



Kharazmi University

## Research in Sport Medicine and Technology

Print ISSN: 2252 - 0708 Online ISSN: 2588 - 3925

Homepage: <https://jsmt.khu.ac.ir>



# The effect of aquatic activity and alogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells fortified with Platelet-Rich Plasma in treatment of Achilles tendon in rat

HomaSheikhani Shahin<sup>1</sup> | Davood Mehrabani<sup>2</sup> | Seifollah Dehghani Nazhvani<sup>3</sup> | Hamid Rajabi<sup>4</sup> Manijeh Norouzian<sup>5</sup>

1. Assistant Professor, Physical Education, Physical Education & Sport Sciences, Shiraz Zand Institute of Higher Education, Iran
2. Associate Professor, Pathology, Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Iran
3. Associate Professor, Veterinary Surgery, Shiraz University of Veterinary Medicine, Iran
4. Associate Professor, Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmei University, Iran
5. Assistant Professor, Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmei University, Iran

Corresponding author HomaSheikhani Shahin: [hsheikhani@yahoo.com](mailto:hsheikhani@yahoo.com)



CrossMark

## ARTICLE INFO

### Article type:

Research Article

### Article history:

Received: 2021/06/15

Revised: 2021/11/07

Accepted: 2022/02/17

### Keywords:

Aquatic activity, platelet-rich plasma, mesenchymal stem cells, tendon healing

### How to Cite:

Sheikhani Shahin., H, Mehrabani., D, Dehghani Nazhvani., S, Rajabi., H, Norouzian., M. The effect of aquatic activity and alogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells fortified with Platelet-Rich Plasma in treatment of Achilles tendon in rat. Research in Sport Medicine and Technology, 2022; 12(23): 25-40.

## Abstract

The aim of this study was to the effect of aquatic activity and alogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells fortified with Platelet-Rich Plasma in treatment of Achilles tendon in rat. 74 Sprague-Dawley rats were selected and tendon injury was formed in 69 of them. Subsequently, these rats were randomly divided into 8 groups and 5 rats which were without any injuries were chosen as the control group. 72 hours after the surgery, isolated cells from bone marrow and PRP were injected to the groups via catheters. The experimental groups had aquatic activity for 8 weeks. At the end of the eighth week, the Achilles tendon was separated and H&E and Mason Trichrome were used for special staining to assess the tendon healing. The results show there is a significant difference between the studied groups on the Achilles tendon healing. Also, results from histopathological examination indicated that there is a significant difference between the studied groups on the number of fibroblasts, collagen deposition, cellularity and tendon diameter. It could be generally concluded that, using these treatment methods could help with the tendon healing through bounding with target cells membrane receptors such as fibroblasts, mesenchymal stem cells and endothelial, which leads to activation of a series of intracellular proteins and as a result of their activities some reactions happen that lead into formation of matrix and collagen synthesis.



Published by Kharazmi University, Tehran, Iran. Copyright(c) The author(s) This is an open access article under the: CC BY-NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) DOI: 10.29252/jsmt.12.1.25.

<https://jsmt.khu.ac.ir/>



## پژوهش در طب ورزشی و فناوری

شاپا چاپی: ۰۷۰۸-۲۲۵۲ شاپا الکترونیکی: ۳۹۲۵-۲۵۸۸

Homepage: <https://jsmt.khu.ac.ir>



### اثر فعالیت در آب و تزریق آلوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به همراه پلاسمای غنی از پلاکت در ترمیم تاندون آشیل موش های صحرایی (PRP)

هما شیخانی شاهین<sup>۱\*</sup> | داوود مهربانی<sup>۲</sup> | سیف اله دهقانی نازوانی<sup>۳</sup> | حمید رجبی<sup>۴</sup> | منیژه نوروزیان<sup>۵</sup>

۱- استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، مؤسسه آموزش عالی غیر انتفاعی زند شیراز

۲- دانشیار پاتولوژی، مرکز پژوهشات ترانژنیک و سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳- استاد جراحی دامپزشکی، بخش جراحی دامپزشکی، دانشگاه دامپزشکی شیراز

۴- دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی

۵- استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی

نویسنده مسئول: هما شیخانی شاهین [hsheikhani@yahoo.com](mailto:hsheikhani@yahoo.com)

#### اطلاعات مقاله:

##### نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۸/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸

#### واژه های کلیدی:

فعالیت در آب، پلاسمای غنی از پلاکت ها، سلول های بنیادی مزانشیمی، ترمیم تاندون

#### ارجاع:

هما شیخانی شاهین، داوود مهربانی، سیف اله دهقانی نازوانی، حمید رجبی، منیژه نوروزیان. اثر فعالیت در آب و تزریق آلوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به همراه پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) در ترمیم تاندون آشیل موش های صحرایی.

۱۲ (۲۳): ۴۰-۲۵

#### چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر فعالیت در آب و تزریق آلوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به همراه پلاسمای غنی از پلاکت ها (PRP) در ترمیم تاندون آشیل موش های صحرایی است. ۷۴ سر موش صحرایی از نژاد اسپراگوداولی انتخاب و در ۶۹ سر از آنها آسیب تاندونی ایجاد شد. موش های صحرایی به طور تصادفی به هشت گروه مختلف تقسیم بندی شدند. ۵ سر باقیمانده که آسیبی در آنها ایجاد نشده بود به عنوان کنترل سالم در نظر گرفته شد. ۷۲ ساعت پس از جراحی، به گروه ها سلول های جداسازی شده از مغز استخوان و پلاسمای غنی از پلاکت از طریق کتر تزریق شد. گروه های تجربی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه فعالیت در آب را انجام دادند. در پایان هفته هشتم تاندون آشیل جدا و برای ارزیابی میزان ترمیم تاندونی از رنگ آمیزی اختصاصی شامل Mason Trichrome و H&E استفاده شد. نتایج نشان داد که از لحاظ میزان ترمیم تاندون آشیل تفاوت معناداری در بین گروه های مورد مطالعه وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از بررسی های هیستوپاتولوژیک تفاوت معنی داری از لحاظ تعداد فیبروبلاست ها، رسوب رشت های کلاژن، میزان دانسیته سلولی و قطر تاندونی در گروه های مورد مطالعه را نشان داد. به کارگیری این روش های درمانی به واسطه باند شدن با گیرنده های غشای سلول های هدف مانند فیبروبلاست ها، سلول های بنیادی مزانشیمی و اندوتلیال منجر به فعال شدن یک سری پروتئین های داخل سلولی می گردند که در نتیجه فعالیت آنها واکنش هایی اتفاق می افتد که باعث شکل گیری ماتریکس و سنتز کلاژن می گردد که به ترمیم تاندون کمک می کند.

معمولا روش درمانی متداولی که برای پارگی ناقص یا کامل وتر آشیل به عنوان یکی از شایع ترین آسیب های تاندونی در اثر ورزش توصیه می گردد، عمل جراحی می باشد، که این مسئله باعث ایجاد مشکلات بالینی متعددی شده است (۱). مطالعات کلینیکی در چند دهه اخیر نشان داده است که عوامل بیولوژیکی در سرعت ترمیم تاندونی مؤثر می باشند و این عوامل نقش بالقوه ای را در ترمیم تاندون آسیب دیده دارند (۲). از سوی دیگر در حال حاضر این مسئله که آیا تحرک و فعالیت بدنی در مقایسه با عدم تحرک بعد از عمل جراحی باعث سرعت بخشیدن در بازیابی ویژگی های بیومکانیکی تاندون و تغییرات اساسی در روند ترمیم می گردد، چالش برانگیز است (۲). هر چند بسیاری از مطالعات نشان داده است که تمرین و فعالیت بدنی به عنوان یک عامل مؤثر در افزایش قدرت ندونی به شمار می آید (۳)، اما مکانیسم های مولکولی تاثیرگذار در بازسازی تاندون به طور دقیق ناشناخته باقی مانده است. اخیرا دانشمندان و متخصصان بالینی برخی مکانیزم های سلولی و مولکولی درگیر در توسعه تاندون، هومئوستاز، تولید مجدد و بازسازی تاندون ها را تا حدی شناخته اند (۱) و بیان نموده اند که فاکتورهای موضعی مانند پروستاگلاندین ها و سایتوکین ها در مراحل تغییرپذیری کلاژن ها درگیر می باشند که تمرینات طولانی مدت می تواند به عنوان یک راه کار مناسب در جهت تغییرپذیری کلاژن ها در تاندون و لیگامنت ها به شمار آید، زیرا تجمع کلاژن نوع I در تاندون آشیل در روزهای اولیه بعد از تمریناتی که با اعمال بار مکانیکی بر تاندون همراه است افزایش می یابد (۲). در حال حاضر پژوهشگران در یک رویکرد جدید نیز به سلول های جداسازی شده از تاندون ها اشاره می کنند که نقش بسیار مهمی را در توسعه روش های احیاءکننده به منظور ترمیم تاندون دارد. آنان پس از بررسی ویژگی این سلولها متوجه شده اند که این سلولها به سختی از سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSC) به دست آمده از مغز استخوان انسان قابل تشخیص هستند (۴) بنابراین بیان کردند که MSC کاربرد قابل توجهی را در فرآیندهای بالینی از جمله ترمیم تاندون ها دارد (۵،۶).

