP1 در گروه OAE افزایش معناداری داشت. با وجود این تغییرات پروتئین RAP1 در بافت قلب در این مطالعه، معنادار گزارش نشد. چون پروتئین RAP1 خارج از زمینه تلومرها هم عمل می‌کند و می‌تواند در موش و انسان به جایگاه غیرتلومری اتصال پیدا کند و در سوخت‌وساز نیز نقش داشته باشد. تخریب RAP1 موش‌ها سبب کاهش بیان ژن‌های کلیدی متابولیسم مانند PGC1 $\alpha$  نیز می‌شود. در این پژوهش RAP1 در گروه OAE افزایش یافت، ولی این افزایش از لحاظ آماری معنادار نبود. درک چگونگی تنظیم طول تلومر و پروتئین‌های شلترین در یک بافت مانند قلب، که در آن طول تلومر با افزایش سن کاهش نمی‌یابد، اطلاعات تازه‌ای درباره زیست‌شناسی تلومر ارائه می‌دهد. پرسش مهمی که مدت‌هاست مطرح می‌شود و اما هنوز ناشناخته است، این است که آیا کاهش طول تلومر علت یا پیامد بیماری‌های قلبی است. در واقع، از آنجا که کاهش طول تلومر به‌شدت با افزایش سن همراه است، می‌تواند مانند بیماری قلبی خطرناک باشد (۲۲). علاوه بر پیری، استرس روانی، سیگار

کشیدن، چاقی، سبک زندگی بی‌تحرک، التهاب و فشار اکسایشی، عوامل خطر ابتلا به بیماری قلبی عروقی‌اند. جالب اینجاست که همه این عوامل با کوتاه شدن تلومر ارتباط دارند (۲۳، ۲۴).

از آنجا که پژوهشی درباره بررسی طول تلومر و پروتئین‌های شلترین قلب افراد آرتروزی موجود نیست، از این‌رو تلاش شد از مطالعات مشابه برای ورود به بحث استفاده شود. نتایج تحقیق حاضر در مورد آثار مثبت فعالیت ورزشی بر پروتئین‌های شلترین با نتایج پژوهش‌های لودو و همکاران (۲۰۱۲)، نوری منفرد و همکاران (۲۰۱۸) و توکر و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد (۲۷-۲۵). یکی از سازوکارهای احتمالی استفاده از تمرین‌های هوازی، افزایش میزان حداکثر اکسیژن مصرفی است که از راه فعال شدن آنزیم تلومر از به افزایش طول تلومر منجر می‌شود (۸، ۲۷). استلوس و همکاران (۲۰۱۸) نیز به مزیت فعالیت ورزشی هوازی نسبت به فعالیت قدرتی در افزایش سلامت قلب اشاره کردند (۲۸). ساکی و همکاران (۱۳۹۴) نیز گزارش کردند انجام ۸ هفته تمرین هوازی می‌تواند به افزایش طول تلومر و پروتئین‌های شلترین ۲۰ مرد مبتلا به آنفارتکتوس قلبی منجر شود (۹). لابی و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند اجرای ۷ روزه دوی فوق‌ماراتون، میزان بیان mRNA پروتئین‌های شلترین سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی را افزایش داد، اما تغییری در فعالیت تلومر و تلومر از ایجاد نشد. آنها مسیر پیام‌رسان MAPK را نیز مطالعه و گزارش کردند، پیام‌رسانی MAPK در میوسیت‌های قلبی با تنظیم بیان پروتئین‌های شلترین مرتبط است (۲۹). افزایش پروتئین‌های شلترین از راه واسطه‌های IGF-1، TERT و eNOS نیز صورت می‌گیرد (۵).

این یافته‌ها نشان می‌دهد فعالیت ورزشی به‌دلیل آثار مطلوب روی NO می‌تواند از راه افزایش بیان پروتئین‌های

را تحریک می‌کند و با کاهش سلول‌های ماهواره‌ای که با افزایش سن رخ می‌دهد، تعامل دارد (۳۳).

