بررسی تاثیرکاربرد لیزر کم توان بر ترمیم نقص استخوانی در موش های صحرایی ماده دیابتیک و استئوپوروتیک با استفاده از تکنیک Real-time PCR

عطاردسادات مصطفوی نیا[1*]، محمد بیات[2]، مهدی قطره سامانی[3]، سیدکامران قریشی[4]

۱) گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲) گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴) گروه آمار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۹**

چکیده

مقدمه: در مبتلایان به دیابت نوع یک تشکیل استخوان مختل شده و ریز ساختار استخوان تغییر می کند. مهم ترین عارضه متابولیکی در دیابت، استئوپوروز بوده که با کاهش توده استخوانی و تخریب ساختار استخوان مشخص می شود. هدف از تحقیق حاضر تعیین تاثیر کاربرد لیزر کم توان در ترمیم نقص استخوانی در مدل تجربی دیابت و استئوپوروز می باشد.

مواد و روش ها: ۳۰ سر موش صحرایی ماده چهار ماهه، نژاد ویستار با وزن ۲۲۰-۱۹۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به شش گروه شامل ۱: کنترل غیر دیابتی(Co.) ، ۲: لیزر غیر دیابتی(L.)، ۳: کنترل دیابتی(Co.D.)، ۴: لیزردیابتی(L.D.)، ۵: آلندرونیت دیابتی(A.D.)، و ۶: لیزر+آلندرونیت دیابتی(L.A.D.) تقسیم شدند. دیابت در گروه های ۳، ۴، ۵ و ۶ القا شد. همه گروه ها تحت عمل جراحی اواریکتومی و نقص استخوانی جزئی قرار گرفتند. در گروه لیزر، لیزر کم توان(۸۹۰ nm, ۱/۵ J/cm^2 , 80 Hz) به ۳ نقطه در محل نقص تابانده شد. بعد از یک ماه، استخوان های تیبیا برداشت و Real-time PCR انجام شد. داده های گروه ها با روش ANOVA با سطح معنی داری($P<0.05$) مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته های پژوهش: تحلیل آماری t نشان داد که کاهش معنی داری در دانسیته استخوان تیبیای موش های دیابتیک استئوپوروتیک در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی وجود دارد. تحلیل داده های بیان ژن(ANOVA, $P<0.05$) نشان داد که بین گروه لیزر+آلندرونیت دیابتی با سایر گروه ها از نظر بیان ژن Runx2 و Osteocalcin اختلاف معنی داری وجود دارد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به یافته ها می توان گفت که درمان ترکیبی لیزر و آلندرونیت باعث تسریع در ترمیم نقص استخوانی جزئی در مدل تجربی دیابتیک استئوپوروتیک می شود.

واژه های کلیدی: دیابت نوع یک، استئوپوروزیس، نقص استخوانی جزئی، لیزر کم توان، Real- time PCR

* نویسنده مسئول: گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

Email: a.mostafavinia@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

مقدمه

بیماری دیابت شیرین(Diabetes Mellitus) شامل گروهی از اختلالات متابولیک شایع بوده که وجه مشترک آن ها در فنوتیپ هایپرگلیسمی است(۱). شیوع دیابت در جوامع مختلف بین ۷- ۱ درصد در افراد بالغ تخمین زده می شود اما در ایران مطالعات مختلف از جمله مطالعه قند و لیپید تهران شیوع بیشتری را از ۷/۳ تا ۱۰/۶ درصد در افراد بیش از ۲۰ سال نشان داده اند(۲). پوکی استخوان(Osteoporosis) به عنـــوان یکی از عوارض بیماری دیابت، از مشکلات بهداشت عمومی بوده که با افزایش سن و جمعیت در حال رشد است(۳). این بیماری، اختلال شایعی است که با نقص سیستمیک توده استخوانی و ریزساختار آن مشخص می شود و نتیجه آن شکستگی های استخوانی است(۴). طبق نظر سازمان بهداشت جهانی(WHO) اگر دانسیته استخوانی حداقل ۲/۵ برابر انحراف معیار زیر میانگین طبیعی دانسیته استخوانی یک خانم جوان سفید پوست باشد، استئوپوروز تعریف می شود(۵). هر چند آمارهای ملی در خصوص زنان مبتلا به استئوپوروز در ایران در دسترس نیست اما تحقیقات نشان می دهد که ۴۷ درصد زنان شهری ۵۰ تا ۷۰ ساله ایرانی از استئوپنی و ۱۰ درصد از استئوپوروز رنج می برند(۶).

در سطح سلولی در تحقیقی که اخیرا در محیط کشت بر روی سلول های شبه استئوبلاست MG63 انجام شده است، محققان نشان داده اند که غلظت گلوکز زیاد به طور مشخص باعث افزایش رشد سلولی و مینرالیزاسیون شده و بیان مارکرهای متعدد مرتبط با استئوبلاست نظیر runt-related transcription factor 2(runx2)، کلاژن نوع یک، استئوکلسین و استئونکتین را سرکوب می کند در حالی که بیان مارکرهای آدیپوژنیک نظیر peroxisome proliferator-activating receptor γ -(PPAR)، adipocyte binding protein(aP2) fatty acid، resistin و adipsin را تقویت می کند. در موافقت با نتایج محیط کشت فوق، تجزیه و تحلیل هیستومورفومتریک در موش هایی که در آن ها دیابت به وسیله استرپتوزوتوسین القاء شد افزایش تعداد استئوکلاســـت ها و بیان تسهـــــیل کننده های استئوکلاســتوژنز شامل tumor necrosis factor (TNF)-α، macrophage colony stimulating factor(MCSF)، receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL) و vascular endothelial growth factor(VEGF)-A را نشان داد. تحقیقات مختلف نشان داده است که بخشی از اثرات دیابت در از دست رفتن استخوان ممکن است به وسیله فاکتورهای هومورال(kinin) باشد که به طور طبیعی جریان خون، التهاب و درد را کنترل می کنند(۷). بنا بر این بیماری دیابت اثرات منفی بر استخوان بندی دارد و با افزایش خطر اســـتئوپوروز و شکستگی ناشی از شکنندگی(fragility fracture) همراه است(۸).