MSC سلول های فیرو بلاست چندقابلیتی می باشند (۷،۸) که می توان آنها را از انواع مختلف بافت ها شامل مغز استخوان، بافت چربی، ACL و بافت تاندونی جدا کرد (۹). این سلولها توانایی ترشح انواع مختلفی از فاکتورهای رشد اتوکراین و پاتوکراین را دارند و باعث احیای MSC، افزایش بقای سلولی و تکثیر سلولی می گردند (۱۰،۱۱). همچنین سلول های مزانشیمی می توانند فاکتورهای بیواکتیوی را ترشح کنند که آنها را به تنظیم عملکرد دیگر انواع سلولها قادر می سازد. بنابراین سلول های MSC دارای پتانسیل بالایی جهت کاهش فیبروز، ترمیم زخم و بافت های آسیب دیده می باشد (۷،۱۲). در همین زمینه چانگ (۲۰۰۷) نشان داد که درمان آسیب تاندون آشیل خرگوش با سلول های بنیادی مزانشیمی می تواند پارامترهای بیولوژیکی و مکانیکی را در مرحله اولیه ترمیم تاندون بهبود بخشد (۱۳). در این راستا پژوهشگران نیز بیان نمودند که سلول های بنیادی مزانشیمی که در تشکیل فیبرهای عضلانی و رشد عروقی شرکت می کنند، می توانند در نتیجه فعالیت ورزشی افزایش یابند (۱۴). بنابراین می توان گفت که هدف از سلول درمانی، استفاده از یک روش مناسب است که شامل ترکیبی از فعالیت های مختلف با هدف جایگزینی، ترمیم و تقویت عملکرد نوع

سلولی، تقویت بافت‌ها و ارگان‌ها با شدت مختلف به صورت سلول‌های اتولوگ (مشتق از خود) می‌باشد (۱۵). از سوی دیگر باید اذعان داشت که فرآیند ترمیم تاندون و رباط‌ها دارای الگوهای مشابهی با فرآیندهای ترمیمی سایر بافت‌ها می‌باشد که باعث شکل‌گیری لخته در اطراف ناحیه آسیب دیده می‌گردد. لخته‌های خون در برگیرنده سلول‌ها و پلاکت‌ها می‌باشند (۱۶). پلاکت‌ها نیز حاوی موادی هستند که عامل اصلی در فرایند ترمیم و بازسازی بافت‌ها محسوب می‌شوند و به آنها عوامل رشد گفته می‌شود. هنگامی که این مواد آزاد می‌شوند سبب رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های مختلف می‌شوند که نتیجه‌ی این امر افزایش کلاژن، الاستین، ماده‌ی بین سلولی، عروق و در نهایت ضخیم شدن و ترمیم شدن بافت‌ها است (۱۷). در این راستا مطالعات متعددی نشان داده است که محرک‌های گوناگونی از جمله فعالیت جسمانی باعث تغییر در محتوی و عملکرد پلاکت‌ها می‌گردد که این پاسخ پلاکت‌ها به فعالیت ورزشی به عوامل مختلفی مانند نوع و شدت تمرین و نیز آمادگی بدنی بستگی دارد (۱۷).

بدین ترتیب با توجه به پیچیدگی فرآیند ترمیم که مولکول‌های بسیاری در این زمینه درگیر می‌باشند، فاکتورهای رشد نقش مرکزی را در این زمینه ایفا می‌کنند که افزایش هماهنگ تمام این عوامل رشد پس از فعالیت‌های جسمانی یک محرک برای افزایش قابلیت تولید آنها لحاظ می‌گردند. به علاوه اخیراً نیز نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترشح فاکتورهای رشد به وضوح آشکار شده است و از نظر بعضی از پژوهشگران استفاده از این فاکتورها باعث فرآیند یکپارچه سازی و پیوستگی در بافت پیوندی می‌شود. همچنین با توجه به نقشی که تمرینات ورزشی در آماده سازی سلول‌های بنیادی برای پیوند آنها دارد، به نظر می‌رسد مشارکت سه گانه فعالیت بدنی، سلول‌های بنیادی و پلاسمای غنی از پلاکت‌ها بتواند در تسریع ترمیم تاندون عمل کند ولی مطالعات اندکی بر روی پتانسیل واقعی این سلول‌ها همراه با پلاسمای غنی از پلاکت‌ها و فعالیت جسمانی صورت گرفته است و اطلاعات کافی در این زمینه موجود نیست. در پژوهش حاضر پژوهشگر با طرح این سؤال که آیا فعالیت بدنی و تزریق آلوژنیک سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به همراه تزریق پلاسمای غنی از پلاکت‌ها می‌تواند در ترمیم تاندون آشیل مؤثر باشند به بررسی آن پرداخت.

## روش شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از نوع توسعه‌ای و روش آن بالینی با طرح تجربی می‌باشد که جامعه آماری آن را ۷۴ سر موش صحرایی از نژاد اسپراگوداولی (با سن ۳ ماه و میانگین وزن  $20 \pm 200$  گرم) که در شرایط استاندارد آزمایشگاهی به صورت گروه‌های ۳ تایی در قفس‌های پلی کربنات شفاف به ابعاد  $18 \times 54$  و ارتفاع ۱۸ سانتیمتر و در محیطی با دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت  $50 \pm 5$  در صد نگهداری می‌شدند و دسترسی آنها به آب و غذا آزاد بود، انتخاب شدند و در ۶۹ سر از آنها آسیب تاندونی ایجاد گردید. موش‌های صحرایی به طور تصادفی به گروه‌های (۱) فعالیت در آب (AA)، (۲) تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، (۳) تزریق

