

Effect of Resistance Training on Functional and Histopathological Changes in Muscle after Chronic Strain Injury in Elderly Rat

Taher Afshamezhad¹,
Maryam Nourshahi²,
Siavash Parvardeh³

¹ Ph.D Candidate in Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received April 2, 2016 Accepted July 4, 2016)

Abstract

Background and purpose: Repetitive strain injury (RSI) is accompanied by an increase in extracellular matrix (ECM), atrophy, and reduces the muscle power. Resistance training (RT) have potential positive effects on muscle function and morphology in elderly. This research examined the effects of eight week therapeutic resistance training on recovery of pathological changes after 6weeks chronic eccentric contraction.

Materials and methods: Eighteen elderly male Wistar rats were divided into three groups (control, RSI-rest, RSI-RT). Two experimental groups underwent 6weeks (5 days/week) of fast velocity submaximal eccentric contractions while the control group was inactive. After two weeks rest, RSI-RT group performed 8 weeks resistance training and RSI-rest group was detrained for 8 weeks. Gastrocnemius muscle response was assessed by isometric force and muscle wet mass. Quantitative histopathological analysis was also done in all groups.

Results: Gastrocnemius tissue of injured limbs showed increase in ECM and decrease in myofiber area and isometric force after 6 weeks RSI model in RSI-rest group, but muscle wet mass did not change. RT significantly improved isometric force, myofiber area percent but decreased non-contractile area percentage. However, pathological changes after RSI were not fully recovered by RT.

Conclusion: Therapeutic Resistance training with an emphasis on concentric phase, low velocity and adequate rest can attenuate functional and histopathological changes in muscle after chronic strain injury in elderly rats.

Keywords: repetitive strain injury, resistance training, muscle strength, histopathological change

تأثیر تمرین مقاومتی بر تغییرات عملکردی و هیستوپاتولوژیکی عضله پس از آسیب استرین مزمن در موش های صحرایی سالمند

طاهر افشارنژاد^۱
مریم نورشاهی^۲
سیاوش پرورده^۳

چکیده

سابقه و هدف: آسیب استرین تکراری (RSI) با افزایش در ماتریکس خارج سلولی (ECM)، آتروفی و کاهش قدرت عضله همراه است. تمرینات قدرتی (RT) اثرات مثبتی بر عملکرد و مورفولوژی عضلات در سالمندان دارد. در این تحقیق اثرات هشت هفته تمرینات مقاومتی درمانی بر ریکاوری تغییرات پاتولوژیکی پس از ۶ هفته انقباض اکستریک تکراری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۱۸ موش صحرایی نر و بیستار سالمند به طور مساوی به سه گروه (کنترل، مدل-استراحت و مدل-تمرین مقاومتی) تقسیم شدند. دو گروه تجربی تحت ۶ هفته (۵ بار در هفته) انقباضات اکستریک زیربیشینه سریع قرار گرفتند و گروه کنترل غیرفعال بود. پس از ۲ هفته استراحت، گروه مدل-تمرین مقاومتی ۸ هفته تمرین مقاومتی انجام داد و گروه مدل-استراحت برای ۸ هفته دیگر استراحت کرد. پاسخ عضله گاستروکنمیوس با اندازه گیری قدرت ایزومتریک، وزن خالص عضله و تحلیل کمی هیستوپاتولوژیکی در همه گروه ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بافت گاستروکنمیوس اندام آسیب دیده، افزایش در ECM و کاهش در ناحیه میوفیبریلی و قدرت ایزومتریک را پس از شش هفته مدل RSI در گروه مدل-استراحت نشان داد، اما وزن عضله بدون تغییر بود. تمرین مقاومتی به طور معنی داری نیروی ایزومتریک و درصد ناحیه میوفیبریلی را بهبود داده و درصد ناحیه غیرانقباضی را کاهش داد ($p < 0.05$). این حال، تغییرات پاتولوژیکی پس از RSI به طور کامل به وسیله تمرین مقاومتی ریکاوری نشد.

استنتاج: تمرینات مقاومتی درمانی با تاکید بر فاز کانستریک، سرعت کم و استراحت کافی می تواند تغییرات عملکردی و هیستوپاتولوژیکی در عضله را پس از آسیب استرین تکراری در موش های سالمند تقلیل دهد.

واژه های کلیدی: آسیب استرین تکراری، تمرین مقاومتی، قدرت عضلانی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی

مقدمه

(WMSD-Work related musculoskeletal disorders)

بخشی مهم از آسیب های شغلی صنعتی را تشکیل می دهد که با ناتوانی طولانی مدت و هزینه های پزشکی بسیاری

در عصر حاضر، افزایش فشارهای شغلی منجر به ایجاد

معضلات جدید بهداشتی و آسیب ها و اختلالات جسمی جدیدی شده است. اختلال عضلانی-اسکلتی مرتبط با شغل

E-mail: afshamezhad@gmail.com

مؤلف مسئول: طاهر افشارنژاد - تهران: ولنجک، بلوار دانشجو، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه شهید بهشتی

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۳/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۴