ارتباط بین دیابت شیرین نوع یک و استئوپوروز طی دهه های گذشته تعریف شده و در سال های اخیر به آن توجه شده است. یکی از عوامل ایجادکننده شکنندگی استخوان در دیابت نوع یک، نقص در تمایز و فعالیت استئوبلاست است. فاکتـــورهای دخیل دیگر شامل تجمع(advanced glycation end products) AGE و پیشرفت از عوارض دیابت می‌باشند که باعث کاهش بیـــشتر در BMD(bone mineral density) می گردد و کیفیت استخوان را بدتر می کند و خطر شکستگی را افزایش می دهد(۹).

استفاده از خاصـــیت فتوبیواستیمولیشن لیزر در بیولوژی و پزشکی به سرعت در حال افزایش است و پیشرفت های چشمگیری که در تحقیقات لیزر درمانی (low-level laser therapy) رخ داده است توانایی متخصصان پزشکی را در درمان ایمن و موثر مشکلات مختلف پزشکی افزایش داده است(۱۰). نتایج تحقیقات مختلف حاکی از اثرات مثبت لیزرهای کم توان از نوع پیوسته(continuous) بر تـــسریع التیام شکستگی در مدل های حیوانی سالم در شرایط in vivo و in vitro است(۱۱،۱۲). محققان چند سالی است که اثرات تابش لیزرهای کم توان از نوع پیوسته را بر بافت های استئوپوروتیک بررسی و آزمایش کرده اند. در این تحقیقات استئوپوروز به طور تجربی و با برداشتن تخمدان در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد شده است. تابش لیزر به همراه کاربرد ورزش تاثیر مثبتی را نشان نداد اما تابش لیزر به همراه داروی بیسفسفونیت موجب اصلاح استئوپنی ایجاد شده در مهره های موش ها شد(۱۳).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

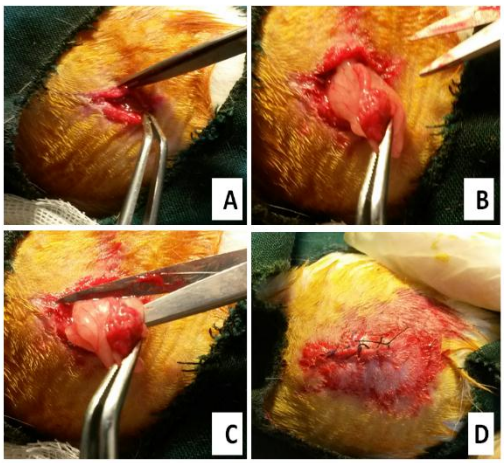
در سال‌های اخیر توجه محققان بر نوع ضربانی (pulsed) لیزرهای کم توان معطوف شده است و نتایج تحقیقات مروری و آزمایشگاهی حاکی از اثرات متفاوت لیزرهای ضربانی(۱۴) نسبت به لیزرهای پیوسته در تسریع بیشتر التیام شکستگی استخوان است(۱۵). لذا هدف از تحقیق حاضر تعیین تاثیر کاربرد لیزر کم توان در ترمیم نقص استخوانی در مدل تجربی دیابت و استئوپوروز می باشد.

مواد و روش ها

موش های صحرایی ماده بالغ ۴ ماهه، نژاد Wistar با وزن ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا موش ها به مدت دو هفته در حیوانخانه محل تحقیق نگهداری شدند تا با شرایط جدید خو بگیرند. موش ها در طی دوره تحقیق دسترسی آزاد به آب و خوراک استاندارد(شرکت بهپرور، تهران، ایران) داشتند. شرایط حیوانخانه با درجه حرارت حدود ۲۲ درجه سانتی گراد و سیکل روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی کنترل شد.

برای القاء دیابت از استرپتوزوتوسین (Streptozotocin; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) به میزان ۴۰ mg/kg یک دوز به صورت داخل صفاقی استفاده گردید. بعد از گذشت یک هفته نمونه خون از انتهای دم موش ها گرفته شد و با دستگاه قندخون(GM300; Bioneme, GmbH, Switzerland) اندازه گیری گردید. در صورتی که میزان قندخون آن ها بالای ۲۰۰ mg/dl بود، دیابتی محسوب شدند. با سپری شدن یک ماه و اطمینان از دیابتی شدن موش ها مراحل القاء استئوپوروز انجام شد.

با تزریق داخل عضلانی کتامین(Rotex, Germany) به میزان ۵۰ mg/kg و دیازپام(جابر بن حیان، ایران) به میزان ۵ mg/kg، موش ها بیهوش شدند به ترتیب در نواحی پهلوی(Lumbar) راست و چپ حیوان برش کوچک با ضخامت کامل به وسیله اسکالپل نمره ۱۵ داده شد و شاخ راست و چپ لوله رحمی در معرض دید قرار گرفت و تخمدان شناسایی گردید. سپس تخمدان همراه با کمی از بافت چربی اطراف برداشته شد. در انتها عضله به وسیله نخ بخیه جذبی ۰۴catgut، و پوست به وسیله نخ بخیه نایلون ۰۴reversed cutting (SUPA, Iran) دوخته شد(شکل شماره ۱). به موش ها در زمان جراحی، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آن آنتی بیوتیک ceftriaxone (جابر بن حیان، ایران) به میزان ۵۰ mg/kg داخل عضلانی تزریق گردید. حیوانات به مدت دو ماه نگهداری شدند تا استئوپوروز در آن ها القاء شود(۱۶). پس از گذشت ۲ ماه از زمان جراحی با CT Scan به عمل آمده از استخوان تیبیای چپ و به دست آوردن عدد هانسفیلد(CT number) (۵۰۱/۱۶±۰/۵۳) و مقایسه آن ها به روش t-student با گروه کنترل (۶۷۱/۱۵±۶/۳۲) که تحت عمل جراحی یاد شده قرار نگرفته بودند، وقوع استئوپوروز تایید شد($P<0.001$).