1. Aquatic Activity(AA)

2. Mesenchymal Stem Cell(MSC)

پلاسمای غنی از پلاکت<sup>۱</sup> (PRP)، ۴) فعالیت در آب به همراه تزریق سلولهای بنیادی مزانشیمی (AA+MSC)، ۵) فعالیت در آب به همراه تزریق پلاسمای غنی از پلاکت (AA+PRP)، ۶) فعالیت در آب به همراه تزریق سلولهای بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت (MSC+PRP+AA)، ۷) تزریق سلولهای بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت (MSC+PRP) و ۸) کنترل آسیب<sup>۲</sup> (CI) تقسیم‌بندی شدند. ۵ سر از موش‌های صحرایی سالم که هیچ گونه آسیبی در آنها ایجاد نشده بود به عنوان گروه کنترل سالم<sup>۳</sup> (CO) قرار داده شدند. ۷۲ ساعت پس از جراحی، براساس تقسیم‌بندی ذکر شده به گروه‌ها سلول‌های جداسازی شده از مغز استخوان (۱ میلیون سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت فاقد FBS) و پلاسمای غنی از پلاکت (به میزان ۱ میلی لیتر) از طریق کنترا تزریق گردید. سپس یک هفته بعد از ترمیم محل بخیه‌ها، گروه‌های AA (۱)، AA+MSC (۲)، AA+PRP (۳) و MSC+PRP+A (۴) به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه فعالیت در آب را انجام دادند. در پایان هفته هشتم موش‌های صحرایی نیز به روش اخلاقی کشته شدند و با جدا کردن تاندون آشیل و قرار دادن آنها در فرمالین ۱۰ درصد، نمونه‌ها به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شدند. در آزمایشگاه پاتولوژی از نمونه‌های ارسالی مقطع طولی تهیه شد و برای ارزیابی میزان ترمیم تاندونی از رنگ‌آمیزی اختصاصی شامل Mason Trichrome و H&E استفاده شد. در آزمایشگاه نیز فاکتورهای ترمیمی مانند تعداد فیبروبلاست<sup>۴</sup> در 400High power field (HPF)، ر سوب رشته‌های کلاژن<sup>۵</sup> و میزان دانسیته سلولی<sup>۶</sup> برای بررسی روند ترمیم و امتیاز بندی آنها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که پاتولوژیست نمونه‌ها را به صورت چشمی (Blind) مشاهده کرده و از گروه‌های مورد بررسی اطلاعی نداشت. به علاوه قطر تاندون‌ها با استفاده از نرم افزار Dino Capture و میکروسکوپ Optika با دوربین Dino Eye نیز اندازه‌گیری گردید. از سوی دیگر برای اندازه‌گیری TGF-B به میزان ۵ سی‌سی خون از قلب موش‌های صحرایی گرفته شد و به وسیله کیت الایزا میزان TGF-B اندازه‌گیری شد.

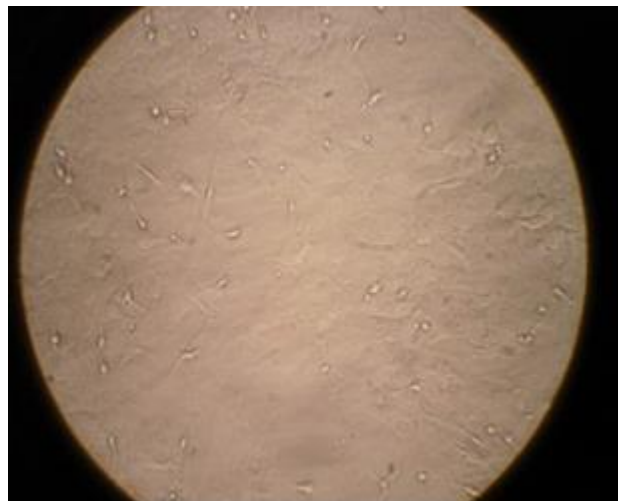
**روش جداسازی و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی:** در ابتدا ۲ سر موش صحرایی از نژاد اسپراگوداولی پس از آرام‌کشی با گاز CO<sub>2</sub>، به روی سینی منتقل شد. پس از الک پاشی پاها و محوطه شکمی و تمیز کردن پوست، بافت و عضلات اطراف ران و درشت‌نی، به آرامی استخوان‌های ران و درشت‌نی جدا شد. دو انتهای استخوان از محل اپی‌فیز به کمک بن‌کاتر قطع شد. سرنگی را که حاوی محیط کشت DMEM&PEN/STREP بدون FBS است پر کرده و با قرار دادن استخوان در بالای فالكون، به کمک پنس استخوان شست‌شو داده شد به گونه‌ای که محتویات استخوان به درون فالكون تخلیه گردد. محتویات فالكون با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، محیط رویی دور ریخته

1. Platelet Rich Plasma (PRP)
2. Control Injury (CI)
3. Control Intact (CO)
۴. Fibroblast
۵. Collagen Deposition
۶. Cellularity

شد و ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه به رسوب حاصل در فالكون اضافه گردید و با پیتاژ محتویات درون فالكون یک سوپانسیون سلولی ایجاد شد. با انتقال سوپانسیون سلولی به داخل فلاسک، ۵ میلی لیتر محیط کشت تازه به داخل فلاسک اضافه گردید. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به صورت شفاف و کروی شکل مشاهده شدند. سلول‌ها به داخل انکوباتور (CO<sub>2</sub> ۵٪، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪) انتقال داده شدند. محیط کشت در روز بعد و سپس هر سه روز یکبار تعویض شده تا سلول‌های غیر مزانشیمی از محیط خارج و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تقریباً خالص با تراکم ۸۰٪-۷۰٪ باقی بمانند. در این مرحله سلول‌ها از حالت کروی به دوکی تغییر شکل می‌دهند (شکل الف و ب).



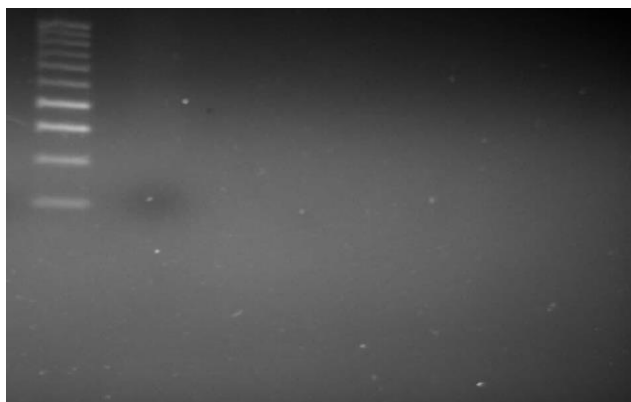
شکل ب: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان در پاساژ یک با بزرگنمایی ۲۰× (p<sub>1</sub>).



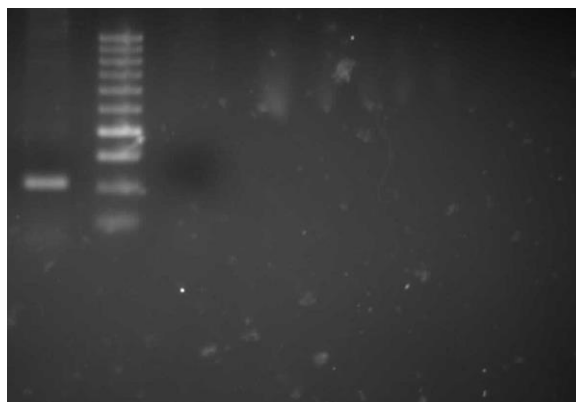
شکل الف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان در پاساژ صفر با بزرگنمایی ۲۰× (p<sub>0</sub>).

برای تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی از روش RT-PCR نیز استفاده شد. برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، با استفاده از تکنیک RT-PCR و مارکر سطحی CD73 که یکی از مارکرهای اختصاصی سطحی شناخته شده سلول‌های مزانشیمی می‌باشد، تایید گردید. هم‌چنین با استفاده از این تکنیک عدم حضور مارکر CD45 که از مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک (خونساز) می‌باشد اثبات شد (شکل الف و ب). برای شمارش سلول‌ها نیز فلاسک حاوی سلول با PBS شست و شو و به هر فلاسک ۱ ml ۳ آنزیم تریپسین (Bio idea group) اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور انکوبه شد. محتویات فلاسک سلولی به فالكون منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ (SIGMA 2-16PK) ۱۵۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ فاز مایع درون فالكون دور ریخته شد. رسوب سلولی به دست آمده با ۱ ml محیط کشت جدید مخلوط شد و ۷ لانداز سوپانسیون سلولی روی لام هموسیتومتر با ۷ لانداز رنگ تریپان بلو مخلوط شد، لامل بر روی مخلوط سلول قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ نوری، با بزرگنمایی ۱۰، ۴ خانه ۱۶ تایی در هر چهار طرف شمارش گردید. در نهایت با توجه به فرمول زیر تعداد سلول‌ها محاسبه شد.

