

Effect of Spinal Nerve Ligation after Endurance Training on the Gene Expression of MST1 and MAFbx in Plantaris Muscle of Male Wistar Rats

Abdolreza Kazemi¹,
Hadi Kerendi²,
Zohreh Khajepour^{3,4}

¹ Associate Professor, Department of Sports Science, Faculty of Literature and Humanities, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

² PhD in Sport Physiology, Faculty of Literature and Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran

³ MSc in Sport Physiology, Faculty of Literature and Humanities, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

⁴ Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received January 29, 2021 ; Accepted May 8, 2022)

Abstract

Background and purpose: Reduction of muscle mass occurs in some models of muscle atrophy during mechanical unloading status and MST1 and MAFbx genes are believed to have a role. In the present study, the effect of reduced physical activity in the form of spinal nerve ligation (SNL) after a period of endurance training (ET) on the expression of MST1 and MAFbx genes were examined in the rat plantaris muscle.

Materials and methods: In this experimental study, 16 rats were randomly divided into two groups: control-spinal nerve ligation (Sham+SNL) and endurance training-spinal nerve ligation (ET+SNL). Training program continued for six weeks, four sessions a week with moderate intensity (70-60% of VO₂max). To create the SNL model, the rats were first anesthetized with pentobarbitol sodium and then their fifth lumbar spinal nerve was tightly tied. The duration of the SNL protocol was four weeks. After the last day of ligation, the plantaris muscle was extracted. Real-Time PCR was used to measure the mRNA expression of the MST1 and MAFbx.

Results: The expression of MST1 gene showed no significant increase in ET+SNL group compared with Sham+SNL group ($P>0.05$). But, significant increase was seen in MAFbx gene expression in ET+SNL group compared with Sham+SNL group ($P<0.05$).

Conclusion: The study showed that reduced activity in the form of SNL after endurance training can lead to destructive effects on the muscular system and symptoms of muscle atrophy could be seen.

Keywords: SNL, MST1, MAFbx, endurance training

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (209): 1-12 (Persian).

Corresponding Author: Abdolreza Kazemi - Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir)

اثر لیگاسیون عصب نخاعی پس از تمرینات استقامتی بر بیان ژن‌های MST1 و MAFbx عضله پلانترایس موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

عبدالرضا کاظمی¹هادی کرندی²زهره خواجه پور^{3,4}

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به کاهش توده عضلانی در شرایط بی‌باری مکانیکی و نقش ژن‌های MST1 و MAFbx در برخی از مدل‌های آتروفی عضلانی، در پژوهش حاضر اثر کاهش فعالیت بدنی به شکل لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین استقامتی بر بیان این ژن‌ها در عضله پلانترایس موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تعداد 16 سر موش صحرایی به روش تصادفی ساده به دو گروه مساوی تقسیم شدند: (1) گروه کنترل - لیگاسیون عصبی و (2) گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی. مدت برنامه تمرینی، شش هفته و هر هفته چهار جلسه و با شدت متوسط (60-70 درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) بود. جهت ایجاد مدل لیگاسیون عصبی، ابتدا موش‌ها با سدیم پنتوباریتول بیهوش شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها به طور محکم گره زده شد. مدت پروتکل لیگاسیون عصبی، چهار هفته بود. پس از آخرین روز از ایجاد مدل لیگاسیون عصبی، عضله پلانترایس استخراج شد. به منظور اندازه‌گیری بیان mRNA ژن‌های مورد نظر از روش کمی PCR استفاده شد.

یافته‌ها: در بیان ژن MST1 در گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی نسبت به گروه کنترل - لیگاسیون عصبی افزایش معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). در بیان ژن MAFbx در گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی نسبت به گروه کنترل - لیگاسیون عصبی افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$).

استنتاج: یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت کاهش یافته به شکل لیگاسیون عصبی پس از تمرین استقامتی می‌تواند منجر به ایجاد اثرات مخربی بر دستگاه عضلانی و ظهور نشانه‌های آتروفی عضلانی گردد.