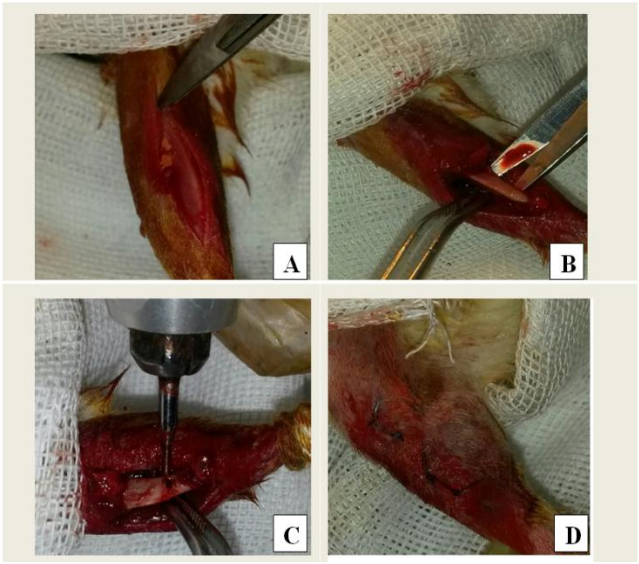


شکل شماره ۱. مراحل انجام عمل اوارکتومی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

برای ایجاد نقـــص جزئی استـــخوان(Partial Osteotomy) موش ها به وسیله تزریق داخل عضلانی کتامین و دیازپام به روش ذکرشده بیهوش شدند. بعد از برش در پوست و کنار زدن عضلات، در استخوان تیبیای چپ به وسیله fine-toothed circular microsaw (Delab; Dental Fabriktreffurt, Germany) یک نقص جزئی در نقطه میانی تنه استخوان تیبیا به قطر ۱/۵ میلی متر ایجاد گردید. عضله به وسیله نخ بخیه جذبی و پوست به وسیله نخ بخیه نایلون دوخته شد (شکل شماره ۲). به موش ها آنتـــی بیـــوتیک ceftriaxone تزریق گردید. بعد از عمل جراحی و احیاء موش‌ها، به آن ها اجازه تحرک نامحدود داده شد(۱۷).



شکل شماره ۲. مراحل انجام عمل استئوتومی پارشیال

در گروه آلندرونیت بعد از القاء دیابت و ایجاد نقص استخوانی، قرص آلندرونیت ۷۰ (البرز دارو، ایران) به میزان ۳ mg/kg روزانه به صـــورت زیر جلدی تزریق می گردید. در گروه لیزر ، لیزر کم توان(Mustang 2000, Technical Co., Moscow, Russia) به ۳ نقطه در محل نقص استخوان تابانده می شد قبل از لیزر به موش ها داروی بیهوشـــی کتامین(۵۰mg/kg) و دیازپام(۵ mg/kg) تزریق می‌گردید تابش لیزر ۳ روز در هفته به صورت یک روز در میان انجام می شد. تابش لیزر یک روز بعد از ایجاد نقص شروع شده و چهار هفته ادامه یافت. مشخصات لیزر استفاده شده در جدول شماره ۱ آمده است. چهار هفته بعد از عمل جراحی، موش ها با تزریق بیش از حد داروی بیهوشی قربانی شدند و استخوان تیبیای چپ آن ها نمونه برداری گردید و تحت آزمایش Real-time PCR قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری بر روی داده های به دست آمده انجام شد.

جدول شماره ۱. مشخصات لیزر استفاده شده

Parameters	Dose and unit
peak power output	80 W
Average power	1/15m W
Power density	1/15W/cm^2
Wave length	890 nm
Pulse frequency	80 Hz
Spot size	1 cm^2
Pulsed duration	180 ns
Duration of exposure for each point	1300 s
Energy density	1/5 J/cm^2

برای بیـــان ژن هـــای Rankl، Runx2 و Osteocalcin به روش Real-time PCR ابتدا بافت استخوان در هاون چینی کاملاً خرد شده و سپس در ۱ میلی لیتر محلول TRIzol(Invitrogen, USA) در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

دستگاه tissue lyser (Qiagen, GmbH) کاملاً هموژن شد به ازاء هر ml ۱ از محلول حاصل، ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم(Merck, Germany) به مخلوط مورد نظر اضافه شده و به مدت ۱۵ ثانیه هم زده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، فاز آبی بالایی برای استخراج RNA به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد. هم حجم محلول موجود در میکروتیوب جدید، ایزوپروپرانول اضافه شد. محتویات تیوب مخلوط شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری و به مـــدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شده و به رسوب، ml ۱ اتانول ۷۵ درصد اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در rpm ۷۵۰۰ (دمای ۴ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ انجام گردید. مجدداً محلول رویی دور ریخته و میکروتیوب حاوی رسوب به مدت چند دقیقه(حداکثر ۱۰ دقیقه) در دمای اتاق نگهداری شد تا رسوب RNA خشک شود. به رسوب RNA خشک شده ۳۰ لاندا محلول آب مقطر استریل افزوده شد. غلظت RNA به دست آمده با اسپکتروفتومتر(Eppendorf,Germany) در طول موج ۲۶۰ نانومترتعیین شد.

برای ساخت cDNA ، به ازاء ۱ میکرولیتر از RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر پرایمر Random hexamer و ۸ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. اجزاء با هم مخلوط و به مدت چند ثانیه سانتریفیوژ شد. مخلوط درون میکروتیوب به مـــدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شده، به سرعت در یخ فرو برده شد. و به آن، ۳ میکرولیتر بافر واکنش دهنده، ۳ میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات ۱۰ میلی مولار و ۱ میکرولیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز(Invitrogen. USA) اضافه گردید سپس در دستگاه ترموسایکلر در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد.