تعداد سلول در ۱ میلی لیتر =  $10^4 \times 2$  میانگین تعداد سلول های شمارش شده در ۴ خانه



شکل ۲ب: حضور CD۴۵ با اندازه ۴۵۰BP



شکل ۲الف: حضور CD۳۳ با اندازه ۲۰۸BP

**تهیه پلاسمای غنی از پلاکت:** برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، در ابتدا ۳ موش صحرایی از نژاد اسپراگوداولی انتخاب شدند. سپس آنها بیهوش شده و ۵ میلی لیتر خون از قلب حیوان گرفته شد و سریعاً به لوله های حاوی ماده ضد انعقاد سیترات دکستروز منتقل گردید. نمونه خون با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، سانتریفیوژ گردید تا برا اساس جرم حجمی اجزاء خون، سه لایه ی جداگانه که شامل پلاسما (در سطح)، بافی کوت حاوی گلبول های سفید و پلاکت ها (در میانه) و حجم فشرده ی گلبول های قرمز (در زیر) تشکیل شود. در این مرحله لایه ی میانی (بافی کوت)، توسط سمپلر، با دقت جمع آوری و به میکروتیوب منتقل شد و سپس برای بار دوم با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه، سانتریفیوژ شد تا پلاکت ها ته نشین شوند (پلاسمای غنی از پلاکت) و پلاسمای فقیر از پلاکت از سطح آن خارج گردد. حدود ۰/۰۳ میلی لیتر پلاسمای غنی از پلاکت به دست آمد که به صورت تازه در همان روز مورد استفاده قرار گرفت.

**چگونگی ایجاد آسیب:** در ابتدا موش های صحرایی با تزریق داروهای کتامین ۹۰ mg/kg و زایلازین ۸ mg/kg بیهوش شده و برای ایجاد آسیب و مدل سازی بیماری، به پشت روی تخت جراحی قرار داده شدند و پای راست آنها روی تخت به حالت ثابت نگه داشته شد و در پشت پای راست یک شکاف به اندازه ۲ سانتی متر ایجاد شد. با قرار دادن یک پنس در زیر تاندون آشیل (شامل تاندون های گاستروکنمیوس و سولئوس) آن را از سایر بافت های نرم جدا ساخته و سپس تاندون جدا سازی شده را به وسیله پنس خون بند موسکیتو له نموده (crush)، به گونه ای که تعدادی از تارهای کلاژنی آن به حالت گسسته در آمدند (۱۸).

برنامه تمرینی به ۲ مرحله تقسیم شد:

- ۱) **مرحله آشنایی:** در این مرحله موش های صحرایی به مدت ۳ روز، روزانه ۵ دقیقه در یک اکواریوم شیشه ای به طول ۵۰ عرض ۴۰ و عمق ۸۰ سانتیمتر و با دمای آب ۳۴ درجه سانتی گراد به صورت اختیاری فعالیت کردند.
- ۲) **مرحله اضافه بار:** در هفته اول تمرین، موش های صحرایی به مدت ۵ دقیقه و ۵ روز در هفته به صورت اختیاری در آب دست پا زدند. در هفته های دوم تا چهارم به ترتیب ۵ دقیقه به مدت تمرین اضافه گردید، به گونه ای که در هفته

دوم تا چهارم به ترتیب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به فعالیت پرداختند. همچنین مدت تمرین در هفته‌های پنجم و ششم نیز به ۲۵ دقیقه در روز افزایش یافت. با توجه به رعایت اصل اضافه بار در پژوهش حاضر میزان فعالیت موش‌های صحرایی نیز در هفته‌های هفتم و هشتم به ۳۰ دقیقه در روز رسید (جدول ۱) (۱۹، ۲۰).

جدول ۱: برنامه تمرینی آزمودنی‌ها در طول دوره پژوهش

| ایام هفته        | روز های هفته    | مدت تمرین |
|------------------|-----------------|-----------|
| هفته اول         | روز اول تا پنجم | ۵ دقیقه   |
| هفته دوم         | روز اول تا پنجم | ۱۰ دقیقه  |
| هفته سوم         | روز اول تا پنجم | ۱۵ دقیقه  |
| هفته چهارم       | روز اول تا پنجم | ۲۰ دقیقه  |
| هفته پنجم و ششم  | روز اول تا پنجم | ۲۵ دقیقه  |
| هفته هفتم و هشتم | روز اول تا پنجم | ۳۰ دقیقه  |

از میانگین و انحراف استاندارد برای توصیف داده‌ها و برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. به علاوه برای بررسی تعداد فیبروبلاست‌ها، میزان رسوب کلاژنی، میزان دانسیته سلولی، تغییرات  $TGF-\beta$  و قطر تاندون در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنادار بودن مقدار F از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS، نسخه ۱۶ انجام شد.

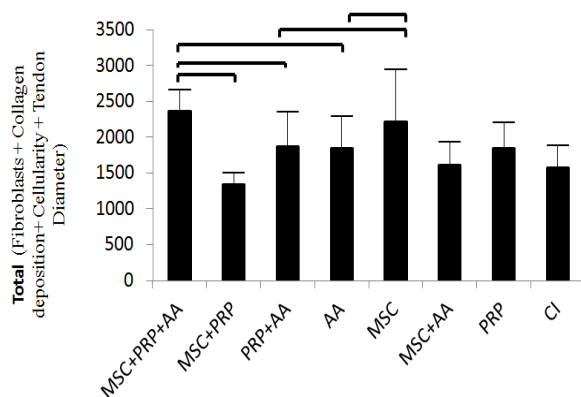
## یافته‌ها

در جدول ۲ میانگین و انحراف معیار متغیرهای پژوهش شامل تعداد فیبروبلاست‌ها، رسوب رشته‌های کلاژن، میزان دانسیته سلولی، تغییرات  $TGF-\beta$  و قطر تاندون در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار متغیرهای پژوهش در گروه‌های مورد مطالعه