تا به امروز درمان قطعی برای OA زانو، به‌جز عمل جراحی وجود ندارد، ولی ازن‌درمانی در سه دهه گذشته به‌عنوان عامل درمانی و مکمل بالقوه برای بسیاری از اختلالات استفاده شده است (۳۴). بررسی یافته‌های پژوهش نشان داد ازن‌درمانی نیز موجب افزایش مقدار پروتئین‌های TPP1 و TIN2 قلب موش‌های OA شد، ولی این افزایش از لحاظ آماری معنادار نبود. از آنجا که OA بیماری دردناکی است که بر عملکرد تأثیر می‌گذارد، تزریق ازن سبب افزایش آنابولیسیم می‌شود و عملکرد عروق کرونری را در غضروف و استخوان بهتر می‌کند (۳۵). چند آزمایش تجربی و بالینی آثار مفید آن را در آسیب‌شناسی‌های وابسته به اکسایش و التهاب تأیید کرده‌اند (۳۶). با آنکه هنوز سازوکارهای مولکولی آن کاملاً روشن نیست، در حفره‌های بدن یا دستگاه گردش خون تزریق می‌شود (۳۵). پس از ورود ازن به داخل زانو، ابتدا سایتوکاین‌های ضدالتهابی مهار می‌شود، سپس سایتوکاین‌های مهارکننده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نئوآنژیوژنز عمل می‌کنند و با همکاری در روند ترمیم مفصل با تحریک فیبروبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و سلول‌های بنیادی بهبودی حاصل می‌شود (۳۷). از آنجا که مطالعه‌ای درباره ازن‌درمانی بر زیست‌شناسی طول تلومر و پروتئین‌های شلترین بافت قلب در بیماران OA وجود ندارد، با بررسی آثار ازن‌درمانی در بیماران قلبی، تغییرات طول تلومر و پروتئین‌های وابسته بررسی می‌شود. بیولکلا و همکاران (۲۰۱۷) به آثار مثبت ازن‌درمانی در افزایش عملکرد دستگاه آنتی‌اکسیداتیو در ۴۰ بیمار قلبی که دچار کاهش کسر تزریقی نیز بودند، اشاره کردند (۳۵). در

تلومری سبب کاهش نکروز در انواع بافت و در نتیجه فعال کردن مسیرهای بقا سلول شود (۲۹).

نتایج پژوهش حاضر با نتایج لودلو و همکاران (۲۰۱۲) و دوکاروال هو و همکاران (۲۰۱۸) همخوانی ندارد (۸، ۲۸، ۳۰). میزان بیان کمپلکس شلترین برای حفظ هموستاز طول تلومر و جلوگیری از پیام‌رسانی آسیب به DNA در تلومر بسیار مهم است. لودلو و همکاران نشان دادند انجام تمرین‌های کوتاه‌مدت به کاهش بیان پروتئین‌های شلترین در سطح mRNA منجر می‌شود. با افزایش فشار تمرین، کمپلکس شلترین عضله قلبی مجدد تنظیم می‌شود و با تمرین بلندمدت قادر به حفظ مقدار کمپلکس شلترین در سطح mRNA می‌شود (۸). دوکاروال هو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند انجام ۱۲ هفته تمرین شنای فراتر از آستانه لاکتات به کاهش بیان کمپلکس شلترین منجر شد، ولی تغییری در طول تلومر و بیان mTERT<sup>۱</sup> مشاهده نشد (۳۰). این یافته‌های ناهمسو ممکن است به نوع آزمودنی‌ها یا اندازه نمونه‌ها، روش‌های استخراج DNA یا شدت و مدت زمان تمرین مربوط باشد (۲۷). از آنجا که این تمرینات با شدت زیاد انجام شده، به سرکوب بیان ژن پروتئین‌های متصل به تلومر منجر شده است (۲۹). از آنجا که فعالیت ورزشی به کاهش مقادیر نشانگرهای التهابی در افراد بیمار کمک می‌کند (۳۱)، می‌تواند عامل نکروز تومور آلفا (TNF- $\alpha$ )، اینترلوکین ۶ (IL-6)، فاکتور هسته‌ای کاپا B، پروتئین فعال‌کننده سرکوبگر ۱ را کاهش دهد (۳۲). همچنین فعالیت ورزشی ممکن است فشار اکسایشی را کاهش دهد و تلومرها را از کوتاه شدن ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محافظت کند. علاوه بر این، مقدار سلول‌های ماهواره‌ای به نوبه خود با طول تلومر عضله ارتباط مستقیم دارند و فعالیت ورزشی پیش‌سازهای سلول عضلات