همراه است و یکی از دلایل اصلی غیبت از محل کار و عدم رضایت شغلی محسوب می‌شود. در بریتانیا قریب به ۵۳۸۰۰۰ نفر در فاصله سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ به این اختلال مبتلا شدند و در نتیجه آن بیش از ۷/۳ میلیون روز کاری از دست رفت (۱). یکی از انواع WMSD که به دلیل ترومای تکراری ناشی از انقباضات اکستریک کم شدت در عصب، عضله، تاندون، لیگامان و حتی استخوان رخ می‌دهد، آسیب استرین تکراری (Repetitive strain injury-RSI) نامیده می‌شود. برهم کنش بین دامنه حرکت، میزان نیرو، تکرار و میزان استراحت در ایجاد این اختلال نقش دارد که در رابطه $I = \frac{N \times F}{A \times R}$ با یکدیگر ارتباط دارند (آسیب (I)، تکرار (N)، نیرو (F)، دامنه حرکتی (A) و استراحت (R). عوامل خارجی مانند پاسچر شغلی (۲) و استرس روانی (۳)، عوامل داخلی دیگر مانند ویژگی‌های عضله، چاقی، پرفشارخونی، بیماری‌های قلبی، بی‌خوابی و افزایش سن نیز نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (۴). سالمندی به دلیل کاهش کارایی ترمیم، کاهش تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای و تغییرات برخی فاکتورهای رشدی می‌تواند به عنوان عاملی خطرزا در RSI مطرح باشد (۵،۶). سالمندان در صورت قرار گرفتن در معرض انقباضات اکستریک تکراری، علاوه بر سارکوپنیای متداول، احتمالاً در معرض اختلالات عملکردی، آتروفی و فیبروزیس تارهای عضلانی نیز قرار می‌گیرند (۷). از این رو این گروه نیاز به توجه بیش‌تری جهت پیشگیری و درمان عوارض RSI دارند. تغییرات تخریبی در عضله، تاندون، التهاب و تخریب میلین در عصب محیطی و حتی نخاع را می‌توان از علل اختلال عملکرد در RSI دانست (۶،۹،۸). در عضلات شواهدی از التهاب، آتروفی، فیبروز و نفوذ چربی درون بافت عضلانی وجود دارد (۱۰) که با اختلال در عملکرد به‌طور کامل همبسته نیست (۱۱). کاهش در توده و سطح مقطع عضله به‌ویژه در عضلات دارای تارهای کند انقباض، به همراه افزایش در سطوح پروتئین‌های مرتبط با آتروفی و کاهش تراگرهای هایپر تروفی پس از

RSI مشاهده شده است (۱۲،۱۳). از طرف دیگر افزایش ماتریکس خارج سلولی و فیبروز عضلانی که ناشی از تغییر سنتز کلاژن نوع I و افزایش غیرطبیعی سایتوکاین‌های التهابی، پروتئین‌های فیروتیک مانند میوآستاتین، CTGF (Connective tissue growth factor) و TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) و تجمع بیش از حد کلسیم و متعاقب آن شکستن پروتئین آلفاکتینین و دسمین، می‌تواند منجر به کاهش سلول‌های ماهواره‌ای و قابلیت ترمیم در تارهای عضلانی گردد (۱۰،۱۴). زمانی که RSI در افراد سالمند رخ دهد، اثرات تخریبی آن تشدید می‌گردد (۷،۱۵). شواهد آزمایشگاهی و کلینیکی مویند این هستند که این تغییرات تخریبی اغلب نسبت به درمان مقاومت نشان می‌دهند و عوارض آن با استراحت به تنهایی بهبود نیافته و یا به‌کندی و به‌صورت ناقص التیام می‌یابد (۱۶). از این‌رو پیشگیری و یافتن روش‌های درمانی نوین جهت کاهش عوارض ناشی از RSI امری بدیهی به نظر می‌رسد. راهکارها و مدالیته‌های مختلفی جهت کاهش عوارض RSI پیشنهاد شده که شامل استراحت، انواع داروها به‌ویژه ضد التهاب‌ها و بازدارنده‌های خانواده TGF- β ، تزریق فاکتورهای رشدی، تزریق سلول‌های ماهواره‌ای و راه‌کارهای فیزیکی مانند لیزر کم‌توان و تمرین درمانی می‌باشد. تمرین مقاومتی روشی است که به‌طور بالقوه قادر به کاهش عوارض آسیب استرین مزمن و پیامدهای آن است. Silverstein و Clark (۲۰۰۴) در تحقیق مروری گسترده خود نتیجه گرفتند که در بین روش‌های مختلف پیشگیری و درمان WMSD، تنها بر سر اثرات مثبت تمرین توافق نسبی وجود دارد (۱۷). تمرین مقاومتی علاوه بر افزایش هایپر تروفی، افزایش در سطوح فاکتورهای رشدی را نیز به همراه دارد (۱۸) که می‌تواند به‌طور بالقوه موجب بهبودی فرآیند ترمیم شود. از سوی دیگر تمرین مقاومتی به‌عنوان محرک مکانیکی - کششی می‌تواند از طریق غشاء پایه و بیان اینتگرین و لامینین بر فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای اثرگذار باشد. تمرین

مقاومتی می‌تواند منجر به کاهش سطوح میوآستاتین سرم و گیرنده‌های آن در بافت عضلانی به ویژه در افراد سالمند گردد که به نوبه خود می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از فیروز به همراه داشته باشد (۲۰،۱۹). هم‌چنین به دلیل ماهیت خسته‌کننده و شباهت حرکات تکراری به تمرین استقامتی در بیماران WMSD، محققین تمرین قدرتی را مناسب‌تر دانستند (۱۷). کاهش سرعت فاز اکستنریک، افزایش مدت زمان استراحت، اضافه بار تدریجی و تاکید بر فاز کانستریک تمرین مقاومتی می‌تواند سازگاری‌های بلقوه‌ای در جهت بهبود عوارض RSI ایجاد کند. برخی محققان نشان دادند که استرین عضلانی تکراری با سرعت زیاد می‌تواند منجر به آتروفی، میوپاتی فیبروتیک با افزایش بافت‌های غیرانقباضی شود، در حالی که سرعت کم، موجب ایجاد سازگاری و هایپروفی می‌شود (۲۱،۱۲). هم‌چنین با افزایش مدت زمان استراحت بین انقباضات می‌توان تا حد زیادی از کاهش نیروی تولیدی و تغییرات تخریبی پاتولوژیکی در بافت عضله کاست (۲۲). از سوی دیگر نوع انقباض می‌تواند بر تغییر تخریبی بافت عضلانی ناشی از حرکات تکراری اثرگذار باشد، به طوری که فیروز پس از تمرین ایزومتریک و اکستنریک افزایش پیدا کرد، اما تمرین کانستریک اثری بر آن نداشت (۲۳). از این رو شاید بتوان با استفاده از یک پروتکل تمرینی جدید با افزایش مدت زمان استراحت، کاهش سرعت و تاکید بر اثرات مفید فاز کانستریک، برای بهبود و ریکاوری بافت تخریب شده استفاده کرد. از این رو هدف کلی این تحقیق یافتن رویکرد تمرینی نوینی جهت بهبود ترمیم، بازگرداندن عملکرد نرمال بافت عضلانی و معکوس نمودن فرآیند فیروز با استفاده از مدل حیوانی آسیب استرین تکراری می‌باشد. نتایج این تحقیق و برنامه تمرینی پیشنهادی می‌تواند مقدمه‌ای برای تمرین درمانی افراد مسن مبتلا به آسیب استرین تکراری باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی بوده و به شکل آزمایشگاهی