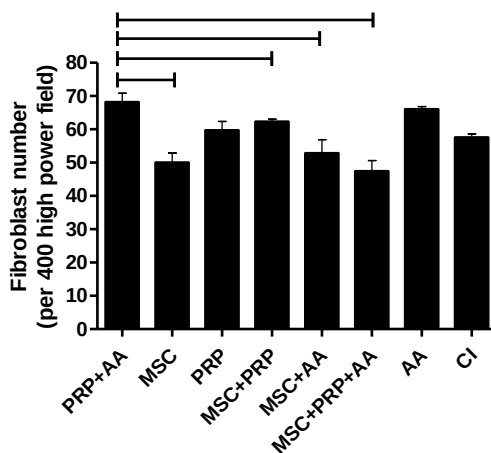
| متغیرهای پژوهش | تعداد فیبروبلاست‌ها<br>(تعداد × بزرگنمایی ۴۰۰)* | رسوب رشته‌های کلاژن<br>(تراکم کلاژن × بزرگنمایی ۴۰۰) | میزان دانسیته سلولی<br>(تعداد × بزرگنمایی ۴۰۰)* | $TGF-\beta$<br>(Pg/ml) | قطر تاندون<br>(میکرومتر) | مجموع<br>(فیبروبلاست + کلاژن + دانسیته سلولی + قطر تاندون) |
|----------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| MSC            | ۵۰ ± ۷/۶                                        | ۲/۷۱ ± ۰/۴۸                                          | ۱/۲۸ ± ۰/۴۸                                     | ۳۳۵/۷۲ ± ۳۰۳/۷         | ۲۱۶۴/۷۱ ± ۷۴۲            | ۲۲۲۳/۱۵ ± ۷۴۰                                              |
| PRP            | ۵۹/۷۱ ± ۶/۹                                     | ۱/۴۲ ± ۰/۵۳                                          | ۱/۷۱ ± ۰/۴۸                                     | ۴۱۶/۶۶ ± ۱۳۱/۷         | ۱۷۸۰/۸۴ ± ۳۷۹            | ۱۸۴۳/۶۳ ± ۳۷۹                                              |
| MSC+ PRP       | ۶۲/۲۸ ± ۲/۰۵                                    | ۲ ± ۰/۰                                              | ۱/۷۱ ± ۰/۴۸                                     | ۴۱۱/۷۱ ± ۲۷۵/۳         | ۱۲۸۲/۳۸ ± ۱۶۹            | ۱۳۴۸/۳۸ ± ۱۶۸                                              |
| PRP+AA         | ۶۸/۱۴ ± ۷/۱                                     | ۱/۴۲ ± ۰/۵۳                                          | ۱/۵۷ ± ۰/۵۳                                     | ۴۴۹/۰۴ ± ۱۱۵/۹         | ۱۸۰۴/۶۲ ± ۴۸۳            | ۱۸۷۷/۱۲ ± ۴۹۰                                              |
| MSC+AA         | ۵۲/۸۵ ± ۱۰/۶                                    | ۲/۴۲ ± ۰/۵۳                                          | ۱/۵۷ ± ۰/۵۳                                     | ۳۹۴/۰۵ ± ۴۷/۸۳         | ۱۵۷۱/۶۹ ± ۳۲۷            | ۱۶۲۰/۵۴ ± ۳۳۳                                              |
| PRP+MSC+AA     | ۴۷/۴۲ ± ۸/۵                                     | ۲/۸۵ ± ۰/۳۷                                          | ۱/۱۴ ± ۰/۳۷                                     | ۶۶۷/۰۸ ± ۲۹۸/۰۶        | ۲۳۱۶/۷ ± ۳۰۹             | ۲۳۶۸/۵۳ ± ۳۱۰                                              |
| AA             | ۶۶ ± ۲/۱                                        | ۱ ± ۰/۰                                              | ۲ ± ۰/۰                                         | ۴۳۱/۲ ± ۱۱۳/۸۸         | ۱۷۸۲/۸۴ ± ۴۵۵            | ۱۸۵۲/۱۷ ± ۴۵۴                                              |
| CI             | ۵۷/۶ ± ۲/۳                                      | ۱ ± ۰/۰                                              | ۲ ± ۰/۰                                         | ۳۷۳/۰۳ ± ۹۱/۹۴         | ۱۵۲۰/۴۳ ± ۳۱۵            | ۱۵۷۷ ± ۳۱۷                                                 |
| CO             | ۴۶/۸ ± ۴/۶                                      | ۲/۶ ± ۰/۵۴                                           | ۱/۲ ± ۰/۴۴                                      | ۴۳۳/۴۱ ± ۱۰۴/۶۴        | ۱۴۷۸/۶۶ ± ۱۹۵            | ۱۵۲۶/۰۶ ± ۱۹۴                                              |

نتایج تحلیل آماری (نمودار ۱) نشان داد که فعالیت درآب به همراه تزریق آلوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت بر ترمیم تاندون آشیل در گروه‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری دارد. در بررسی جفت گروه‌ها از لحاظ ترمیم تاندون آشیل تفاوت معناداری بین گروه‌های MSC+PRP+AA (05/0 = P) با گروه‌های PRP+AA (001/0 = P) و AA (001/0 = P) وجود دارد. همچنین بین گروهی که MSC را دریافت می‌کردند با گروه‌های AA (001/0 = P) و PRP+AA (001/0 = P) تفاوت معناداری مشاهده شد.



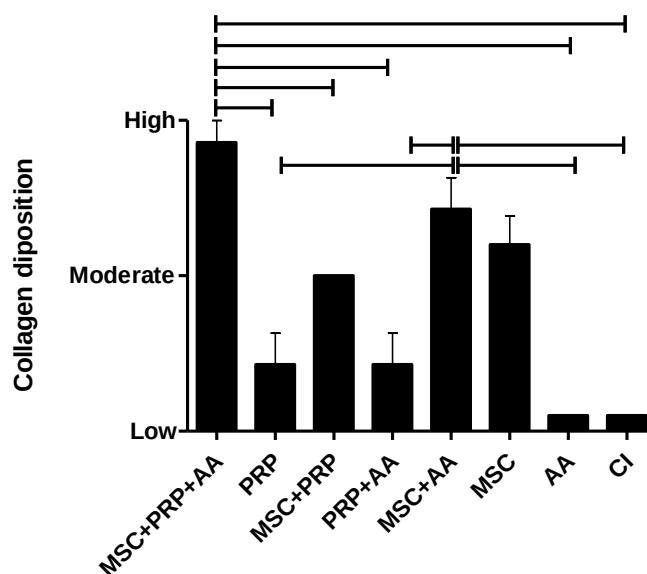
نمودار ۱: سطح معناداری برای ترمیم تاندون آشیل در گروه‌های مورد مطالعه

ترمیم تاندون آشیل شامل ۴ بعد تعداد فیبروبلاست‌ها، میانگین رسوب رشته‌های کلاژن، میزان دانسیته سلولی و میانگین قطر تاندونی می‌باشد. بنابراین برای ارزیابی دقیق‌تر این ابعاد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که فعالیت درآب به همراه تزریق آلوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت بر تعداد فیبروبلاست‌ها، میانگین رسوب رشته‌های کلاژن، میزان دانسیته سلولی و میانگین قطر تاندونی، در گروه‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری دارد که با مقایسه جفت گروه‌ها مشخص گردید که از لحاظ تعداد فیبروبلاست‌ها تفاوت معناداری بین گروهی که PRP+AA دریافت می‌کردند با گروه‌های MSC (P= ۰/۰۰۱)، MSC+AA (P= ۰/۰۳)، MSC+PRP+AA (P= ۰/۰۰۱) و MSC+PRP (P= ۰/۰۴) وجود دارد (نمودار ۲).



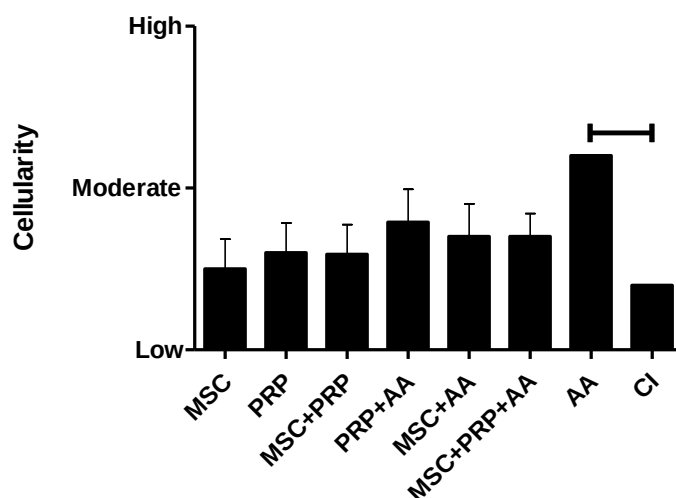
نمودار ۲: سطح معناداری برای تعداد فیروبیلاست هادر گروه‌های مورد مطالعه

همچنین از لحاظ رسوب رشته‌های کلاژن بین گروه MSC+PRP+AA نسبت به گروه‌های AA ( $P=0/001$ )، PRP ( $P=0/001$ )، PRP+AA ( $P=0/001$ )، MSC+PRP ( $P=0/04$ ) و CI ( $P=0/001$ ) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین گروه MSC+AA نسبت به گروه‌های AA ( $P=0/001$ )، PRP ( $P=0/02$ )، PRP+AA ( $P=0/02$ ) و CI ( $P=0/001$ ) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود (نمودار ۳).