1. mTERT: Mouse Transcriptase Reverse Telomerase

### نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد، تمرین‌های هوازی می‌تواند به‌عنوان درمان جانبی در کنار سایر روش‌های درمانی، در افزایش میزان RNA پروتئین‌های TPP1، RAP1 و TIN2 بافت قلب موش‌های مبتلا به OA مؤثر باشند، ولی در مورد تأثیرات ازن‌درمانی در زانو بر تغییرات طول تلومر قلبی نیاز به تحقیقات بیشتر است.

### تشکر و قدردانی

از استادان و همکارانی که در اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

پژوهش دیگری فیلیپو و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند، ترکیبی از تمرین طولانی‌مدت خیلی شدید و ازن‌درمانی به افزایش حجم سیستولی، دیاستولی و شاخص عملکرد میوکارد منجر می‌شود که تأییدکننده نقش مهم ازن در محافظت قلبی است. ازن‌درمانی در جریان خون احتمالاً با فعال کردن دستگاه آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت درمانی زیادی برای بهتر کردن نارسایی قلبی دارد (۳۶). فیلیپو و همکاران از سال ۲۰۱۵ به جنبه جدیدی از ازن‌درمانی در برابر خستگی اشاره کردند که ازن، به افزایش میزان دویدن موش‌ها و کاهش خستگی کمک کرد (۳۸). برخی پژوهش‌ها ارتباط بین کاهش طول تلومر و افزایش بیماری قلبی و مرگ‌ومیر را گزارش کرده‌اند (۳۹،۴۰). آنها اذعان داشتند به ازای کاهش هر جفت کیلو باز از طول تلومر، سه برابر احتمال افزایش خطر سکته قلبی و سکته مغزی وجود دارد (۴۱). چانگ و همکاران (۲۰۱۸) نیز در پژوهشی نشان دادند کاهش طول تلومر از نشانه‌های بارز بیماران قلبی است (۴۲). از این‌رو با توجه به تحت تأثیر قرار گرفتن طول تلومرهای قلب با سلامت قلب و عروق (۵) و نتایج مثبت ازن‌درمانی در بهتر شدن بیماری‌های قلبی (۳۵، ۳۸)، علت معنادار نبودن افزایش پروتئین‌های شلترین در قلب گروه OAO، ممکن است ناشی از محل تزریق ازن باشد. شاید تزریق از راه وریدی نتیجه بهتری داشته باشد. غلظت‌های بیشتر ازن (بیشتر از 80µg) و افزایش تعداد جلسات درمان نیز مؤثر است (۴۳). با این حال، به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌ها، نداشتن پیشینه مرتبط، عدم پیگیری عوارض بلندمدت پس از درمان و توجه به تفاوت طول تلومر موش‌ها نسبت به انسان (۴۴) و نیز ناشناخته بودن سازوکارهای مولکولی و سلولی اثر ازن‌درمانی و فعالیت ورزشی بر پروتئین‌های شلترین پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با انتخاب نوع درمان و تأثیر آن بر عملکرد قلبی در بیماران OA انجام گیرد.