اجرا شده است. تعداد ۱۸ راس موش صحرایی نر ویستار که در شروع پژوهش در مراحل ابتدایی سالمندی قرار داشتند (با سن ۲۰ تا ۲۲ ماه در شروع پژوهش)، برای اجرای این پژوهش از فارم حیوانات دانشکده داروسازی (فارما کولوژی) دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شدند. تعداد نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار G Power و با مفروضه‌های به دست آمده از تحقیق اولیه، ۱۸ سر انتخاب شد. این موش‌ها در طول پژوهش در شرایط استاندارد نگهداری در قفس‌های بزرگ (سه الی ۴ تایی) و دسترسی آزادانه به آب و غذا در فارم مخصوص قرار داشتند. این موش‌ها به صورت تصادفی هدفدار به سه گروه پژوهشی (همتاسازی براساس سن) تقسیم شدند. گروه کنترل (CTL) شامل ۶ راس موش که در مجموع ۱۶ هفته از تحقیق، تحت مدالیته خاصی قرار نگرفتند. دو گروه ۶ تایی از موش‌ها تحت ۶ هفته، مدل آسیب استرین تکراری قرار گرفتند. یکی از این گروه‌ها پس از اجرای مدل آسیب، بدون اجرای هیچ گونه مداخله، ۱۰ هفته استراحت کرد. گروه دیگر از موش‌های گروه مدل RSI، پس از دو هفته استراحت پس از آسیب، تحت ۸ هفته تمرین مقاومتی قرار گرفت. برای اجرای پروتکل آسیب تکراری موش‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی داروی ترکیبی کتامین-زایلوزین (۱۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن- با نسبت یک به نه کتامین به زایلوزین) بی‌هوش شدند. در صورت نیاز، ۵ الی ۱۰ میلی‌گرم دوز اضافه در حین کار تزریق می‌شد.

پروتکل آسیب استرین تکراری

برای اعمال آسیب، بر اساس پیشنهادات مطالعات پیشین، دستگاه جدیدی طراحی و ساخته شد (۲۱،۱۲). این دستگاه هم‌قادر به اعمال آسیب تکراری روی جوندگان و هم‌قادر به تعیین حداکثر انقباض اجباری آن‌ها جهت اندازه‌گیری نیروی بیشینه تولیدی توسط آن‌ها می‌باشد. این دستگاه شامل یک تخت کوچک قابل تنظیم برای حیوان بود که در کنار آن یک پلاتفرم متصل به سنسور

لودسل حساس بر روی دو پایه قابل تنظیم قرار داشت. در این پژوهش، برای ایجاد آسیب از تحریک الکتریکی مستقیم عضلانی طبق راهنمای پژوهش‌های پیشین استفاده شد (۲۱). برای ایجاد آسیب ناشی از استرین تکراری از تکرارهای زیاد، سرعت بالا، استراحت کوتاه و میزان نیرو متوسط استفاده شد. برای آماده‌سازی جهت تحریک، ابتدا موهای اطراف ناحیه تحریک و اطراف آن توسط ماشین کوتاه شده و سپس توسط الکل تمیز شد. حیوان ابتدا بیهوش شده و پس از آماده‌سازی روی تخت قرار می‌گرفت. الکترودها همراه با ژل هادی روی پای راست موش‌ها ثابت می‌شد. برای ایجاد انقباض زیر بیشینه تحریک با پالس ۰/۲ میلی‌ثانیه در ۷۰ هرتز و با شدت ۴۰ ولت اعمال شد. قبل از تحریک، مچ پای موش‌ها در ۱۴۰ درجه پلاننار فلکشن ثابت شده و با شروع انقباض از طریق چرخش اهرم به ۴۰ درجه می‌رسید. این حرکت موجب ایجاد انقباض اکستریک در عضلات سه سر ساقی می‌شد. سپس دوباره پای حیوان به سرعت به وضعیت قبل برگردانده می‌شد. مدت زمان هر چرخه در حدود ۰/۴ الی ۰/۵ ثانیه بود و هر ست معمولاً ۴ تا ۵ ثانیه طول می‌کشید. با عنایت به فاز اکستریک و برگشت، میزان سرعت انقباض اکستریک بین ۱۸۰ تا ۲۲۵ درجه بر ثانیه بود. برای هماهنگی جهت ایجاد انقباض از کرومومتر و مترونوم استفاده گردید. بین ست‌ها نیز ۳۰ ثانیه استراحت در نظر گرفته شده بود. هر جلسه تمرین شامل ۵ ست با ۱۰ تکرار از این چرخه بود و برنامه شامل ۵ جلسه اعمال مدالیته در هفته به مدت ۶ هفته بود (۲۱).

پروتکل تمرین مقاومتی

تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص با شیب ۸۰ درجه و با بستن وزنه ثابت شده به دم موش برای اضافه بار می‌باشد. در این مورد از نردبانی به ابعاد ۱۸×۱۱۰ سانتی متر با دو سانتی متر فاصله بین پله‌ها و یک محفظه استراحت در قسمت بالای آن استفاده شد. این ابعاد امکان آن جام ۸ تا ۱۲ حرکت

دینامیک را به موش می‌داد. وزنه متصل به یک طناب باریک با چسب نواری و باند، به انتهای دم (۲ تا ۳ سانتی متر پایین تر از ابتدای دم) موش‌ها بسته شده و اضافه بار را اعمال می‌کرد. وزنه شامل کیسه‌های محتوی وزنه‌های سربی کوچک بود که قابل تنظیم با وزن هدف بود. در جلسه اول، ابتدا هر موش به مدت ۲ دقیقه در محفظه بالای نردبان برای اطمینان از بی‌خطر بودن آن گذاشته می‌شد. پس از اطمینان از صحت اتصال هر موش، ابتدا در پایین نردبان و پس از آن در وسط نردبان قرار داده شده و با نحوه بالا رفتن از آن آشنا می‌شد. در صورت نیاز، از ضربات خفیف یک خط کش به دم موش‌ها برای تحریک شروع حرکت استفاده می‌شد. برای آشنا شدن با نردبان و بالا رفتن آن سه روز زمان صرف شد.