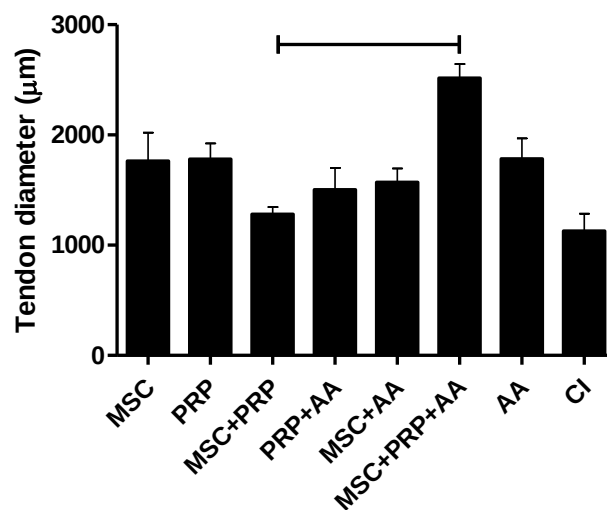


نمودار ۳: سطح معناداری برای میزان رسوب رشته‌های کلاژن در گروه‌های مورد مطالعه

علاوه بر این مقایسه جفت گروه‌ها از لحاظ میزان دانسیته سلولی نشان داد که فقط بین گروه AA نسبت به گروه CI ( $P=0/05$ ) تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار ۴)، در حالی که از لحاظ قطر تاندونی فقط بین گروه MSC+PRP نسبت به گروه MSC+PRP+AA تفاوت معناداری مشاهده گردید (نمودار ۵).



نمودار ۴: سطح معناداری برای میزان دانسیته سلولی در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۵: سطح معناداری برای قطر تاندون در گروه‌های مورد مطالعه

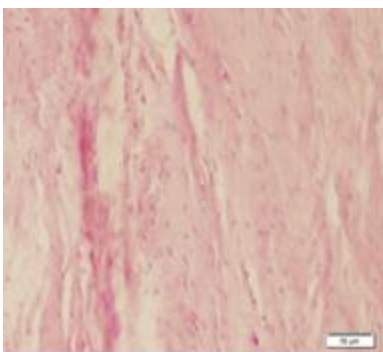
از سوی دیگر با توجه به نقش فاکتورهای رشد به ویژه  $TGF-\beta_1$  در ترمیم تاندون، بررسی این فاکتور رشدی نشان داد که فعالیت در آب به همراه تزریق آلوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت بر میزان تغییرات فاکتور رشد  $TGF-\beta_1$  سرم خون در گروه‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری نشان نداد ( $P=0/1$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

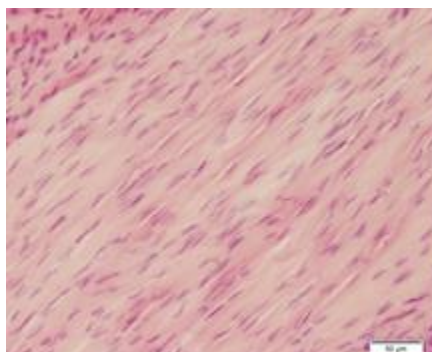
هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر فعالیت در آب به همراه تزریق آلوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت‌ها بر ترمیم تاندون آشیل بود. نتایج حاصل نشان داد که تزریق همزمان MSC+PRP به همراه فعالیت در آب منجر به یک افزایش ۵۰ و ۵۲ درصدی به ترتیب در ترمیم تاندون آشیل و قطر تاندونی می‌شود، اگرچه که این تغییرات از لحاظ آماری نسبت به گروه CI معنادار نبوده است؛ اما می‌توان به اثر متقابل سلول درمانی و فعالیت در آب بر میزان ترمیم تاندون آشیل اشاره کرد که این عدم معنی‌داری را می‌توان به تعداد و نوع آزمودنی‌ها و نوع تاندون انتخاب شده در پژوهش نسبت داد. زیرا که تزریق PRP در تاندون‌های گوناگون تاثیرات مختلفی را اعمال می‌کند که این مسئله به ویژگی‌های استرسی و عروقی هر تاندون در پاسخ به تزریق PRP بستگی دارد (۲۱). به علاوه نتایج پژوهش حاضر نشان داده است که تزریق همزمان پلاسمای غنی از پلاکت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه با فعالیت در آب می‌تواند اثربخشی بهتری را در روند ترمیم داشته باشد و اگر در موضعی به دلیل کاهش جریان خون تعداد پلاکت‌ها کم باشد و یا عوامل رشد آزاد شده برای ترمیم کافی نباشد می‌توان با تزریق پلاکت و یا محتوی آنها روند ترمیم را افزایش داد و زمان درمان تاندون را تسریع کرد. میچانا و همکارانش (۱۹۸۴) نشان دادند که تمرین ورزشی روی ترمیم به مدت

یک هفته می‌تواند اندازه فیبرهای کلاژنی و قطر تاندونی را در موش افزایش دهد. کروین و همکارانش (۱۹۸۸) نیز بیان کردند که تمرینات استقامتی شدید منجر به افزایش رسوب رشته‌های کلاژن در تاندون آشیل می‌گردد. از سوی دیگر نتایج حاصل از پژوهش‌ها نشان داده که تمرین ورزشی منجر به افزایش بیان بسیاری از فاکتورهای رشد در تاندون آشیل می‌گردند که این مسئله می‌تواند سنتز کلاژن و تکثیر سلولی را در تاندون تحریک نماید (۲۲). بنابراین با نگاهی کلی به نتایج پژوهش‌های موجود و پژوهش حاضر می‌توان گفت که به نظر می‌رسد انجام فعالیت در آب همزمان با تزریق پلاسمای غنی از پلاکت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نقش متقابل بر یکدیگر و تاثیر بر فاکتورهای رشد مؤثر بر تکثیر فیبروبلاست‌ها و در نتیجه سنتز کلاژنی می‌تواند منجر به افزایش ترمیم تاندون و قطر تاندونی گردند.

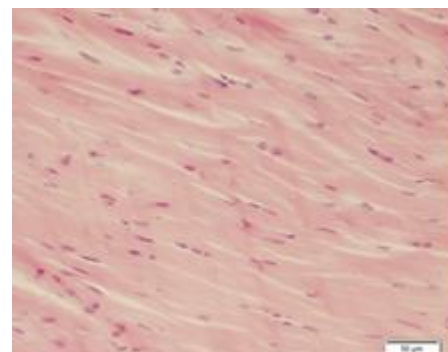
در تایید این موضوع، بررسی فاکتورهای هیستوپاتولوژیک به منظور ارزیابی میزان ترمیم تاندون آشیل نشان داد که تعداد فیبروبلاست‌ها در گروه‌های AA+PRP، MSC+PRP، AA و PRP به ترتیب یک افزایش ۱۸، ۱۴، ۸ و ۳ درصدی را نسبت به گروه CI داشته است (شکل ۳)، در حالی که در گروه‌های MSC+PRP+AA، MSC+PRP و AA+MSC به ترتیب یک کاهش ۱۸، ۹ و ۱۴ درصدی نسبت به گروه CI مشاهده گردید. بنابراین به توجه به نتایج پژوهش حاضر که به افزایش در تعداد فیبروبلاست‌ها در دو گروه AA+PRP و AA به تنهایی نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه اشاره می‌کند، می‌توان به نقش مؤثر پلاسمای غنی از پلاکت بر میزان ترمیم تاندون آشیل و تاثیر متقابل فعالیت در آب بر آن تاکید کرد. در همین راستا ارنی (۲۰۱۰) و گرازیانی (۲۰۰۵) نشان دادند که پلاسمای غنی از پلاکت می‌تواند تکثیر فیبروبلاست‌ها را تحریک نموده، باعث افزایش تعداد آنها گردد. اگر چه نتایج پژوهش حاضر از لحاظ افزایش در تعداد فیبروبلاست‌ها با پژوهش‌های ذکر شده همخوانی دارد، اما این افزایش از لحاظ آماری نسبت به گروه CI معنادار نبود و یک دلیل احتمالی برای آن می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع و تعداد آزمودنی‌ها و اختلاف در دوزهای تزریق شده از پلاسمای غنی از پلاکت در پژوهش‌های ذکر شده نسبت به پژوهش حاضر باشد؛ زیرا پژوهشگران بیان نمودند که افزایش نسبی در غلظت PRP می‌تواند تکثیر و تمایز فیبروبلاست‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (۲۳).



توزیع نا منظم فیبروبلاست‌ها به همراه رسوب کلاژن به صورت موضعی و غیر یکنواخت در گروه کنترل آسیب (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی ۲۰۰).