برای انجام PCR ابتدا پرایمر ژن های Rankl، Runx2، Osteocalcin به عنوان ژن های هدف و ژن 18srRNA به عنوان ژن کنترل با استفاده از سایت NCBI طراحی شده و با استفاده از ابزار BLAST این سایت از نظر عدم اتصال اختصاصی به نواحی دیگر ژنوم بررسی و تایید شدند. توالی این پرایمرها در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲. نام و توالی پرایمر ژن های Rankl، Runx2،Osteocalcin

Gene	Primer sequences
Rankl	Forward: 5′ CCAGCATCAAAATCCCAAGTTCGC
	Reverse: 5′ TTTGAAAGCCCCAAAGTACGTCGC
Runx2	Forward: 5′ GTGCCTCCAACCTGTGTTTTCCC
	Reverse: 5′ GTTTCGGTTTGCTACTGGGTGGG
Osteocalcin	Forward: 5′ GCTTCAGCTTTGGCTACTCTCC
	Reverse: 5′ GCTGTGCCGTCCATACTTTC

پس از اطمینان از صحت عملکرد پرایمرها و سایر اجزای واکنش PCR، واکنش اصلی Real-time PCR با استفاده از دستگاه Rotor gene و کیت Amplicon SYBR green به روش کمی نسبی انجام شد. در این روش میزان تکثیر محصول PCR در چرخه ای که بیان ژن ها قابل ردیابی باشد تحت عنوان CT نامیده شده و حاصل نسبت به CT مربوط به ژن کنترل(18 srRNA) مقایسه شد. مراحل انجام آزمون به این صورت بود که واکنش برای هر ژن جهت هر نمونه ۳ بار تکرار شد: ۳ واکنش برای ژن کنترل و ۳ واکنش برای ژن هدف. هر واکنش ۱۳ میکرولیتری شامل ۶/۵ میکرولیتر Power SYBR green master mix، ۱ میکرولیتر از cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر Reverse و ۴/۵ میکرولیتر آب DEPC بود. با این ترکیبات بر اساس تعداد نمـــونه و بـــرای هر بار راه اندازی دستگاه یک Master mix تهـــیه و با برنامه هـــای داده شـــده در جدول شماره ۳ اجرا شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

جدول شماره ۳. برنامه Real-time PCR برای ژن های Rankl، Runx2 و Osteocalcin

دما(درجه سانتی گراد)	زمان	برنامه	
۹۵	۱۰دقیقه	واسرشت شدن اولیه	
۹۵	۱۰ ثانیه	واسرشت شدن	۳۵ سیکل
۶۰	۳۰ ثانیه	جفت شدن	
۷۲	۲۵ ثانیه	طویل شدن	
۷۲	۱۰دقیقه	طویل شدن نهایی	

داده های به دست آمده به وسیله نرم افزارهای Linreg PCR و روش $\Delta\Delta Ct$ آنالیز شدند. تهیه جداول و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام شد(۱۸).

یافته‌های پژوهش

نتایج تحلیل داده ها به منظور مقایسه وزن اولیه و ثانویه موش ها در گروه های مختلف، که با استفاده از آزمون t زوج شده انجام پذیرفت، نشان داد که موش های گروه های ۲ و ۶ کاهش معنی داری در وزنشان اتفاق افتاد. نتایج عددی تحلیل وزن در جدول شماره ۴ و قندخون برای گروه های دیابتی در جدول شماره ۵ آمده است.

جدول شماره ۴. نتایج تحلیل وزن اولیه و ثانویه برای مطالعه اصلی به تفکیک گروه های مورد مطالعه

Mean±SEM	Co.	L.	Co. D.	L.D.	A.D.	L.A.D.
وزن اولیه g	$227/6 \pm 6/3$	$234/0 \pm 10/3$	$187/0 \pm 19/2$	$197/8 \pm 11/2$	$211/0 \pm 8/9$	$213/0 \pm 6/3$
وزن ثانویه g	$227/4 \pm 6/3$	$211/0 \pm 10/5$	$189/0 \pm 17/2$	$186/6 \pm 5/6$	$207/2 \pm 6/8$	$183/8 \pm 7/7$
p-value	$P = 0/94$	$P = 0/01$	$P = 0/83$	$P = 0/20$	$P = 0/43$	$P = 0/00$

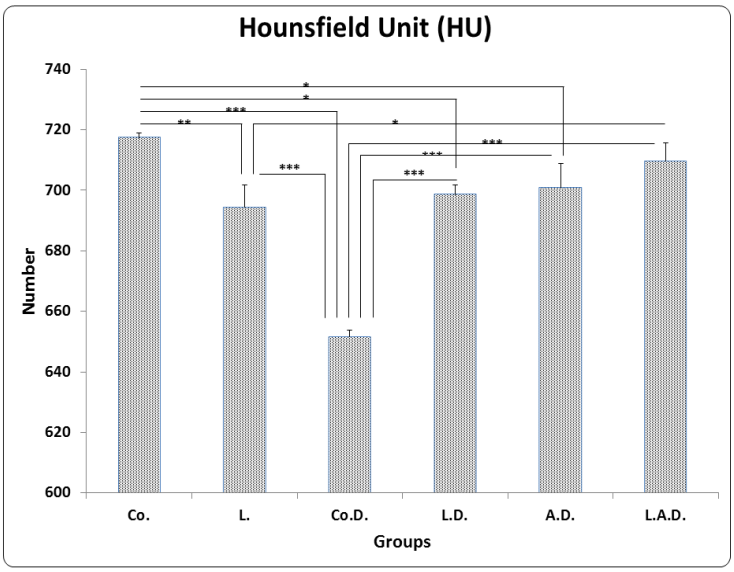
جدول شماره ۵. نتایج تحلیل قندخون اولیه و ثانویه موش های دیابتی به تفکیک گروه های مورد مطالعه

Mean±SEM	Co.D.	L.D.	A.D.	L.A.D.
قندخون اولیه(mg/dl)	$397 \pm 49/2$	$444 \pm 56/3$	$474 \pm 44/3$	$345 \pm 40/3$
قندخون ثانویه(mg/dl)	$410 \pm 72/9$	$456 \pm 74/2$	$400 \pm 44/2$	$320 \pm 44/7$

تحلیل عدد هانسفیلد برای گروه های موجود در تحقیق به منظور بررسی میزان دانسیته کال استخوانی انجام گرفت. تحلیل ANOVA نشان داد که اختلاف معنی داری در دانسیته کال استخوانی تیبیا در موش های دیابتیک استئوپوروتیک گروه های ۳، ۴ و ۵ در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی وجود دارد. افزایش معنی داری در دانسیته کال استخوانی تیبیا در گروه ۶ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و لیزر غیر دیابتی وجود دارد. افزایش معنی داری در دانسیته کال استخوانی تیبیا در گروه ۴ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی وجود دارد. اختلاف معنی داری در دانسیته کال استخوانی تیبیا در گروه ۲ در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی وجود دارد. شکل شماره ۳ جزئیات بیشتری را از این مقایسه در اختیار قرار می دهد.