جلسه اول تمرین با دنر نظر گرفتن وزنه‌ای به میزان ۵۰ درصد وزن موش به عنوان وزنه هدف انتخاب شد و ۴ تا ۸ تکرار از آن انجام شد. در جلسه بعدی، یک وزنه ۲۰ گرمی به این وزنه اضافه شده و تمرین دوباره تکرار شد. در صورت بالا رفتن موش تا انتهای نردبان، وزنه ۲۰ گرمی بعدی اضافه می‌شد و این فرآیند تا زمانی که موش دیگر قادر به بالا رفتن کامل از نردبان نباشد، ادامه یافت. این وزنه به عنوان یک تکرار بیشینه موش در نظر گرفته شد. در جلسه بعدی، به ترتیب ۵۰، ۶۵، ۷۵، ۸۵ و ۹۵ درصد وزنه مورد نظر برای ۶ تکرار تمرینی استفاده شد. در جلسه چهارم تمرین، ۲۰ گرم اضافه بار به وزنه قبلی اضافه شده و تمرین با همان تکرارهای قبلی و وزنه جدید اجرا شد و این فرآیند تا انتهای ۸ هفته تمرین ادامه یافت. پس از بالا رفتن موش از نردبان و رسیدن به محفظه برای مدت ۱۸۰ ثانیه در آن استراحت می‌کرد. اگر موش‌ها نمی‌توانستند به مدت ۲۰-۱۰ ثانیه به بالای نردبان بروند و یا قادر به بالا رفتن نبودند، تمرین متوقف می‌شد.

ابزار اندازه‌گیری

برای اندازه‌گیری نیروی اجباری، پس از بیهوشی موش‌ها روی تخت خوابانده شده و زانوی آن‌ها در

حالت کشیده در یک گیره ثابت شده و کف پا با چسب دوطرفه به پلاتفرم دوار متصل به گونیامتر چسبانده شد. مچ پای آن‌ها در حالت ۹۰ درجه گونیامتر ثابت شد. پس از آماده سازی، دو ناحیه تحریک واقع در شکم عضله گاستروکنمیوس و بالای تاندون آشیل با ژل هادی پوشانده شد. دو الکتروود محقق ساخته، طبق دستورالعمل پژوهش‌های پیشین (۲۱)، روی ناحیه مذکور از پای راست موش‌ها فیکس شد. محل الکتروودها به‌طور دقیق برای تکرارپذیری علامت گذاری شده بود. در این حالت، تحریک با پالس ۰/۶ میلی ثانیه در ۱۲۰ هرتز و با شدت ۷۰ ولت اعمال شد. این تحریک موجب ایجاد انقباض ایزومتریک بی‌شینه در عضلات سه سر ساقی می‌شد. نیروی اعمال شده توسط این عضلات - به عنوان نیروی وارد شده توسط پنجه و کف پای آن‌ها - توسط سنسور لودسل دریافت شده و میزان میانگین و حداکثر آن در مقیاس نیوتن پس از تقویت در یک نمایشگر نشان داده می‌شد و به صورت خودکار ذخیره می‌گردید. این سیستم دارای قابلیت کالیبراسیون بود و قبلاً تا حد ممکن خطی شده بود. برای هر بار اندازه‌گیری، دو انقباض با فاصله استراحت یک دقیقه اعمال شد (۲۱).

بسیار حساس وزن عضلات، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای پیش آماده‌سازی بافت و تثبیت بهتر، بافت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در فرمالین نرمال ۱۰ درصد نگه داشته شدند. نمونه‌های بافتی ۳ میلی‌متری به صورت عرضی از نقطه میانه عضله گاستروکنمیوس داخلی و خارجی برش داده شدند. پس از آن بافت‌ها به درون دستگاه تیشو پروسسور منتقل شده و طبق پروتکل استاندارد برای عضله فرآوری شدند. در نهایت این نمونه‌ها روی کاست مخصوص پارافین و جامد شدند. برای تحلیل مورفولوژیکی از برش‌های ۵ میکرومتری توسط دستگاه میکروتوم استفاده شد که پس از شناوری در دستگاه تیشوفلوت، روی لام شیشه‌ای قرار داده شد. از هر نمونه، تعداد ۳ برش به عنوان نمونه در تجزیه و تحلیل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این نمونه‌ها سپس طبق دستورالعمل استاندارد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین (H&E)، رنگ‌آمیزی شدند. پس از بررسی اولیه توسط متخصص، از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) عکس تهیه شد و تغییرات بافتی توسط نرم‌افزار Image J. نسخه ۱/۵ نهایی مورد تجزیه و تحلیل کمی قرار گرفت (۲۶-۲۴).

تحلیل هیستوپاتولوژیکی

پس از بیهوش کردن موش‌ها با داروی ترکیبی کتامین - زایلوزین (۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با نسبت ۱ به ۹)، موش‌ها مورد جراحی قرار گرفتند. برای جلوگیری از تغییر شکل، بافت ابتدا پرفیوز از طریق ترانس کاردیال با سرم فیزیولوژیک تا زمانی که رنگ خون کاملاً شفاف شود، ادامه یافت. سپس به‌طور متوسط میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر فرمالین نرمال ۱۰ درصد از طریق ترانس کاردیال به درون بافت‌های حیوان انتقال یافت، به طوری که پس از لرزش حیوان، بافت‌های آن به حالت کاملاً سفت در آمدند. پس از آن عضلات گاستروکنمیوس به دقت دایسکت شده و چربی و بافت همبند اطراف آن جدا شد و روی ترازوی آزمایشگاهی