واژه‌های کلیدی: MST1، MAFbx، تمرین استقامتی، SNL

مقدمه

توانایی بافت عضلانی در فراهم کردن نیرو و حفظ فعالیت بدنی، برای سلامت انسان و همچنین عملکرد ورزشی بسیار مهم است. عضلات اسکلتی، این قابلیت را دارند که به انواع محرک پاسخ داده و سازگار شوند. کشف مکانیسم‌های مرتبط با سازگاری‌های عضلانی ناشی از فعالیت بدنی، باعث افزایش دانش ما نسبت به نحوه

E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir

مؤلف مسئول: عبدالرضا کاظمی - رفسنجان: میدان امام خمینی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

1. دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران

2. دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

3. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

4. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: 1400/11/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/12/8 تاریخ تصویب: 1401/2/18

عملکرد و سازگاری عضلات اسکلتی به محرک‌های مختلف و همچنین شرایط بیماری‌زا می‌شود (1). توانائی عضله در پاسخ به تمرینات و فعالیت‌های ورزشی (استقامتی، سرعتی، مقاومتی و ...) و همچنین شرایط پاتولوژیک و ایجاد سازگاری‌هایی مانند افزایش تراکم مویرگی و بایورنر میتوکندریایی یا افزایش و کاهش حجم عضلانی نشان از تغییرپذیری گسترده این بافت دارد (2). عضلات اسکلتی در بدن انسان دارای نقش‌ها و وظایف بسیار مهمی مانند تولید نیرو برای حرکت، محل ذخیره گلیکوژن و همچنین حفظ راستای قامت هستند. علاوه بر این، نقش بسیار مهمی در سوخت و ساز بدن انسان دارند و از این طریق می‌توانند بر سلامت انسان موثر باشند (3). فعالیت بدنی و تمرینات ورزشی می‌توانند بر عملکرد عضلات اسکلتی اثرات سودمندی داشته باشند. همچنین سازگاری‌های ناشی از تمرینات ورزشی می‌تواند در پیشگیری و درمان برخی شرایط بیماری‌زا موثر باشند. از سوی دیگر کاهش فعالیت بدنی و بی‌حرکی می‌تواند بر بافت عضلانی تاثیر منفی داشته باشد. چنانچه به مدت طولانی، یک عضو در حالت بی‌حرکت ورزشی باشد، عضلات آن دچار آتروفی می‌شوند. این حالت در برخی شرایط مانند آسیب دیدگی‌های ناشی از صدمات ورزشی و غیرورزشی، زندگی در فضا (4)، عدم ورزش کردن و همچنین در برخی موارد بیماری‌زا مانند کاهش خونرسانی (Decreased blood supply) به بافت عضلانی، سوء تغذیه (Malnutrition) و نیز اختلال در عصب‌دهی (Innervation) به یک عضله ایجاد می‌شود (5، 6). در پژوهش‌های مربوط به فیزیولوژی ورزشی، پژوهشگران به دنبال بهبود تغییرات ایجاد شده در بافت عضلانی ناشی از تمرینات ورزشی و همچنین پیشگیری یا تعدیل اثرات نامطلوب ناشی از کاهش فعالیت بدنی مانند سالمندی، اختلالات عصبی، بی‌تمرینی و یا بی‌حرکی هستند (3). در شرایط آتروفی عضلانی، تخریب بخش‌های پروتئینی عضله بیش از تولید آن‌ها است (7). در این حالت، کیفیت زندگی افراد کاهش می‌یابد، انجام کارهای