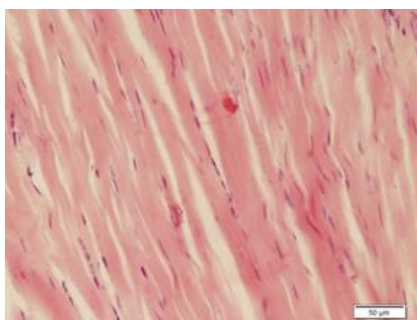
تکثیر زیاد فیبروبلاستی به همراه رسوب کم کلاژن‌ها در گروه فعالیت در آب (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی ۲۰۰).



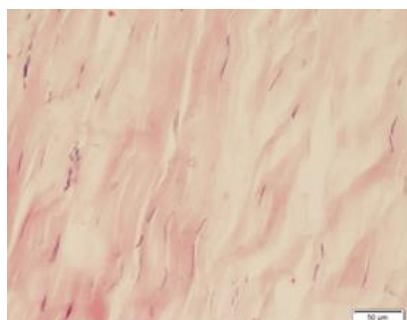
تشکیل رشته‌های کلاژن به طور متوسط همراه با جمعیت بیشتر فیبروبلاستی در گروه تزریق پلاسمای غنی از پلاکت‌ها و فعالیت در آب (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی ۲۰۰).

شکل ۳: افزایش میزان فیروبلاست‌ها در گروه‌های مورد مطالعه که افزایش چشمگیرتری را داشته است.

به طور کلی می‌توان گفت که درمان تاندونی نیز همانند دیگر بافت‌های بدن با واکنش‌های التهابی آغاز می‌شود که وجود مرحله حاد التهابی برای پیشرفت عمل ترمیم و فیروپلازی ضروری می‌باشد به طوری که هر چه واکنش التهابی شدیدتر باشد، بهبود زخم تسریع می‌شود. همچنین در پاسخ به ایجاد آسیب، فیروبلاست‌ها به بستر زخم مهاجرت کرده و شروع به ترشح کلاژن نوع III می‌نمایند که در مراحل بعد توسط کلاژن نوع I جایگزین می‌شوند (۲۴). از سوی دیگر براساس نتایج پژوهش‌ها نشان داده شده که اجسام خارجی موجب تحریک محل شده و مرحله‌ی التهابی را طولانی‌تر می‌کنند (۲۴). بنابراین تزریق پلاسمای غنی از پلاکت می‌تواند به عنوان یک جسم خارجی روش درمانی مناسبی برای واکنش‌های التهابی محسوب گردد که مطالعات کلینیکی نشان داده است که به کار بردن پلاسمای غنی از پلاکت راهی مناسب برای افزایش مکانیسم‌های ترمیمی در بدن به شمار می‌آید و تجمع آن باعث تکثیر فیروبلاست‌ها می‌گردد (۲۵). به علاوه فشارهای مکانیکی می‌تواند بر هموستاز کلاژن‌ها تاثیرگذار باشد و تحریکات مکانیکی بیان کلاژن‌ها را در انواع گوناگونی از بافت‌ها مانند کلیه، قلب، عروق و تنفس افزایش می‌دهد که در محیط آزمایشگاهی نیز پاسخ‌های مشابهی برای فیروبلاست‌های تاندون و لیگامنت‌های انسانی بعد از تمرین و فعالیت ورزشی طولانی مدت گزارش شده است (۲۶). در تایید این موضوع، نتیجه پژوهش حاضر نشان داد که تزریق پلاسمای غنی از پلاکت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه فعالیت در آب می‌تواند باعث یک افزایش ۱۰ درصدی در رسوب رشته‌های کلاژن نسبت به گروه کنترل آسیب گردد که این تفاوت از لحاظ آماری نیز معنادار بود. بنابراین به نظر می‌رسد که تحریکات مکانیکی و فعالیت ورزشی می‌تواند باعث افزایش تعداد فیروبلاست‌ها و در نتیجه رسوب رشته‌های کلاژنی گردد که این مسئله با توجه به نتایج پژوهش حاضر که فعالیت در آب نیز برافزایش تعداد فیروبلاست‌ها و رسوب رشته‌های کلاژن مؤثر بوده است، تایید می‌گردد (شکل ۴). بررسی میزان دانسیته سلولی در پژوهش حاضر نشان داد که تنها در گروه فعالیت در آب نسبت به گروه کنترل آسیب تفاوت معناداری وجود دارد. لین و همکارانش (۲۰۱۳) بیان کردند که میزان کلاژن‌ها و دانسیته سلولی با افزایش فعالیت متابولیکی افزایش می‌یابد که این می‌تواند تاثیر مثبتی را بر روند ترمیم داشته باشد (۲۱).



رشته‌های موازی کلاژن و توزیع منظم سلول‌های فیروبلاست در طول یک تاندون نرمال در گروه کنترل (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی ۲۰۰).



نقش متقابل فعالیت در آب، تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از پلاکت‌ها که منجر به تشکیل باندل‌های ضخیم کلاژن همراه با تشکیل فیروبلاست‌ها به صورت پراکنده شده است (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی ۲۰۰).

## شکل ۴: افزایش میزان کلاژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

بنابراین می‌توان گفت که در تاندون طبیعی میزان غلظت کلاژن‌ها و اندازه فیبرهای کلاژنی بعد از ورزش افزایش می‌یابد که این تغییرات فرا ساختاری و مرفولوژیکی با بهبود عملکرد تاندون آشکار می‌شود. از سوی دیگر متابولیسم کلاژن‌ها و بافت پیوندی تحت تاثیر میزان فعالیت بدنی است؛ به گونه‌ای که با کاهش میزان فعالیت، ساخت بافت پیوندی نیز کاهش می‌یابد. برعکس فعالیت ورزشی میزان تمایز و تغییر بافت پیوندی را در تاندون‌ها افزایش می‌دهد که این مسئله منعکس کننده سازگاری‌های فیزیولوژیکی و ترمیم آسیب‌های وارده بر ساختار ماتریکس خارج سلولی ناشی از فعالیت ورزشی می‌باشد (۲۷).

ازسوی دیگر با توجه به مطالعات موجود که به نقش فاکتورهای رشد به ویژه  $TGF-\beta 1$  در ترمیم تاندون اشاره کرده‌اند، در پژوهش حاضر نیز این فاکتور رشدی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان  $TGF-\beta 1$  در گروه‌های  $AA+MSC$ ،  $AA+PRP$ ،  $MSC+PRP$ ،  $PRP$ ،  $MSC+PRP+AA$  و  $AA$  به ترتیب یک افزایش ۷۸، ۱۱، ۱۰، ۲۰، ۵ و ۱۵ درصدی را نسبت به گروه  $CI$  نشان داد؛ در حالی که در گروه  $MSC$  نسبت به گروه  $CI$  یک کاهش ۱۰ درصدی مشاهده گردید که این تغییرات از لحاظ آماری معنادار نبود. اما با توجه به این که در پژوهش حاضر در گروهی که سلول درمانی را همراه با فعالیت در آب دریافت می‌کردند، افزایش چشمگیری در میزان  $TGF-\beta$  مشاهده گردید؛ می‌توان به نقش متقابل آنها بر یکدیگر و روی این فاکتور رشدی تاکید کرد. چانگ و همکارانش (۲۰۰۷) گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان می‌تواند در روند ترمیم تاندون در خرگوش‌ها مؤثر باشند. در پژوهش دیگری نیز هو و همکارانش (۲۰۰۹) به نقش  $TGF-\beta 1$  و  $VEGF$  در ترمیم تاندون اشاره کردند که با نگاهی کلی به نتایج حاصل از پژوهش‌ها می‌توان گفت تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تاثیر بر فاکتورهای رشد می‌توانند، نقش مؤثری را در روند ترمیم داشته باشند که پژوهشگران از میان فاکتورهای رشد به نقش کلیدی  $TGF-\beta 1$  در این زمینه اشاره کرده‌اند که سطح  $TGF-\beta 1$  در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌یابد و این مسئله با افزایش در میزان کلاژن‌های نوع I و III می‌تواند باعث تسریع در روند ترمیم گردد (۲۶). به علاوه براساس نتایج پژوهشات موجود می‌توان به نقش متقابل فشارهای مکانیکی و سنتز  $TGF-\beta$  در انواع سلول‌ها اشاره کرد. فشارهای مکانیکی با آزاد سازی  $TGF-\beta$  از بافت‌های گوناگون و فعالیت پلاکت‌ها می‌تواند در افزایش سطح سرمی  $TGF-\beta$  مؤثر باشند. پژوهشگران نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی به مدت طولانی می‌تواند با تاثیر بر روی فعالیت پلاکت‌ها در افزایش میزان  $TGF-\beta$  سرمی و تجمع میزان کلاژن نوع I مؤثر باشند که این افزایش در تولید کلاژن‌ها می‌تواند توسط هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، کانال‌های یونی کلسیم و مسیرهای سیگنالی گوناگون در پاسخ به فعالیت ورزشی تعدیل گردد (۲۸). بنابراین با نگاهی کلی به نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که تزریق همزمان پلاسمای غنی از پلاکت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه فعالیت در آب در افزایش میزان  $TGF-\beta$  سرمی مؤثر بوده است و براساس مطالب ارائه شده نقش متقابل این ۳ عامل به عنوان فاکتورهای مؤثر در روند ترمیم تاندون بسیار حائز اهمیت است.