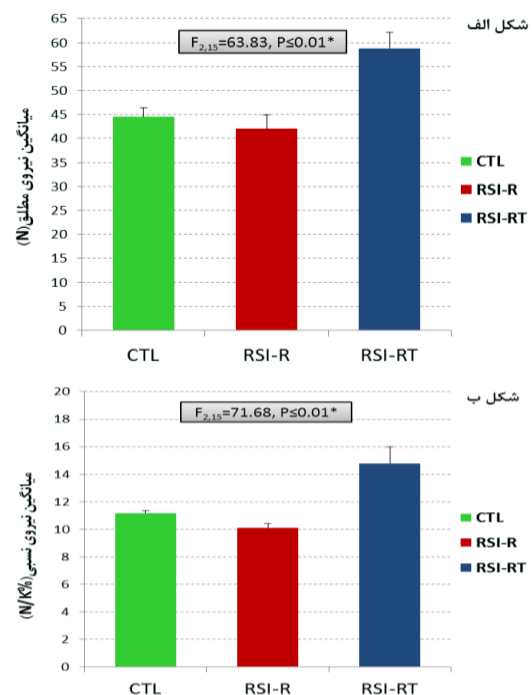
تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی اطلاعات توصیفی از شاخص‌های میانگین و انحراف استاندارد در قالب جدول و نمودار استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل استنباطی از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. پیش از آن، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف یک گروهی و برابری واریانس با استفاده از آزمون لوین مورد تایید قرار گرفتند ($p > 0.05$). در صورت معنی‌داری، جهت آزمون تعقیبی از توکی استفاده گردید. سطح معنی‌داری در این پژوهش ۰/۰۵ انتخاب شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده گردید.

یافته ها

نیروی تولیدی عضلات سه سر ساقی

نمودار زیر تفاوت نیروی مطلق و نیروی نسبی (نیروی نسبت به وزن بدن) پلانتر فلکشن عضلات سه سر ساقی در سه گروه آسیب استرین تکراری-استراحت (RSI-R) و گروه آسیب استرین تکراری-تمرین مقاومتی (RSI-RT) و گروه کنترل (CTL) را نشان می دهد.



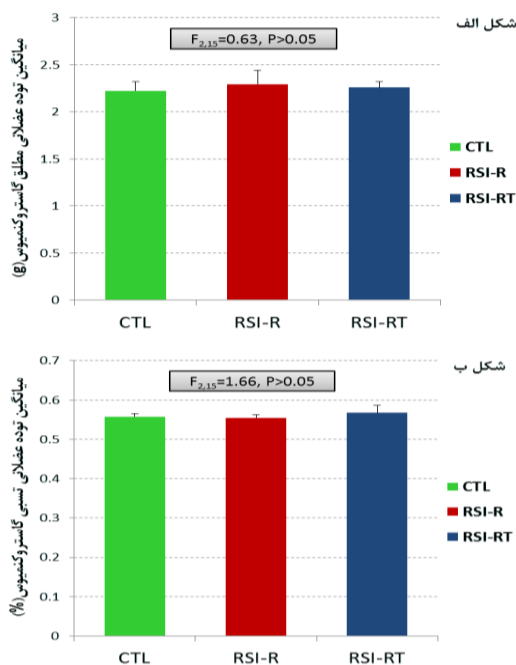
نمودار شماره ۱: تفاوت گروه‌های تحقیق در نیروی مطلق (نمودار الف) و نیروی نسبی (نمودار ب) تولیدی توسط عضلات سه سر ساقی (N نیوتن، Kg کیلوگرم)

بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، میزان نیروی مطلق عضلات پلانتر فلکسور گروه RSI-RT به طور معنی داری بیش از گروه RSI-R ($p<0.05, d=14/33$) و گروه CTL ($p<0.001, d=16/83$) می باشد. اما بین دو گروه RSI-R و CTL تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p>0.05$). میزان نیروی نسبی نیز در گروه RSI-RT به طور معنی داری بیش از گروه RSI-R ($p<0.001, d=4/68$) و گروه CTL ($p<0.001, d=3/63$) می باشد. میزان نیروی نسبی گروه کنترل نیز به طور معنی دار بیش از گروه RSI-R می باشد ($p<0.05, d=1/05$). قدرت عضلانی نسبی

در گروه آسیب استرین تکراری-تمرین مقاومتی به میزان ۴۶/۳ درصد نسبت به گروه آسیب استرین تکراری-استراحت و به میزان ۳۲/۵ درصد نسبت به گروه کنترل بهبود یافت.

توده عضلات گاستروکنمیوس

نمودار شماره ۲- الف و ب، میزان مطلق توده عضلانی گاستروکنمیوس راست و چپ و میزان نسبی آن‌ها نسبت به وزن بدن را در سه گروه نشان می دهد.



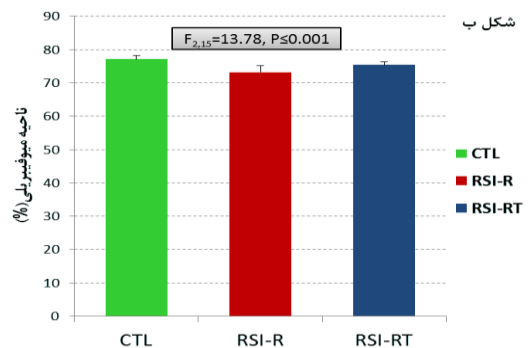
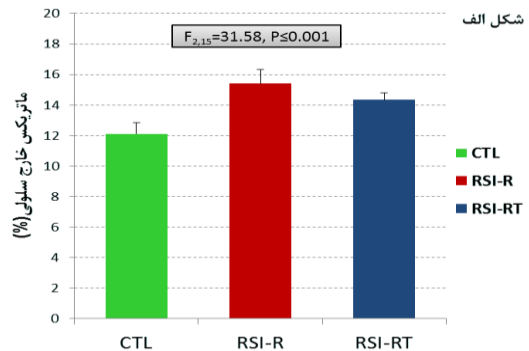
نمودار شماره ۲: تفاوت سه گروه آسیب استرین تکراری-استراحت (RSI-R)، گروه آسیب استرین تکراری-تمرین مقاومتی (RSI-RT) و گروه کنترل (CTL) در میزان مطلق (نمودار الف) و میزان نسبی (نمودار ب) توده عضلانی گاستروکنمیوس راست (g گرم)

همان طور که در نمودار شماره ۲- الف و ب ملاحظه می گردد، بین میزان توده عضلانی مطلق گاستروکنمیوس راست و هم میزان نسبی آن به وزن بدن در موش‌های هر سه گروه تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود ($p>0.05$).