روزمره با دشواری همراه است و همچنین احتمال ابتلا به برخی بیماری‌ها مانند پوکی استخوان افزایش می‌یابد. کاهش سطح مقطع تارهای عضلانی و متعاقب آن اختلال در قدرت و همچنین تغییر در ترکیب نوع تار عضلانی از ویژگی‌های بارز آتروفی عضلانی است (8). بافت عضلانی با توجه به بود و نبود فشارهای مکانیکی از طریق تغییر در اندازه عضله، بیان پروتئین‌های انقباضی و غیرانقباضی و تغییرات سوخت و ساز، سازگار می‌شود. در زمان سازگاری‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک، فرآیندهایی در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد تا بتواند تعادل بین سنتز و تجزیه پروتئین را حفظ نمایند (9، 10). این فرایندها به وسیله آبشارهای سیگنالینگ درون سلولی تنظیم می‌شوند. برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که برداشتن بارهای مکانیکی (تعلیق اندام) در مدل‌های حیوانی منجر به تحلیل توده عضلانی و همچنین کاهش در تولید نیرو می‌شود (11، 12). در پژوهش قبلی بیان شد که کاهش فعالیت بدنی به شکل لیگاسیون عصبی با افزایش بیان ژن‌های TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) و MuRF1 (Muscle RING-finger protein-1) (آنزیم‌های تحریک‌کننده تجزیه پروتئین عضلات) همراه است که احتمالاً می‌تواند در تغییر توده عضلانی نیز درگیر باشد و انجام تمرینات تناوبی با شدت بالا پیش از لیگاسیون عصبی، بیان این ژن‌ها را کاهش می‌دهد (13). از سوی دیگر، بارگذاری مجدد، آبخاری از رویدادها شامل آسیب‌های خفیف عضلانی، التهاب، بازسازی و رشد را تحریک کرده که در نهایت موجب بازسازی توده عضلانی می‌شود (11). در هنگام آتروفی عضلانی، سنتز پروتئین به‌طور قابل توجهی به دلیل مهار مسیر IGF-1/PI3K/AKT سرکوب می‌شود (14). تجزیه پروتئین به دلیل فعال شدن مسیرهای یوبیکوئیتین پروتئازوم و اتوفاژی که به طور هماهنگ کار می‌کنند تا پروتئین‌های میوفیبریلی میوسیت‌ها را پاک کنند، اتفاق می‌افتد (15). در نتیجه فعال‌سازی این مسیرها، کاهش سریع توده و عملکرد انقباضی رخ می‌دهد.

MAFbx عضوی از مجموعه پروتئین‌های حاوی Skp1 (S-Phase Kinase Associated Protein 1)، Cullin1 و F-box است که به هم وصل می‌شوند تا فعالیت لیگاز یوبی کوئیتین E3 (E3 Ub-protein) خود را ایجاد کنند. MAFbx نشانگر معتبری برای آتروفی عضلانی است (16). نشان داده شده است که بیان ژن MAFbx و همچنین چند ژن اتوفاژی دیگر، در مراحل اولیه بسیاری از آتروفی‌های عضلانی تنظیم افزایشی می‌یابند (۱۷، ۱۸).

خانواده کیناز شبه Ste20 پستانداران به‌طور گسترده‌ای در بافت‌های مختلفی بیان می‌شوند. کیناز MST1 در شرایط استرسی مختلف شامل فشار اکسایشی و فعال شدن کاسپازها افزایش می‌یابد (19). همچنین در شرایط قطع عصب، MST1 موجب آتروفی عصبی در عضلات تند انقباض می‌گردد. این افزایش در MST1 همراه با افزایش بیان MAFbx و LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) از طریق فعال کردن FOXO3a (Forkhead box O3) است (20).

کاظمی (1397) در بررسی اثر بی‌باری مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های MST1 (Mammalian STE20-like) و MAFbx (Muscle atrophy F-box) در تارهای کند و تند انقباض موش‌های صحرایی و یستار نشان داد که پس از 14 روز تعلیق اندام تحتانی، تنها بیان ژن MST1 افزایش معنی‌داری داشت (21). از سوی دیگر کاهش بیان MAFbx در موش‌های فاقد ژن MST1 مشاهده شده است (20). سازوکار احتمالی در فرآیند آتروفی عضلانی به‌گونه‌ای است که فاکتور رونویسی FOXO3a می‌تواند به توالی DNA در ناحیه پروموتور برخی از این ژن‌ها متصل شود. فعال شدن این ژن‌ها به وسیله FOXO3a همراه با دیگر مکانیسم‌های تنظیم‌کننده رونویسی و فاکتورهای مایوژنیک موجب شروع آتروفی عضلانی می‌شود (22). رحمتی و همکاران (2021) در بررسی تغییرات بیان ژن‌های P53، MAFbx، MST1، P53 (Tumor protein) و ATF4 (Activating Transcription Factor 4) در عضلات اسکلتی کند و تند انقباض به دنبال تعلیق