## منابع و مأخذ

1. AlKuwaity, K.W., et al., Prevalence and Determinant Factors of Osteoarthritis of the Knee Joint among Elderly in Arar, KSA. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* (July 2018), 2018. 72(9): p. 5173-5177.
2. Rahman, M.M., et al., The relationship between osteoarthritis and cardiovascular disease in a population health survey: a cross-sectional study. *BMJ open*, 2013. 3(5): p. e002624.
3. Singh, G., et al., Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *The American journal of managed care*, 2002. 8(15 Suppl): p. S383-91.
4. Ong, K.L., et al., Arthritis: its prevalence, risk factors, and association with cardiovascular diseases in the United States, 1999 to 2008. *Annals of epidemiology*, 2013. 23(2): p. 80-86.
5. Ludlow, A.T. and S.M. Roth, Physical activity and telomere biology: exploring the link with aging-related disease prevention. *Journal of aging research*, 2011. 2011.
6. Laberthonnière, C., F. Magdinier, and J.D. Robin, Bring It to an End: Does Telomeres Size Matter? *Cells*, 2019. 8(1): p. 30.
7. Shay, J.W. and W.E. Wright, Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS letters*, 2010. 584(17): p. 3819-3825.
8. Ludlow, A.T., et al., Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. *Experimental physiology*, 2017. 102(4): p. 397-410.
9. Saki, B., et al., The effect of rehabilitation training on TRF1 and TRF2 in myocardial infarction patients. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*, 2016. 3(1): p. 39-44.
10. Kuszel, L., et al., Osteoarthritis and telomere shortening. *Journal of applied genetics*, 2015. 56(2): p. 169-176.
11. Poitras, S., et al., A critical appraisal of guidelines for the management of knee osteoarthritis using Appraisal of Guidelines Research and Evaluation criteria. *Arthritis research & therapy*, 2007. 9(6): p. R126.
12. de Jesus, C.C.L., et al., 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): p. e0179185.
13. Fernandez-Cuadros, M.E., et al., Mid-Term Effectiveness of Ozone (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) Compared to Platelet-Rich Plasma (PRP) in the Management of Knee Osteoarthritis: A Randomized Parallel Controlled Trial. 2019.
14. Hossein Mirkarimpour, S., et al., The Effect of 4-week Swimming Training on Rat's Knee Osteoarthritis induced by Monosodium Iodoacetate. *Razi Journal of Medical Sciences*, 2013. 19(104).
15. AKBARI, B.H., A.A. RAVASI, and M.R. AKBARI, The effect of a endurance training period with cellular Anti-Aging purpose on telomerase enzyme content in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in pats. 2017.

16. Norouzi Kamareh, M., Zolfaghari, M., Ghaderi Pakdel, F., Tolouei Azar, J. Effect of 12 weeks aerobic training and oral green tea extract on cardiac caspase-3 expression in aged male rats. *Journal of Sport Biosciences*, 2018; 10(2): 221-235. doi: 10.22059/jsb.2018.245693.1220
17. Werner, C., et al., Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. 52(6): p. 470-482.
18. Werner, C., et al., CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation*, 2009. 120(24): p. 2438-2447.
19. Assis, L., et al., Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis and cartilage*, 2016. 24(1): p. 169-177.
20. Shyu, K.-G., et al., Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *European journal of clinical investigation*, 2006. 36(10): p. 713-719.
21. Chamani, A., et al., The effects of six-week small-sided soccer games on telomere length and TRF2 gene expression in the middle-age males. *Razi Journal of Medical Sciences*, 2019. 25(12): p. 8-16.
22. Martínez, P. and M.A. Blasco, Heart-breaking telomeres. *Circulation Research*, 2018. 123(7): p. 787-802.
23. Blackburn, E.H., E.S. Epel, and J. Lin, Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 2015. 350(6265): p. 1193-1198.
24. Starkweather, A.R., et al., An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nursing research*, 2014. 63(1): p. 36.
25. Ludlow, A.T., et al., Exercise alters mRNA expression of telomere-repeat binding factor 1 in skeletal muscle via p38 MAPK. *Journal of applied physiology*, 2012. 113(11): p. 1737-1746.
26. Noorimofrad, S., The effect of high intensity interval training on telomere length and telomerase activity in non-athlete young men. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*, 2018. 5(2): p. 1-7.
27. Tucker, L.A., Physical activity and telomere length in US men and women: An NHANES investigation. *Preventive medicine*, 2017. 100: p. 145-151.
28. Stellos, K. and I. Spyridopoulos, Exercise, telomerase activity, and cardiovascular disease prevention. *European heart journal*, 2019.
29. Laye, M.J., et al., Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. *Journal of applied physiology*, 2011. 112(5): p. 773-781.
30. de Carvalho Cunha, V.N., et al., Training Performed Above Lactate Threshold Decreases p53 and Shelterin Expression in Mice. *International journal of sports medicine*, 2018. 39(09): p. 704-711.