یافته های هیستوپاتولوژی

نمودار شماره ۳- الف و ب، درصد ماتریکس خارج

سلولی و درصد ناحیه میوفیبریلی گاستروکنمیوس راست را در گروه های تحقیق نشان می دهد.

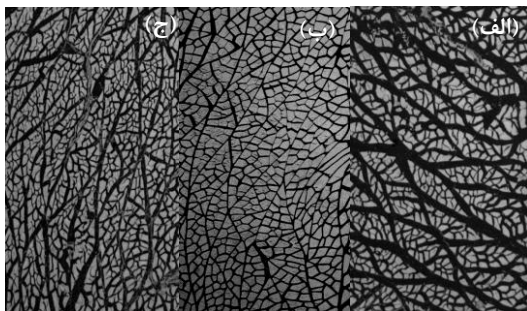


نمودار شماره ۳: تفاوت سه گروه آسیب استرین تکراری - استراحت (RSI-R)، گروه آسیب استرین تکراری - تمرین مقاومتی (RSI-RT) و گروه کنترل (CTL) در درصد ناحیه ماتریکس خارج سلولی (نمودار الف) و درصد ناحیه میوفیبریلی (نمودار ب) گاستروکنمیوس راست

براساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، درصد ناحیه ماتریکس خارج سلولی عضله گروه CTL به طور معنی داری کم تر از گروه RSI-R ($p \leq 0.001$, $d=3/29$) و گروه RSI-RT ($p \leq 0.001$, $d=2/24$) می باشد. اما بین دو گروه RSI-RT و RSI-R تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p=0/05$, $d=1/04$). هم چنین درصد ناحیه میوفیبریلی نیز در گروه RSI-R به طور معنی داری کم تر از گروه RSI-RT ($p \leq 0/05$, $d=2/19$) و گروه CTL ($d=3/88$) می باشد. اما بین درصد ناحیه میوفیبریلی گروه کنترل با گروه RSI-RT تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p > 0/05$).

همان طور که در تصویر شماره ۱ مشاهده می شود، در گروه آسیب استرین تکراری - استراحت (RSI-R) به

ترتیب میزان ماتریکس خارج سلولی و درصد ناحیه میوفیبریلی در مقایسه با موش های گروه کنترل (CTL) به طور میانگین به میزان ۲۷/۲ درصد افزایش و ۵ درصد کاهش را نشان می دهد. ماتریکس خارج سلولی پس از اعمال هشت هفته تمرین مقاومتی در گروه RSI-RT نیز به میزان ۱۸/۶ درصد بیش از گروه کنترل می باشد، اما نسبت به گروه RSI-R کاهش ۶/۸ درصدی را نشان می دهد. هم چنین در گروه RSI-RT، درصد ناحیه میوفیبریلی به میزان ۳ درصد بهبودی را در مقایسه با گروه RSI-R نشان داد، اما هم چنان به میزان ۲/۱ درصد کم تر از گروه کنترل می باشد.



تصویر شماره ۱: بافت عضلانی گاستروکنمیوس راست با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین به رنگ خاکستری میوفیبریلی و نواحی به رنگ سیاه ماتریکس خارج سلولی می باشد (شکل الف) - نمونه گروه CTL، شکل (ب) - نمونه گروه RSI-R و شکل (ج) - نمونه گروه RSI-RT

بحث

یافته های تحقیق حاضر نشان داد که آن جام انقباض اکستریک تکراری و با سرعت بالا به مدت ۶ هفته می تواند منجر به کاهش قدرت، افزایش ماتریکس خارج سلولی و کاهش ناحیه میوفیبریلی در عضلات گاستروکنمیوس موش های سالمند شود. این تغییرات حتی پس از ۱۰ هفته استراحت مشاهده می شوند. این یافته ها همسو با یافته های پژوهش های حیوانی (۲۷،۲۲) و کار آزمایشی های بالینی روی نمونه های انسانی می باشد (۱۱). برخی تحقیقات کاهش نیرو، کاهش در ناحیه میوفیبریلی و افزایش در ماتریکس خارج سلولی را در گاستروکنمیوس

گزارش کردند (۲۹،۲۸). اما وزن عضله و نیرو در برخی پژوهش‌ها بدون تغییر بود (۲۱). با این حال، تغییرات تخریبی در برخی پژوهش‌ها گزارش نگردیده است (۱۲). ایجاد فیروز در عضلات به فعال شدن مسیر Smad3 (Phosphorylated SMAD Family Member 3) و خانواده TGF- β نسبت داده می‌شود. افزایش میواستاتین پس از آسیب استرین تکراری نیز علاوه بر تنظیم منفی سلول‌های میوزنیک، در فاز ترمیم می‌تواند موجب جایگزینی این سلول‌ها با سلول‌های فیروژنیک در عضله گردد (۲۱). برخی محققان معتقدند که تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از تجمع بیش از حد کلسیم به دنبال کشش - آسیب عضله است که در برخی بیماری‌های عضلانی هم دیده می‌شود. این کلسیم تجمع یافته سبب نکرز و مرگ سلولی غیرقابل برگشت می‌شود. احتمالاً کالپاین‌ها (Calpain) فعال شده به واسطه تجمع کلسیم درون سلول، منجر به از بین بردن آلفا اکتینین (Alpha-actinin) روی خط Z شده و پروتئین دسمین (Desmin) و نه اکتین و میوزین را تخریب می‌کنند (۲۲). بخشی از این کلسیم تجمع یافته به واسطه نشست سارکولمایی کلسیم ناشی از آسیب و بخش دیگر باز شدن کانال‌های کلسیمی و مبادله کلسیم - سدیم در اثر کشش است. این موضوع با اثرگذاری انقباضات برون‌گرای تکراری روی کاهش استرپتومایسین (Streptomycine) که یک بازدارنده کانال‌های کلسیمی غشایی می‌باشد، مورد تایید قرار گرفته است (۳۰). نتایج تحقیقات هم‌چنین نشان می‌دهد که برخی از تغییرات تخریبی ناشی از آسیب استرین مزمن مانند آتروفی، پس از چند ماه استراحت بهبود می‌یابد. اما افزایش ماتریکس خارج سلولی و کاهش ناحیه میوفیبریلی هنوز کم‌تر از مقادیر پایه بود (۳۱). نتایج تحقیق حاضر نیز مانند گاری اثرات هیستوپاتولوژیکی عضله را پس از استرین مزمن تایید می‌کند. هرچند پروتکل اجرایی و سن موش‌ها، تفاوت‌های اندکی را در میزان این اثرات پاتولوژیکی بین این تحقیقات توجیه می‌کند.