مکانیکی اندام عقبی در موش‌های و یستار نشان دادند که بیان این ژن‌ها در هر دو نوع عضلات کند و تند انقباض افزایش می‌یابد ولی این افزایش در عضله کند انقباض بیش‌تر است (23). علاوه بر این نشان داده شده است که بیان TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6)، MuRF1 و MAFbx در آتروفی عضله اسکلتی ناشی از عصب برداری افزایش می‌یابد (24). با توجه به نقش و عملکرد عضلات اسکلتی در بدن انسان، حفظ سلامت توده عضلانی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. درک و شناخت مکانیسم‌های مربوط به آتروفی عضلانی به توسعه روش‌های درمانی کم هزینه و کارآمد برای مقابله با برخی شرایط از قبیل دیستروفی عضلانی و آتروفی ناشی از بی‌حرکی کمک خواهد کرد. با توجه به مطالبی که گفته شد، بی‌باری مکانیکی عضلات و اندام‌ها مانند وضعیت فضا نوردان و افرادی که در استراحت مطلق قرار دارند یکی از شرایطی است که در آن تحلیل توده عضلانی رخ می‌دهد. همچنین تغییرات بیان ژن‌های MST1 و MAFbx در آتروفی عضلانی ناشی از بی‌باری مکانیکی، به‌خوبی بررسی نشده است. از این رو پرداختن به وضعیت‌های بی‌حرکت مخصوصاً آتروفی‌هایی که می‌تواند در نتیجه استراحت مطلق (بی‌بار شدن اندام‌ها) در زمان آسیب‌های ورزشی در ورزشکاران، گنج‌گرفتن اندام، تعلیق اندام و عصب‌برداری اتفاق بیفتد از اهمیت بسزایی برخوردار است؛ بنابراین با توجه به کاهش توده عضلانی در شرایط بدون بار شدن و نقش ژن‌های MST1 و MAFbx در برخی از مدل‌های آتروفی این سوال پیش می‌آید که در شرایط بی‌باری مکانیکی، بیان این ژن‌ها چه تغییری خواهد کرد؟ همچنین با توجه به نقش موثر تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات استقامتی در بهبود سلامت و عملکرد عضلانی (25) و این که فعالیت ورزشی می‌تواند سرعت اختلالات عصبی عضلانی را کاهش و سنتز پروتئین عضله را افزایش دهد، این فرضیه مطرح است که فعالیت ورزشی استقامتی پیش از لیگاسیون عصبی

(به عنوان مدلی از بی‌باری مکانیکی) بر بیان ژن‌های MST1 و MAFbx اثرگذار است؛ بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین استقامتی بر بیان این ژن‌ها در عضله پلاتناریس موش‌های صحرایی نر ویستار بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر تجربی و از نوع بنیادی است. تعداد 16 سر موش صحرایی نر ویستار هشت هفته‌ای با وزن اولیه 250 ± 20 گرم خریداری و پس از یک هفته آشناسازی و سازگاری با محیط آزمایشگاه به روش تصادفی ساده به دو گروه تقسیم شدند: 1) گروه اول: گروه کنترل- لیگاسیون عصبی. این گروه شامل 8 سر موش صحرایی بود که عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها به طور محکم گره زده شد. این گروه در پایان پژوهش، با استفاده از سدیم پنتوباریتال (60 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی) بیهوش و سپس بافت عضله پلاتناریس آن‌ها استخراج شد. این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های سلولی - مولکولی در فریزر 80- درجه سانتی گراد منجمد و نگهداری شدند. 2) گروه دوم: گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی. این گروه شامل 8 سر موش صحرایی بود که پس از یک دوره تمرین استقامتی، عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها به طور محکم گره زده شد. این موش‌ها نیز همزمان با گروه کنترل - لیگاسیون عصبی، قربانی شده و کلیه مراحل و آزمایشات مطابق با گروه کنترل - لیگاسیون عصبی بر روی آن‌ها انجام پذیرفت. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات و دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعه درد (International Association for the Study of Pain) مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

القاء لیگاسیون عصب نخاعی (Spinal nerve ligation)

مدل لیگاسیون عصب نخاعی روشی است که به‌طور گسترده برای مطالعه‌ساز و کارهای درد نوروپاتی و

تأثیر داروها و رفتارهای مرتبط با درد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش جهت ایجاد لیگاسیون عصب نخاعی، ابتدا موش‌ها با سدیم پنتوباریتال بیهوش شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها بر اساس روش Kim and Chung (1992) (26) به‌طور محکم گره زده شد. مدت پروتکل لیگاسیون عصب نخاعی، چهار هفته بود. به‌طور خلاصه در این روش، پس از اطمینان از بیهوشی حیوان، عضلات بین مهره‌ای در سطح مهره چهارم کمری تا دوم خاجی جدا و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. سپس عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت خاصی از اعصاب مجاور جدا گردید. عصب پنجم کمری به‌طور محکم با استفاده از نخ مخصوص (ساخت کشور ژاپن)، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبرها با دقت بسیار بالایی گره زده شد.