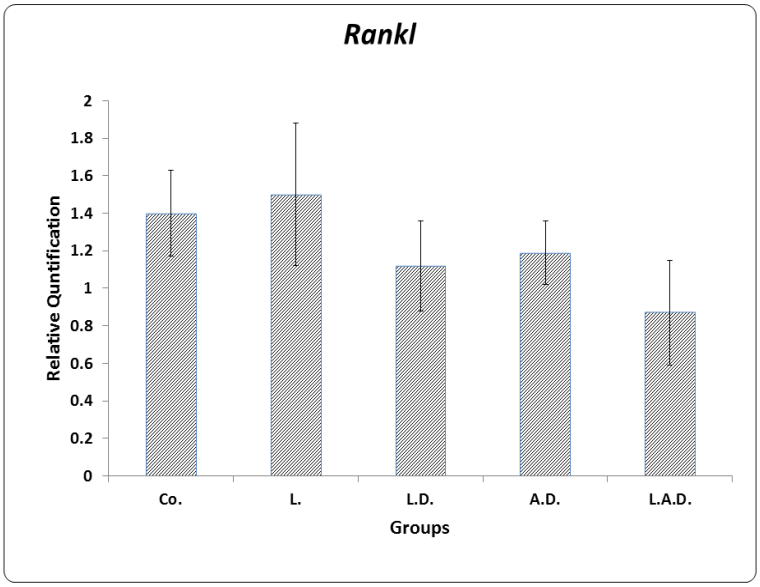
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]



شکل شماره ۳. Mean±SEM برای عدد هانسفیلد ناحیه کال استخوانی مقایسه بین گروه های مورد مطالعه به روش ANOVA و آزمون LSD(P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

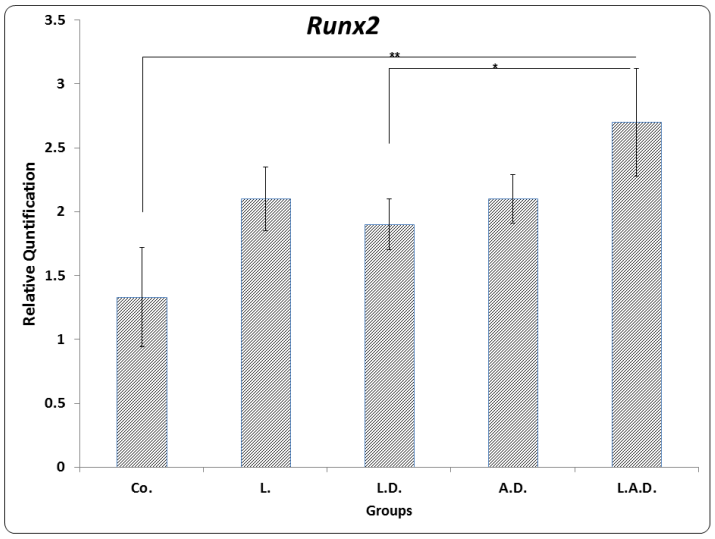
تحلیل ANOVA برای داده های حاصل از Real time-PCR به تفکیک در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل دیابتی انجام شد. از لحاظ بیان Rankl هیچ اختلاف معنی داری بین گروه ها دیده نشد. از نظر بیان Runx2 بین گروه لیزر+آلندرونیت دیابتی با گروه های کنترل غیر دیابتی و لیزر دیابتی اختلاف آماری معنی داری وجود داشت. از نظر بیان Osteocalcin بین گروه لیزر+آلندرونیت دیابتی با سایر گروه ها اختلاف آماری معنی داری وجود داشت.



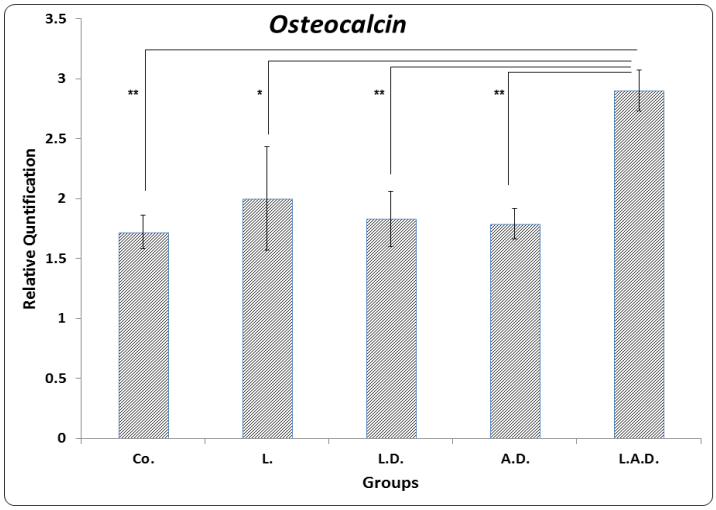
شکل شماره ۴. Mean±SEM برای بیان ژن Rankl مقایسه بین گروه های مورد مطالعه به روش ANOVA و آزمون LSD

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]



شکل شماره ۵. Mean±SEM برای بیان ژن Runx2 مقایسه بین گروه های مورد مطالعه به روش ANOVA و آزمون LSD(*P<0.05, **P<0.01)



شکل شماره ۶. Mean±SEM برای بیان ژن Osteocalcin مقایسه بین گروه های مورد مطالعه به روش ANOVA و آزمون LSD(*P<0.05, **P<0.01)

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان داد که تیمار ترکیبی لیزر+ آلندرونیت باعث افزایش بیان Runx2 و Osteocalcin در التیام مدل تجربی نقص جزئی استخـــوان تیبیا در موش های ماده دیابتیک و استئوپوروتیک در مقایسه با دیگر گروه ها می شود. اثرات استئوژنیک لیزر کم توان ضربانی بر تکـــــثیر سلـــول استخوانی در in vivo و in vitro (۱۹،۲۰) و بر نقص استخوانی و ترمیم آن در حیوانات مبتلا به دیابت نوع ۱ (۱۷) گزارش شده است.

بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ از توده استخوانی کافی برخوردار نیستند و به نظر می رسد مهم ترین علت آن اختلال در تشکیل استخوان باشد. دیابت با دوره های گلوکوزوری و هیپرکلسیوری همراه می شود که احتمال شکستگی ها را بیشتر می کند. علاوه بر ایـن ها، پوکی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

استخوان به عنوان علت مهم شکستگی ها و از عوارض دیابت، یکی از بزرگ ترین چالش های ارتوپدی قرن بیست و یکم می باشد(۲۱).

در این تحقیق سه فاکتور مهم در تشکیل و جذب استخوان در طی روند ترمیم شکستگی در مدل تجربی دیابت و استئوپوروز مورد بررسی قرار گرفت(با بررسی کارهای قبلی انجام شده توسط محققین، مدل سازی آزمایشگاهی دو اختلال به صورت هم زمان، ایجاد شکستگی در استخوان و بررسی ترمیم آن توسط لیزر از نوآوری های مطالعه حاضر به حساب می آید).

Runx2 یک فاکتور رونویسی است که به خانواده پروتئین runt تعلق دارد. مطالعات in vitro وin vivo نشان می دهد که Runx2 فاکتور رونویسی ضروری برای تمایز استئوبلاست، تولید ماتریکس و معدنی شدن استخوان می باشد. سطح بیان Runx2 برای رشد طبیعی استخوان مهم بوده و کاهش بیان این ژن منجر به رشد غیر طبیعی استخوان می شود(۲۲). استئوکلسین توسط استئوبلاست ترشح می شود و در تنظیم متابولیک و ساخت استخوان نقش دارد. لیگاند گیرنده فعال کننده فاکتور kB هسته ای(RANKL) و فاکتور تحریک‌کننده کلونی ماکروفاژ(M-CSF) برای استئوکلاستوژنز ضروری بوده و کمبود این پروتئین ها باعث ایجاد استئوپتروز می شود. RANKL منبع M-CSF را برای ساخت استئوکلاست ها تحریک می کند. سلول های استرومائی و استئوبلاست ها اهداف اکثر عوامل استئوکلاستوژنز هستند که این اثر را با افزایش بیان RANKL اعمال می کنند(۲۳).

اثرات لیزر کم توان Ga Al As پیوسته بر استخوان های دراز سالم(به جای نقص استخوانی جزئی در مطالعه حاضر) در یک مدل حیوانی دیابتی نوع ۱ با STZ توسط پاتروسینیو سیلوا مطالعه شد(۲۴). لیزر کم توان پیوسته ۱۵ روز بعد از القاء دیابت شروع شد(به جای ۳۰ روز در مطالعه حاضر). تابش لیزر به مدت ۱۸ جلسه در طی ۴۲ روز انجام شد(به جای ۳۰ روز در مطالعه حاضر). نتایج نشان داد که دیابت نوع ۱ باعث افزایش در نواحی بازجذبی استخوان کورتیکال می شود. به نظر می رسد که تابش لیزر قادر به تعدیل این عدم تعادل باشد. علاوه بر این موش های دیابتی تیمار شده با لیزر در مقایسه با موش های دیابتی کنترل، افزایش بافت کورتیکال را نشان دادند. این نتایج ممکن است در ارتباط با اثرات تحریکی لیزر کم توان پیوسته بر تکثیر سلولی و متابولیسم بافت استخوانی باشد. به علاوه لیزر پیوسته افزایش معنی داری در نیروی حداکثر، BMC و BMD در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ایجاد کرد. موثر بودن مدل STZ در القاء دیابت نوع ۱ و ایجاد کاهش در قطر کورتیکال، پارامترهای بیومکانیکی و متغیرهای دنسیتومتری در این مطالعه نشان داده شد. علاوه بر این، به نظر می رسد که LLLT نه تنها متابولیسم استخوانی را تحریک می کند و نواحی باز جذبی را کاهش می دهد بلکه هم چنین بیان RUNX2، نیروی شکستگی، نواحی کورتیکال، BMD و BMC را افزایش می دهد. این محققین پیشنهاد کردند که مطالعات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل لیزر کم توان در استخوان دیابتی از طریق آزمایشات حیوانی و بالینی انجام شود.

در تحقیقی دیگر محسنی فر و همکاران با القاء دو مدل تجربی استئوپوروز در موش های صحرایی و تابش لیزر کم توان به مدت دو ماه بر استخوان تیبیا و سپس با مطالعه بافت شناسی و Real time-PCR نشان دادند که استئوپوروز به طور معنی داری حجم استخوان ترابکولار، حجم کل مغز استخوان و تعداد استئوسیت و استئوبلاست را در مقایسه با گروه سالم کاهش داد. هم چنین افزایش معنی داری در حجم استخوان کورتیکال و تعداد استئوکلاست در مقایسه با گروه سالم وجود داشت. آنالیز Real time-PCR هیچ اختلاف معنی داری را از نظر بیان ژن‌های BMP-2،IGF-I،TGF-ß و کلاژن نوع یک بین گروه های مورد مطالعه نشان نداد(۲۵).

فاوارو پاپپی و همکاران در سال ۲۰۱۱ میلادی تاثیر لیزر کم توان را بر نقص جزئی استخوان تیبیا مورد بررسی قرار دادند. حیوانات در روزهای ۷، ۱۳ و ۲۵ بعد از جراحی قربانی شدند. نتایج بافت شناسی، بافت همبند پر عروق و رسوب بافت استخوانی اولیه را در گروه لیزر در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. نتایج Real-time PCR افزایش بیان Runx2 را در روز ۲۵ بعد از جراحی آشکار ساخت. نتیجه گیری این بود که تیمار با لیزر اثرات بافت شناسی و بیان ژن های استئوژنیک را عمدتاً در مراحل آخر ترمیم نشان می دهد(۲۶).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

پارک وکانگ تاثیر لیزر دیـــــود 980 GaAlAs نانومتر, 0.01 W, 60 secs, 13.95 J/cm^2 را در ترمیم حفرات دندانی برداشته شده در موش های صحرایی سالم و دیابتی در روزهای ۳، ۵، ۷ و ۱۴ بعد از جراحی ارزیابی کردند. مطالعه بافت شناسی و RT- PCR نشان داد که در موش های صحرایی دیابتی تشکیل استخوان در مقایسه با سایر گروه ها در روز ۱۴ پایین تر بود. تشکیل استخوان در موش های تحت تابش لیزر بیشتر از گروه کنترل بود. میزان بیان RUNX2 در موش های صحرایی دیابتی تحت تابش لیزر نسبت به گروه کنترل دیابتی در روزهای ۵، ۷، و ۱۴ به طور قابل توجهی بالاتر بود. میزان بیان استئوکلسین در همه گروه های مطالعه به جز کنترل دیابتی افزایش داشت. هم چنین میزان بیان استئوکلسین در گروه تیمار نسبت به کنترل سالم در روز ۳ بالاتر بود(۲۷).