## نتیجه گیری

در حال حاضر در حوزه پزشکی ورزشی توجه زیادی به تأثیر درمان و بازگشت به فعالیت پس از آسیب تاندون و لیگامنت مبذول شده است؛ اما نکته ای که در سال های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف ساخته است، نتایج حاصل از پژوهش های پیش بالینی می باشد که نشان دهنده پتانسیل درمان های سلولی جهت افزایش و احیای تنوسیت ها و تزریق مستقیم فاکتور رشد در قسمت های آسیب دیده برای ترمیم بافت های تاندونی است. در حال حاضر استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل جداسازی آن از بافت های گوناگون و قابلیت کنترل و تغییر بسیاری از مکانیزم های درگیر در روند ترمیم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند از طریق عروق زایی بهتر، رسوب بیشتر و سازمان دهی بهتر ماتریکس خارج سلولی به بهبود تاندون کمک کنند و به دلیل قابلیت ایمنی بالا و پتانسیل بالقوه در کمک به درمان بیماری های حاد، در حوزه پزشکی - ورزشی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر به کارگیری همزمان پلاسمای غنی از پلاکت، تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی و فعالیت در آب می توانند تقریباً تمام عملیات درگیر در فرآیند ترمیم نظیر تجمع مونوسیت ها، مهاجرت سلول های بنیادی و فیبروبلاست ها، پدیده رگ زایی، تمایز و تکثیر سلول های بنیادی و فیبروبلاست ها را تحت تأثیر قرار دهند. به کارگیری این روش های درمانی به واسطه باند شدن با گیرنده های غشای سلول های هدف مانند فیبروبلاست ها، سلول های بنیادی مزانشیمی و اندوتلیال منجر به فعال شدن یک سری پروتئین های داخل سلولی می گردند که در نتیجه فعالیت آنها واکنش هایی اتفاق می افتد که باعث شکل گیری ماتریکس و سنتز کلاژن می گردد که به ترمیم تاندون کمک می کند.

## References

1. Rodeo, S.A., Delos, D., Weber, A. (2010). What's New in Orthopaedic Research? *Journal of Bone Joint Surgery*. 92(2): 491-501.
2. Palmes, D., Spiegel, H.U., Schneider, T.O., Langer, M., Stratmann, U., Budny, T., Probst, A. (2002). Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *Journal of Orthopaedic Research*. 20: 939-46.
3. Lehninger, L.A. (1982). *Principles of biochemistry*. 6th. New York. Worth Publishers Inc. 157-60.
4. Andre, F., Steinert, M.K., Patrick, P., Thomas, B., Franz, J., Ulrich, N., Murray, C. H., Evans, D., Ryan, M.P. (2011). Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells. *Tissue Engineering*. 17: 9- 10.
5. Karp, J.M., Teo, G.S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 4: 206-16.
6. Zigang, G.E., Fang, Y., James, C.H., Goh, S.R., Eng, H. (2006). Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 10:639-52.
7. Caplan, A.I., Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal Stem Cells: Building Blocks for Molecular Medicine in the 21st Century. *Trends in Molecular Medicine*. 7: 259-64.
8. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal. *Stem Cells*. 284: 143-48.
9. Young, M. (2012). Stem cell applications in tendon disorders: A Clinical Perspective. *Stem Cells International*. 10(1): 155-65.
10. Obaid, H., Connell, D. (2010). Cell Therapy In Tendon Disorders: What Is The Current Evidence? *American Journal of Sports Medicine*. 10(2): 123-32.

11. Phinney, D.G., Prockop, D.J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 11(2): 896–02.
12. Caplan, A.I., Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 98(10): 76-84.
13. Chong, A.K., Ang, A.D., Goh, J.C., Hui, J.H., Lim, A.Y., Lee, E.H., Lim, B.H. (2007). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Influence Early Tendon-Healing in a Rabbit Achilles tendon Model. *Journal of Bone Joint Surgery*, 89(1): 74-81.
14. Huntsman, H.D., Zachwieja, N., Zou, K., Ripchik, P., Valero, M.C., De Lisio, M., Boppart, M.D. (2013). Mesenchymal stem cells contribute to vascular growth in skeletal muscle in response to eccentric exercise. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*; 304(1):72-81.
15. Genovese, J.A., Spadaccio, C., Ravello, H.G., Toyoda, Y., Patel, A.N. (2009). Electro stimulated Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells Produce Follistatin. *Cytotherapy*. 11 (4): 448–56.
16. Mescher, L.A. (2016). Junqueira's basic histology. Shirazi, R. 1. Tehran. Mirmah. 580-90. (Persian).
17. Hilberg, T., Volker, H., Wolfgang, L.S., Holger, H.W. (2003). Platelet activity and sensitivity to agonists after exhaustive treadmill exercise. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2:15-22.
18. Akinbo, S., Aiyegbusi, A., Duru, F., Noronha, C., Okanlawon, A. (2008). The efficacy of ultrasound therapy on the acute tendon injury. *Journal of Orthopedic Surgery*. 13(2): 1-7.
19. Hart, K.J., SHAW, J.M., Vajda, E., Hegsted, M., Miller, S.C. (2001). Swim-trained rats have greater: bone mass, density, strength, and dynamics. *Journal of Applied Physiology*. 91(1): 663–68.
20. McVeig, J., Kihngsley, S., Gray, D., and Loram, L.C. (2010). Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. *Journal of Sports Science and Medicine*. 9: 612-19.
21. Lane, J.G., Healey, R.M., Chase, D.C., Amiel, D. (2013). Use of platelet-rich plasma to enhance tendon function and cellularity. *American Journal of Orthopedics*. 42 (5): 209-14.
22. Wang, J. H.C. (2006). Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics*. 39(1): 563–82.
23. Graziani, F., Ivanovski, S. Cei, S. Ducci, F. Tonetti, M. Gabriele, M. (2005). The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical Oral Implants Reserch*. 17: 212–19.
24. Lisa, m., Zena, W. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-67.
25. Ernie, M.S. (2010). Natural growth factor: platelet rich plasma stimulates proliferation of fibroblast cell culture. *Indonesian Journal Of Tropical And Infectious Disease*. 2: 102-04.
26. Heinemeier, K.M. (2007). Adaptation of tendon and muscle connective tissue to mechanical loading. Ph.D Degree, Copenhagen University.
27. Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*. 84:649–98.
28. Heinemeier, K., Langberg, H., Olesen, J.K., Kjaer, M. (2003). Role of TGF- $\beta_1$  in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. *Journal of Applied Physiology* 95(2): 390–97.