یافته‌های این پژوهش هم‌چنین نشان داد که تمرین مقاومتی به مدت هشت هفته می‌تواند برخی عوارض ناشی از آسیب استرین تکراری مانند کاهش قدرت را به‌طور کامل و برخی دیگر مانند تغییرات هیستوپاتولوژیکی را به‌طور نسبی بهبود دهد. نکته مهم، ریکاوری قدرت عضلانی حتی بیش از مقادیر گروه بدون آسیب، در گروه تمرین مقاومتی علی‌رغم باقی مانده تغییرات هیستوپاتولوژیکی در این گروه می‌باشد. این موضوع می‌تواند دو دلیل داشته باشد: دلیل اول به نوع ارزیابی هیستوپاتولوژیکی بر می‌گردد که در تحقیق حاضر از نسبت نواحی میوفیبریلی و ماتریکس خارج سلولی برای نشان دادن تغییرات هیستوپاتولوژیکی استفاده شد. بنابراین این احتمال وجود دارد که در گروه تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل، افزایش کلی در ناحیه میوفیبریلی همراه هاپیروتروفی عضله رخ داده باشد. دلیل دوم مربوط به سازگاری‌های عصبی متعاقب تمرینات مقاومتی باشد. از آن‌جا که کاهش در نیروی عضله، ارتباط چندانی با تغییرات هیستوپاتولوژیکی و آتروفی پس از انقباضات برون‌گرای مزمن ندارد (۱۱)، بخشی از تغییرات نیروی تولیدی با توده عضلانی مرتبط نیست و احتمالاً به مکانیسم‌های عصبی و مکانیسم زوج تحریک - انقباض مربوط می‌شود (۱۵). به عنوان مثال، تغییرات تخریبی در عصب و نخاع و کاهش در سرعت هدایت عصب به دنبال انقباضات اکستنریک کم شدت گزارش شده است (۸). بنابراین احتمالاً بخشی از این تغییرات تخریبی با تمرین مقاومتی بیش از استراحت التیام می‌یابد. در مورد توجیه یافته‌های مرتبط با تمرین مقاومتی می‌توان چنین برداشت کرد که تمرین قدرتی می‌تواند موجب بهبودی به واسطه کاهش اسپاسم در حالت استراحت و افزایش دانسیته عروقی در عضلات دچار آسیب شود (۳۲). هم‌چنین برخی محققین این بهبودی را به سازگاری‌های متابولیکی نسبت داده‌اند. تمرین مقاومتی می‌تواند میزان ذخیره و اکسیداسیون کربوهیدرات و هموستاز سلولی را در عضلات مبتلا به

سیگنالی بین انسان و حیوانات آزمایشگاهی به وجود آورد که تعمیم نتایج پژوهش‌های حیوانی را بسیار پیچیده کند. تفاوت‌های آناتومیکی و بیومکانیکی بین حیوانات با انسان نیز موجب تفاوت کینماتیک و کنتریک حرکتی شده و چالشی را برای نتایج پژوهش‌های حیوانی ایجاد می‌کند. بنابراین می‌توان گفت این تحقیق می‌تواند به عنوان یک تحقیق اولیه، مبنایی را برای پژوهش‌های کلینیکی روی بیماران مبتلا به آسیب استرین تکراری فراهم کند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که یافته‌های تحقیق حاضر، تمرین مقاومتی با ویژگی‌هایی نظیر افزایش بار تدریجی، سرعت کم فاز اکستریک و فواصل استراحت بیش تر را در توانبخشی پس از آسیب استرین تکراری در افراد سالمند پیشنهاد می‌کند. یافته‌های تحقیقات آینده می‌تواند بر ویژگی‌های اختصاصی تر این نوع تمرینات درمانی تمرکز کند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات مدیریت محترم گروه فارماکولوژی دانشگاه شهید بهشتی و پرسنل محترم آزمایشگاه این گروه صمیمانه قدردانی کنند.

میالژی بهبود دهد (۳۳). هم‌چنین محتوای سلول‌های ماهواره‌ای پس از تمرین مقاومتی، در تارهای نوع I و II مبتلا به میالژی افزایش می‌یابد (۳۳). علاوه بر افزایش هایپر تروفی و مسیرهای سیگنالینگ آن، افزایش در سطوح فاکتورهای رشدی همراه تمرین مقاومتی در سالمندان نیز نشان داده شده است (۱۸) که می‌تواند به طور بالقوه موجب بهبودی فرآیند ترمیم شود. نیتریک اکساید و $TGF-\beta$ اثرات متضادی بر روند ترمیم آسیب عضلانی دارند. تمرین به عنوان یک مدالیته موثر بر نیتریک اکساید می‌تواند موجب بهبودی در ترمیم تارهای عضلانی و افزایش دانسیته مویرگی و فعالسازی سلول‌های ماهواره در ناحیه آسیب دیده شده شود (۳۵،۳۴). از سوی دیگر، تمرین مقاومتی به عنوان محرک‌های مکانیکی از طریق کشش می‌تواند از طریق غشاء پایه و بیان اینترگرین و لامینین بر فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای اثرگذارند (۲۰،۱۹). این تحقیق علی‌رغم یافتن اثرات مثبت تمرین مقاومتی درمانی، با محدودیت‌هایی روبه‌رو است. استرس مورد استفاده در مدل آسیب استرین تکراری در تحقیق حاضر عملاً هرگز بر انسان وارد نمی‌شود. از این رو احتمال دارد بسیاری از علائم مشاهده شده در این مدل، در پژوهش‌های کلینیکی قابل مشاهده نباشد. از طرف دیگر تفاوت نژادی ممکن است تفاوت‌هایی را در مسیرهای