پیوا مگری و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی تاثیر لیزر کم توان را بر ترمیم نقص استخوانی تیـــــبیا در موش های صحرایی دیابتی بررسی کردند. این تحقیق شامل یک گروه کنترل به همراه سه گروه لیزر با دوزهای ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ J/cm^2 بود. موش ها در روزهای ۱۵ و ۳۰ بعد از جراحی قربانی شدند. ایمونوهیستوشیمی افزایش RUNX2 و کاهش RANKL را در گروه های لیزر در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ۲۸). این در حالی است که نتایج Real-time PCR تحقیق حاضر نشان داد که از نظر بیان Rankl اختلافی بین گروه ها وجود ندارد اما از نظر بیان Runx2 و Osteocalcin بین گروه لیزر+آلندرونیت دیابتـــــی با دیگر گروه هـــا اختلاف معنی داری مشاهده شد. به طورکلی بیشتر مطالعات انجام شده بیانگر تاثیر مثبت لیزر بر ژن های دخیل در استخوان سازی می باشد.

هم چنین بکریکلی و همکاران پروفایل های ژنی مرتبط با استئوژنز و استئوکلاستوژنز را در استخوان اسفنجی افراد جوان و پیر مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که بیان RUNX-2 و استئوکلسین به طور قابل توجهی در استخوان اسفنجی جوان در مقایسه با افراد مسن افزایش بیان پیدا کرد(۲۹).

علت بی اثر بودن لیزر کم توان ضربانی به تنهایی بر موش های دیابتـــیک استـــئوپوروتیک را این طور می توان توجیه کرد که مدل دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین و اوارکتومی دو طرفه که در مطالعه حاضر استفاده شده به اندازه ای عمیق بوده که بافت استخوانی استئوپوروتیک قادر به پاسخ صحیح به اثر بیواستیمولیتوری لیزر کم توان ضربانی یا آلندرونیت به تنهایی نبوده است. از طرف دیگر دوز انتخاب شده بر اساس مطالعه ای بود که افزایش استحکام استخوان را در موش های سالم(۳۰) نشان داد. هم چنین اثر لیزر بر بافت به صورت موضعی بوده در حالی که بیماری های دیابت و استئوپوروز بیماری هایی سیستمیک هستند.

نتایج این تحـــقیق نـــشان داد که مدل حیوانی STZ-D استفاده شده در این تحقیق، دارای یک اثر منفی بر ترمیم نقص استخوانی جزئی تیبیا بود. علاوه بر این، تیمار ترکیبی لیـــزر و آلندرونیت باعث افزایش معنی دار در ترمیم نقص استخوانی جزئی در ارتباط با افزایش بیان Runx2 و Osteocalcin در مقایسه با دیگر گروه ها می شود. اگر چه لیزر کم توان ضربانی اثر استئوژنیک دارد ولی به علت هم زمانی دیابت، نقص استخوانی و پوکی استخوان ناشی از اوارکتومی، تحقیقات بیشتری در مورد یک عامل ضد پوکی دیگر یا داربست استخوانی لازم است. هم چنین پیشنهاد می شود تاثیر لیزر در چند دوره زمانی و یا کـــاربرد هـــم زمان با سلول های بنیادی مزانشـــیمی مغز استخوان در محل نقص، مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری

با تشکر از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که شرایط لازم برای اجرای این تحقیق را فراهم نمود هم چنین از غزال قریشی به خاطر همکاری در انجام این مطالعه قدردانی می شود.

کد اخلاق: ۱۳۲۳۷-۹۱-۱-۱۳۹۳-۱۰۳۹۷ (کـــمـــیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکـــــی شـــهید بهشتی)

References

1.Funci A, Kasper D, Hause S, Jameson L, Loscalzo J. Harrisons principles of internal medicine part 16 endocrinology and metabolism. 1th ed.Translated by Sobhanian