31. Nimmo, M., et al., The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, (2013); 15: P:51-60.
32. Zhang, J., et al., Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing research reviews*, 2016. 25: p. 55-69.
33. Gronek, P., et al., A Review of Exercise as Medicine in Cardiovascular Disease: Pathology and Mechanism. *Aging and disease*, 2020: p. 0.
34. Torossian, A., et al., Pre-treatment with ozonized oxygen (O<sub>3</sub>) aggravates inflammation in septic rats. *Inflammation Research*, 2004. 53(2): p. S122-S125.
35. Buyuklu, M., et al., Beneficial effects of ozone therapy on oxidative stress, cardiac functions and clinical findings in patients with heart failure reduced ejection fraction. *Cardiovascular toxicology*, 2017. 17(4): p. 426-433.
36. Di Filippo, C., et al., Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. *Inflammation Research*, 2008. 57(10): p. 445-449.
37. Seyam, O., et al., Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Medical gas research*, 2018. 8(3): p. 103.
38. Di Filippo, C., et al., Daily oxygen/O<sub>3</sub> treatment reduces muscular fatigue and improves cardiac performance in rats subjected to prolonged high intensity physical exercise. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. 2015.
39. D'Mello, M.J., et al., Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circulation: cardiovascular genetics*, 2015. 8(1): p. 82-90.
40. Burnett-Hartman, A.N., et al., Telomere-associated polymorphisms correlate with cardiovascular disease mortality in Caucasian women: the Cardiovascular Health Study. *Mechanisms of ageing and development*, 2012. 133(5): p. 275-281.
41. Fitzpatrick, A.L., et al., Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *American journal of epidemiology*, 2006. 165(1): p. 14-21.
42. Chang, A.C., et al., Telomere shortening is a hallmark of genetic cardiomyopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. 115(37): p. 9276-9281.
43. Smith, A.J., et al., Ozone Therapy: a critical physiological and diverse clinical evaluation with regard to immune modulation, anti-infectious properties, anti-cancer potential, and impact on anti-oxidant enzymes. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, 2015;30(5);P:37
44. Muñoz-Lorente, M.A., A.C. Cano-Martin, and M.A. Blasco, Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nature communications*, 2019. 10(1): p. 1-14.

## Comparing The Effect of Moderate-intensity Aerobic Training and Ozone Therapy on Shelterin Expression Proteins in Heart Osteoarthritis Rats

Gholam Reza Karimi<sup>1</sup>- Abbas Ali Gaeini<sup>2</sup>- Reza Nouri<sup>\*3</sup>- Azadeh Gilani<sup>4</sup>

1,4.Ph.D, Department of Exercise Physiology, Kish International Campus, University of Tehran, Kish, Iran 2. Professor of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, University of Tehran, Iran 3. Assistant Professor of Exercise Physiology, Kish International Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received:2020/1/23;Accepted:2020/8/5)

### Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common disease of joints caused by degradation of articular cartilage and subchondral bone. It is unknown whether different therapy exert differential cellular effects. On the other hand, Since OA may be associated with CVD and decrease Telomeres length. Telomeres protect chromosome ends and Integral for the maintenance of telomeres is the protein complex Shelterin. In this study, the effects of ozone (O<sub>3</sub>) and aerobic training were considered on Shelterin expression proteins in heart rats with knee OA. In this experimental study, knee OA was induced by surgical method in rats. Fifteen male Wistar rats were randomly divided into three groups: knee OA control group (OA); OA plus exercise group (OAE) and OA plus O<sub>3</sub> group (OAO). The aerobic training (treadmill; 16 m/min;50 min/day) started 4 weeks after the surgery, 3 days/week for 8 weeks. Rats in the OAO group received O<sub>3</sub> at the concentration of 20µg/ml, once weekly for 3 weeks. 48 hours after the programs, cartilage and heart tissues were isolated and expression of RAP1, TIN2 and TPP1 were considered using Western Blot. In OAE significantly increased the expression of RAP1 compared to the OA and OAO groups. But there is no difference between OA and OAO groups. In OAE group had significantly higher expression of TIN2 compared to the OAO and OAE, and no difference between OAE and OAO groups. Also, there was no significant difference in the expression of TPP1 and between three groups. Aerobic Exercise improved cardiac Shelterin proteins expression in OA rats, rather than the Ozone therapy groups.

### Keywords

Aerobic exercise, Osteoarthritis, Ozone, RAP1, TIN2, TPP1

\* corresponding author: Email: nuri\_r7@ut.ac.ir ; Tel:+987644430055