References

- Schultz G, Mostert K, Rothmann I. Repetitive strain injury among South African employees: The relationship with burnout and work engagement. *Int J Ind Ergon* 2012; 42(5): 449-456.
- Buckle PW, Devereux JJ. The nature of work-related neck and upper limb musculoskeletal disorders. *Appl Ergon* 2002; 33(3): 207-217.
- Sjogaard G, Lundberg U, Kadefors R. The role of muscle activity and mental load in the development of pain and degenerative processes at the muscle cell level during computer work. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83(2-3): 99-105.
- Rechardt M, Shiri R, Matikainen S, Viikari-Juntura E, Karppinen J, Alenius H. Soluble IL-1RII and IL-18 are associated with incipient upper extremity soft tissue disorders. *Cytokine* 2011; 54(2): 149-153.
- Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. *Med Sci Sports*

- Exerc 2010; 42(4): 813-819.
6. Xin DL, Harris MY, Wade CK, Amin M, Barr AE, Barbe MF. Aging enhances serum cytokine response but not task-induced grip strength declines in a rat model of work-related musculoskeletal disorders. *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12: 63.
 7. Johnson C, Miller GR, Baker BA, Hollander M, Kashon ML, Waugh S, et al. Changes in the expression of calcitonin gene-related peptide after exposure to injurious stretch-shortening contractions. *Exp Gerontol* 2016; 79: 1-7.
 8. Lee K, Kouzaki K, Ochi E, Kobayashi K, Tsutaki A, Hiranuma K, et al. Eccentric contractions of gastrocnemius muscle-induced nerve damage in rats. *Muscle Nerve* 2014; 50(1): 87-94.
 9. Kietrys DM, Barr AE, Barbe MF. Exposure to repetitive tasks induces motor changes related to skill acquisition and inflammation in rats. *J Mot Behav* 2011; 43(6): 465-476.
 10. Gao HG, Fisher PW, Lambi AG, Wade CK, Barr-Gillespie AE, Popoff SN, et al. Increased serum and musculotendinous fibrogenic proteins following persistent low-grade inflammation in a rat model of long-term upper extremity overuse. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71875.
 11. Crameri RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, Kjaer M. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol* 2007; 583(Pt 1): 365-380.
 12. Ochi E, Nosaka K, Tsutaki A, Kouzaki K, Nakazato K. Repeated bouts of fast velocity eccentric contractions induce atrophy of gastrocnemius muscle in rats. *J Muscle Res Cell Motil* 2015; 36(4-5): 317-327.
 13. Renström L, Song Y, Stål PS, Forsgren S. TNF-alpha in an Overuse Muscle Model—Relationship to Muscle Fiber Necrosis/Regeneration, the NK-1 Receptor and an Occurrence of Bilateral Involvement. *J Clin Cell Immunol* 2013; 4(2): 1-10.
 14. Abdelmagid SM, Barr AE, Rico M, Amin M, Litvin J, Popoff SN, et al. Performance of repetitive tasks induces decreased grip strength and increased fibrogenic proteins in skeletal muscle: role of force and inflammation. *PLoS One* 2012; 7(5):e38359.
 15. Rader EP, Layner KN, Triscuit AM, Kashon ML, Gu JK, Ensey J, et al. Desensitized morphological and cytokine response after stretch-shortening muscle contractions as a feature of aging in rats. *Exp Gerontol* 2015; 72: 138-149.
 16. Shavlakadze T, McGeachie J, Grounds MD. Delayed but excellent myogenic stem cell response of regenerating geriatric skeletal muscles in mice. *Biogerontology* 2009; 11(3): 363-376.
 17. Silverstein B, Clark R. Interventions to reduce work-related musculoskeletal disorders. *J Electromyogr Kinesiol* 2004; 14(1): 135-152.
 18. Hellyer NJ, Nokleby JJ, Thicke BM, Zhan WZ, Sieck GC, Mantilla CB. Reduced ribosomal protein s6 phosphorylation after progressive resistance exercise in growing adolescent rats. *J Strength Cond Res* 2012; 26(6): 1657-1666.
 19. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2008; 2(1): 22-31.
 20. Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 2010; 224(1): 7-16.

21. Willems ME, Miller GR, Stauber FD, Stauber WT. Effects of repeated lengthening contractions on skeletal muscle adaptations in female rats. *J Physiol Sci* 2010; 60(2): 143-150.
22. Stauber WT, Willems ME. Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscles by long inter-stretch rest times. *Eur J Appl Physiol* 2002; 88(1-2): 94-99.
23. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol* 2007; 582(Pt 3): 1303-1316.
24. Wootton R, Springall D, Polak J. *Image analysis in histology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
25. Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Silva Mde S, et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras* 2012; 27(10): 681-686.
26. Ian C. Quantifying Stained Liver Tissue Area Using ImageJ. [On Line]. Uploaded Mar 21, 2012. YouTube; Google Inc; Available from: https://www.youtube.com/watch?v=M8Eqq_nm4as. Accessed March 2, 2015.
27. Willems ME, Stauber WT. The effect of number of lengthening contractions on rat isometric force production at different frequencies of nerve stimulation. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196(3): 351-356.
28. Ochi E, Hirose T, Hiranuma K, Min SK, Ishii N, Nakazato K. Elevation of myostatin and FOXOs in prolonged muscular impairment induced by eccentric contractions in rat medial gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2010; 108(2): 306-313.
29. Lovering RM, McMillan AB, Gullapalli RP. Location of myofiber damage in skeletal muscle after lengthening contractions. *Muscle Nerve* 2009; 40(4): 589-594.
30. Willems ME, Stauber WT. Streptomycin and EDTA decrease the number of desmin-negative fibers following stretch injury. *Muscle Nerve* 2005; 32(3): 310-315.
31. Stauber WT, Smith CA, Miller GR, Stauber FD. Recovery from 6 weeks of repeated strain injury to rat soleus muscles. *Muscle Nerve*. 2000; 23(12): 1819-1825.
32. Waling K, Sundelin G, Ahlgren C, Jarvholm B. Perceived pain before and after three exercise programs--a controlled clinical trial of women with work-related trapezius myalgia. *Pain* 2000; 85(1-2): 201-207.
33. Sjogaard G, Zebis MK, Kiilerich K, Saltin B, Pilegaard H. Exercise training and work task induced metabolic and stress-related mRNA and protein responses in myalgic muscles. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 984523.
34. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide* 2009; 21(3-4): 157-163.
35. Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, Sakata T, Dial S, et al. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(6): C1487-1494.