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

S, Nakhjavani M. Tehran Arjomand Publication. 2008; P.151-8.
2.Azizi F, Larijani B, Hosseinpanah F. Endocrine disorders. 1th ed. Tehran Res Inst Endocrine Sci Publication. 2005; P.132-9.
3.Lane NE. Epidemiology etiology and diagnosis of osteoporosis. Am J Obste Gynecol2006;194: 3-11.doi.10.1016/j.ajog. 2005.08.047
4.Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. New horizon in osteoporosis. Lancet 2011; 377:1276-87. doi.10.1016/S0140-6736(10)62349-5
5.WHO assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843, Geneva, Switzerland 1994.
6. Sànchezriera L, Wilson N, Kamalaraj N, Nolla JM, Kok C, Li Y, et al. Osteoporosis and fragility fractures. Best Pract Res Clin Rheumatol 2010;24:793-810.doi.10.1016/j.berh.2010.10.003
7.Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. World J Diabete 2011;2:41-8. doi.10.4239/wjd.v2.i3.41
8. Hamann C, Kirschner S, Gunther KP, Hofbauer LC. Bone sweet bone osteoporotic fractures in diabetes mellitus. Nature Rev Endocrinol2012;8:297-305.
9. Khan TS, Fraser LA. Type 1 Diabetes and osteoporosis from molecular pathways to bone phenotype. J Osteoporos 2015;2:231-6. doi.10.1155/2015/174186
10.Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low intensity lasers in biology and medicine. J Clin Lase Med Surg 2004;22:141-50. doi.10.1089/104454704774076208
11.Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low energy laser irradiation on the process of bone repair in the Rat tibia. Bone 1995;16:47-55.doi.10.1016/8756-3282(95)80010-N.
12.Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. Photomed Lase Therap2005;23:161-6.doi.10.1089/ pho. 2005. 23.161
13.Renno ACM, de Moura FM, dos Santos NSA, Tirico RP, Bossini PS, Parizotto NA. The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. Lasers in Medical Science 2006;21(4):202-7.
14. Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, Taboada L, Carroll JD, et al. Effect of pulsing in low level light therapy. Lase Surg Med2010; 42:450-66.doi.10.1002/lsm.20950
15. David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low power Hene laser on fracture healing in Rats. Lase Surg Med 1996;19:458-64.doi.10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:4<458AID
16.Bagi C, Vanmeulen M, Brommage R, Rosen D, Sommer A.The effect of systemically administered rhIGF-I/IGFBP-3 complex on cortical bone strength and structure in ovariectomized Rats. Bone 1995;16:559-65.
17.Javadieh F, Bayat M, Abdi S, Mohsenifar Z, Razi S. The effects of infrared low level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocin induced diabetic Rats. Photomed Lase Surg 2009;27:641-6.doi.10.1089/pho.2008.2370
18.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2 delta CT method. Methods 2001; 25:402-8.doi.10.1006/meth.2001.1262,
19.Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. Bone 2007;40:140-8. doi.10.1016/j.bone.2006.07.026
20.Freidouni M, Nejati H, Salimi M, Bayat M, Amini A, Noruzian M, Asgharie MA, Rezaian M. Evaluating glucocorticoid administration on biomechanical properties of Rats tibial diaphysis. Iranian Red Cres Med J 2015;17:22-7. doi.10.5812/ircmj. 19389
21.Farrier AJC, Sanchezfranco L, Shoaib A, Gulati V, Johnson N, Uzoigwe CE, et al. New anti resorptives and antibody mediated anti resorptive therapy. Bone Joint J 2016; 98:160-5. doi.10.1302/0301-620X.98B2. 36161
22.Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2 dependent bone development. Tis Eng Rev2012; 19:254-63. doi.org/10.1089/ten.teb. 2012.0527

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

23.Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000; 289:1504-8. doi. 10.1126/science.289.5484.1504
24.Patrociniosilva TL, Souza AMF, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes K, et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. Lase Med Sci 2014;29:1357-64.
25.Mohsenifar Z, Fridoni M, Ghatrehsamani M. Evaluation of the effects of pulsed wave LLLT on tibial diaphysis in two rat models of experimental osteoporosis as examined by stereological and real-time PCR gene expression analyses. Lase Med Sci2016; 31:721-32.
26.Favaropípi E, Arakiribeiro D, Uemaribeiro J, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Low level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in Rats. Photomed Lase Surg 2011; 29: 311-7. doi.10.1089/pho.2010.2841
27.Park JJ, Kang KL. Effect of 980nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. Lase Med Sci 2012; 27:223-30.
28. Paivamagri AM, Rossettifernandes K. Assis L, Antalmendes N, Silvasantos ALY, et al. Photobiomodulation and bone healing in diabetic Rats evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. Lase Med Sci 2015;30:1949-57. doi.10.1007/s10103-015-1789-3. Epub 2015 Jul 30.
29.Becerikli M, Jaurich H, Schira J, Schulte M, Dobele C, Wallner C, et al. Age dependent alterations in osteoblast and osteoclast activity in human cancellous bone. J Cell Mole Med 2017; 21:2773-81. doi.10.1111/jcmm.13192
30.Mostafavinia A, Masteri Farahani R, Abbasian M, Vasheghani Farahani M, Fridoni M, et al. Effect of pulsed wave low level laser therapy on tibial complete osteotomy model of fracture healing with an intramedullary fixation. Iran Red Cres Med J 2015;17:32076. doi:10.5812/ircmj.32076. doi. 10.5812/ircmj.32076

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]

Effect of Low-level Laser Therapy on Bone Defect Repair in Diabetic and Osteoporotic Rats using the Real-Time PCR Technique

Mostafavinia A[1], Bayat M[2], Qatreh Samani M[3], Ghoreishi S[4]*

(Received: August 19, 2019 Accepted: June 29, 2020)

Abstract

Introduction: Bone formation is disturbed in type 1 diabetes followed by changes in the bone microstructure. The most important metabolic disorder in diabetes is osteoporosis, which is characterized by bone loss and bone structure degradation. This study aimed to determine the effect of low-power laser on bone defect repair in the experimental model of diabetes and osteoporosis.

Materials & Methods: A total of 30 four-month-old female Wistar rats weighing 190-220 g were selected and randomly divided into six groups, including 1: non-diabetic control (Co.), 2: non-diabetic laser (L.), 3: diabetic control (Co.D.), 4: diabetic laser (L.D.), 5: diabetic alendronate (A.D.), and 6: diabetic laser + alendronate (L.A.D.). Diabetes was induced in groups 3, 4, 5, and 6. All groups underwent ovariectomy and partial bone defect. In the laser group, a low-level laser (890nm, 80 Hz, 1/5J / cm ^{2}) was radiated to 3 points at the defect location. Tibia bones were collected, and Real-time PCR was performed after a month. The data were analyzed using ANOVA. A p-value less than $P<0.05$ was considered statistically significant. *Ethics code:* 13237-91-1-1393-10397

Findings: The t-test showed a significant decrease in tibia bone density in diabetic and osteoporotic rats, compared to the non-diabetic control group. Moreover, analysis of gene expression data (ANOVA, $P<0.05$) revealed a significant difference between the group of diabetic laser + alendronate and other groups in terms of Runx2 gene expression and Osteocalcin.

Discussions & Conclusions: According to the findings, laser therapy combined with alendronate can accelerate the repair of partial bone defect in the experimental model of diabetes and osteoporosis.

Keywords: Low-level laser, Osteoporosis, Partial bone defect, Real-time PCR, Type 1 diabetes

1. Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept of Biology and Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3.Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
4. Dept of Statistics, Faculty of Basic Sciences, University of Qom, Qom, Iran
**Corresponding author Email: a.mostafavinia@gmail.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.40]