برنامه تمرینی

به‌منظور آشناسازی موش‌ها با نحوه تمرین استقامتی و نوارگردان، موش‌های گروه تمرین به مدت پنج روز بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان (Model T510E, Diagnostic and Research, Taoyuan, Taiwan) با شیب صفر درصد و سرعت 10 متر بر دقیقه به مدت 10 دقیقه دویدند. برای تمرین استقامتی در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (70-60 درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) استفاده شد. بدین صورت که گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی بر روی نوارگردان به مدت شش هفته و هر هفته چهار جلسه در معرض تمرین استقامتی قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش می‌یافت (جدول شماره 1). جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شد (27).

جدول شماره 1: نمایش عددی پروتکل تمرین استقامتی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
مدت تمرین (دقیقه)	10	20	20	30	30	30
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	10	10	15	15	18	18

نگهداری و تغذیه موش‌ها

موش‌ها در محیط آزمایشگاه جوندگان در شرایط کنترل شده نور (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، شروع روشنایی 7 صبح و شروع خاموشی 7 عصر)، دما (22 ± 1 سانتی گراد) و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. تعداد 3 تا 5 سر موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد 25 در 27 در 43 سانتی متر به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. در طول دوره پژوهش جابه جایی و دستکاری حیوانات توسط یک نفر انجام می‌شد.

استخراج نمونه

پس از پایان پروتکل لیگاسیون عصبی، موش‌ها با استفاده از سدیم پنتوباریتال بیهوش شدند و در محیط کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش، عضله پلانتاریس با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال استخراج گردید. سپس با ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0/001 گرم (BL1000 ساخت کشور ژاپن) وزن کشی و بلافاصله در نیتروژن مایع، منجمد و برای انجام آزمایش‌های سلولی مولکولی در فریزر 80- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود 50 میلی گرم بافت به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت 1 به 10 در محلول تک فاز (QIAzol Lysis Reagent) به روش دستی هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در 4 درجه سانتی گراد، 10 دقیقه، 12000g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت 1 به 0/5 با کلروفرم مخلوط و به مدت 15 ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در 4 درجه سانتی گراد، 15 دقیقه، 12000g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شده، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت 1 به 0/5 با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق

رها و سپس در 4 درجه سانتی گراد، 10 دقیقه، 12000g سانتریفوژ شد. پلت (Pellet) حاوی RNA در اتانول شستشو و در 20 میکرولیتر آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شده و نسبت 260 به 280 بین 1/8 تا 2 به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از 1 میکروگرم از RNA و با استفاده از پرایمر هگزامر تصادفی (Random hexamer) و آنزیم نوترکیب (Mmuv Reverse transcriptase) انجام گرفت.

Real time - PCR

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌ها MST1 و MAFbx از روش کمی PCR (Real-time polymerase chain reaction) با استفاده از معرف مستر میکس سایر گرین (Applied Bio Primix Syber GreenII) (Applied Bio systems Step One, USA) مخلوط واکنش در حجم نهایی 20 میکرولیتر و هر واکنش به صورت تکراری (Duplicate) انجام شد. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های MST-1 و MAFbx در بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره 2 گزارش شده است. ضمن این‌که از GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در روش کمی PCR شامل: 95 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه - 95 درجه سانتی گراد به مدت 15 ثانیه، 60 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه (تکرار 40 چرخه) بود. بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن‌های موردنظر به ژن مرجع به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد (28).

جدول شماره 2: توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

ژن‌ها	توالی پرایمر
MST-1	F= ATGGGTATAGCAGGCAAG R= CGAGGACACATACAAGAGAG
MAFbx	F= AGGGCAGGTGGATTGGAAGAAGA R= GTTGGGGTGAAGTGAGACGGAG
GAPDH	F= AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R= CATACTCAGCACCAGCATCACC

روش آماری

در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار و در آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها، آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد استفاده قرار گرفت. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون لون سنجیده شد. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری تی مستقل در سطح معناداری برابر با $P < 0/05$ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-20 انجام شد.

یافته‌ها

در جدول شماره 3، تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره تمرینی در گروه‌های پژوهش ارائه شده است.

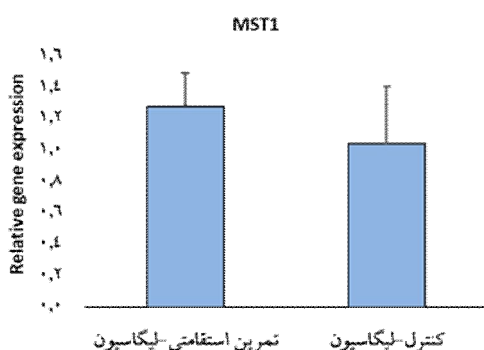
جدول شماره 3: تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره تمرینی در گروه‌های پژوهش

گروه کنترل-لیگاسیون عصبی	وزن به گرم در پیش آزمون	وزن به گرم در پس آزمون
250/36 ± 6/21	240/51 ± 6/12	
گروه تمرین استقامتی-لیگاسیون عصبی	250/01 ± 9/85	255/25 ± 10/25

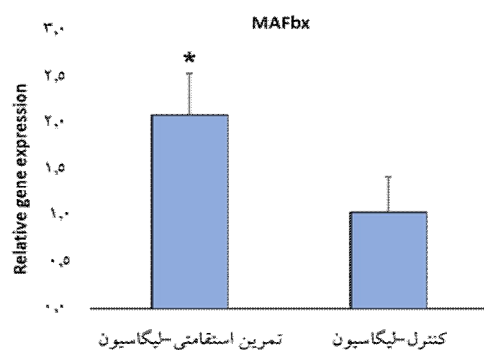
پیش از انجام آزمون‌های آماری به منظور بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها و تجانس واریانس‌ها از آزمون‌های کولموگروف اسمیرنوف و لون استفاده شد. نتایج این آزمون‌ها برای متغیرهای توده بدنی، میزان بیان ژن‌های MST1 و MAFbx و نسبت وزن عضله پلاتتاریس نشان داد که تمامی متغیرها از توزیع نرمال و تجانس واریانس‌ها برخوردار هستند ($P \geq 0/05$). با توجه به تجزیه و تحلیل‌های آماری در بیان ژن MST1 در گروه تمرین استقامتی-لیگاسیون عصبی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصبی افزایش معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (نمودار شماره 1).

همچنین نتایج نشان داد که در بیان ژن MAFbx در گروه تمرین استقامتی-لیگاسیون عصبی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصبی افزایش معنی‌داری

مشاهده شد ($P < 0/05$). این نتایج نشان می‌دهد که لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین استقامتی نسبت به گروهی که تنها در معرض لیگاسیون عصبی قرار داشتند، منجر به افزایش معنی‌دار در بیان ژن MAFbx می‌شود (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 1: تغییرات بیان ژن MST1 در گروه‌های پژوهش



نمودار شماره 2: تغییرات بیان ژن MAFbx در گروه‌های پژوهش. * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل-لیگاسیون عصبی ($P < 0/05$).

بحث

در این پژوهش به بررسی اثر لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرینات استقامتی بر بیان ژن‌های MST1 و MAFbx عضله پلاتتاریس موش‌های صحرایی نر وistar پرداخته شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که لیگاسیون عصب نخاعی پس از تمرین استقامتی بر بیان ژن MST1 در عضله پلاتتاریس تاثیر

معنی داری ندارد با این حال منجر به افزایش معنی دار در بیان ژن MAFbx می شود. این یافته ها نشان می دهد که لیگاسیون عصب نخاعی در ترکیب با تمرین استقامتی بر بیان ژن MAFbx نسبت به MST1 تاثیر بیش تری دارد. همچنین یافته های حاصل از این پژوهش نشان داد که لیگاسیون عصبی پس از تمرین استقامتی منجر به کاهش بیش تری در میزان وزن عضله پلاتناریس نسبت به گروه لیگاسیون عصبی شد؛ بنابراین تغییرات ایجاد شده در وزن عضله پلاتناریس در شرایط لیگاسیون عصبی پس از تمرین استقامتی با تغییرات ایجاد شده در ژن های MST1 و MAFbx همسو بود. در برخی پژوهش ها، نشان داده شده است که در پی یک دوره فعالیت کاهش یافته با استفاده از مدل لیگاسیون عصبی نخاعی، افزایش پاتولوژیک بیان ژن های CDK5 و SYD منجر به ایجاد اثرات مخرب بر سیستم عصبی عضلانی و ظهور نشانه های پاتولوژیک مانند آتروفی عصبی - عضلانی شده که روند آپوپتوز را سرعت می بخشد (29). این یافته ها با یافته های پژوهش پیش رو همراستا است چرا که در پژوهش حاضر، لیگاسیون عصبی پس از تمرین استقامتی بر بیان ژن MAFbx به عنوان یکی از شاخص های آتروفی عضلانی، تاثیر افزایشی داشت. کاظمی (1397) در پژوهشی به بررسی اثر بی باری مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن های MST1 و MAFbx در عضلات نعلی (کندانقباض) و کفپایی (تندانقباض) موش های صحرایی وistar پرداخت. نتایج پژوهش وی نشان داد که پس از 14 روز تعلیق اندام تحتانی، بیان ژن MST1 افزایش معنی داری داشت ولی در بیان ژن MAFbx افزایش معنی داری مشاهده نشد؛ بنابراین MST1 می تواند یکی از اهداف اصلی کنترل آتروفی در شرایط بدون بار شدن مکانیکی در نظر گرفته شود. همچنین نتایج آن ها نشان داد که MST1 در یک شیوه وابسته به نوع تار عضلانی، فرآیند آتروفی عضلانی را کنترل می کند (21). با این حال این یافته ها با یافته های پژوهش پیش رو مبنی بر عدم تغییر در بیان ژن MST1 در اثر ترکیب تمرین

استقامتی و لیگاسیون عصبی، مغایرت دارد. از دلایل این تفاوت می توان به روش پژوهش مورد نظر اشاره نمود که در آن تنها به بررسی اثر کاهش فعالیت بدنی بر بیان ژن های MST1 و MAFbx پرداخته شد. در حالی که در پژوهش حاضر، تاثیر لیگاسیون عصبی به عنوان مدلی از کاهش فعالیت بدنی پس از تمرین استقامتی بر بیان ژن های MST1 و MAFbx بررسی شد. در پژوهش دیگری کاظمی و دهش (1398) به بررسی تاثیر چهار هفته HIIT (High intensity interval training) بر بیان ژن MST1 و MAFbx عضله EDL (Extensor digitorum longus) موش های پیر پرداختند. یافته های بررسی آن ها نشان داد که پیری به طور معناداری بیان ژن MST1 و MAFbx را افزایش می دهد. از طرف دیگر، چهار هفته HIIT سبب کاهش معنادار بیان ژن MST1 و کاهش غیر معنی دار بیان ژن MAFbx شد (30). این در حالی است که در پژوهش حاضر، لیگاسیون عصبی به دنبال تمرین استقامتی منجر به افزایش بیان ژن MAFbx و عدم تاثیر بر بیان ژن MST1 در گروه تمرین نسبت به گروه لیگاسیون عصبی شد. این تفاوت ها می تواند مربوط به نوع و شدت تمرین مورد استفاده و شیوه اجرا در پژوهش های مورد نظر باشد. همچنین از آنجایی که در پژوهش حاضر از ترکیب لیگاسیون عصب نخاعی و تمرین استقامتی با شدت متوسط استفاده شده است که این شیوه تمرینی می تواند مسیرهای آتروژنیک سلولی نظیر افزایش بیان ژن های Murf-1 و MAFbx را فعال کند (31)؛ بنابراین بیان ژن MAFbx در گروه تمرین استقامتی - لیگاسیون عصبی نسبت به گروه لیگاسیون عصبی افزایش بیش تری نشان داده است. همچنین گزارش شده است که تمرین استقامتی می تواند شاخص های اتوفاژیک را در عضلات اسکلتی افزایش دهد (32). در پژوهش دیگری نیز گزارش شده است که دویدن با شدت 60 درصد اکسیژن مصرفی بیشینه باعث افزایش بیان MAFbx در موش های تمرین کرده می شود (33) و دلیل افزایش این لیگاز ممکن است پاسخ سازگاری به تمرین استقامتی باشد. همچنین عنوان

شده است که سیگنال‌های داخل سلولی ناشی از تمرین منجر به تنظیم مجدد نشانگرهای مولکولی مسیر یوئیکوئیتین پروتازوم می‌شود که با افزایش بیش‌تر به دنبال تمرین استقامتی همراه است (34).

نشان داده شده است که فاکتور Foxo3 تنظیم افزایشی ژن‌های درگیر در مسیرهای اتوفازی و یوبی-کوئیتین را واسطه‌گری می‌کند. مهار Foxo3 در عضلاتی که در معرض تحریکات آتروفیک قرار گرفته‌اند می‌تواند از آتروفی عضلانی جلوگیری کند (35). همچنین Foxo3 بیان MAFbx mRNA را تحریک می‌کند. از سوی دیگر، Akt که یکی از عوامل بالادست Foxo3 است، می‌تواند آن را فسفریله کرده تا از جابه‌جایی آن به داخل هسته جلوگیری کند و در نتیجه بیان MAFbx mRNA را کاهش دهد (36). نشان داده شده است که پروتئین Akt و سطوح فسفریله آن در شرایط بی‌باری مکانیکی کاهش می‌یابد. بنابراین این مسیر می‌تواند یکی از مکانیسم‌های درگیر در افزایش MAFbx باشد (17). MAFbx و MuRF1 اهداف پائین‌دست سیگنالینگ P38 MAPK هستند. در شرایط تعلیق اندام تحتانی، بیان P38 افزایش می‌یابد و این می‌تواند در آتروفی عضلانی ناشی از بی‌بار شدن به واسطه افزایش بیان MAFbx درگیر باشد (37).

گزارش شده است که MST1 در شرایط استرس‌زای مختلفی نظیر فشار اکسایشی و فعال شدن کاسپازها (19) افزایش می‌یابد. رونویسی MST1 به عنوان یکی از عوامل اصلی آبشار پیامرسانی هیپو (Hippo Signaling Cascade) در عضلات اسکلتی مختلف مشخص شده است (38). همچنین در شرایط قطع عصب، افزایش بیان MST1 موجب آتروفی عضبی در عضلات تندانقباض می‌گردد. این افزایش در MST1 همراه با افزایش بیان MAFbx و LC3 از طریق فعال کردن FOXO3a ایجاد می‌شود (20). با توجه به این نتایج می‌توان گفت یکی از ساز و کارهای احتمالی مربوط به عدم تغییرپذیری بیان MST1 در پژوهش حاضر شاید این

باشد که در این پژوهش از تمرین استقامتی استفاده شده است که در آن تارهای عضلانی کند انقباض، بیش‌تر درگیر می‌شوند. از سوی دیگر، نشان داده شده است که بیان MST1 در عضلات تندانقباض در شرایط قطع عصب افزایش می‌یابد. مداحی و همکاران (1399) در تاثیر بررسی تاثیر کاهش فعالیت بدنی به شکل لیگاسیون عصبی بر بیان ژن‌های MuRF-1 و Atrogin-1/MAFbx پس از تمرینات مقاومتی، استقامتی و ترکیبی نشان دادند که میزان بیان ژن MuRF-1 در گروه تمرین ترکیبی - کاهش فعالیت بدنی و گروه تمرین مقاومتی - کاهش فعالیت بدنی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود. ولی در مورد ژن Atrogin-1/MAFbx، تنها گروه تمرین ترکیبی - کاهش فعالیت بدنی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. این نتایج نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد موش‌هایی که در برنامه تمرینی آن‌ها، تمرین مقاومتی وجود داشت نسبت به گروهی که تنها تمرین استقامتی انجام دادند در برابر آتروفی ناشی از کاهش فعالیت بدنی مقاوم‌ترند (39).

در بررسی اثرات ناشی از تمرینات ورزشی بر درد نوروپاتی ناشی از لیگاسیون عصبی، Stagg و همکاران (2011) نشان دادند که تمرین هوازی با شدت متوسط و منظم علامت درد نوروپاتی ناشی از لیگاسیون عصبی را معکوس می‌کند و محتوای مواد افیونی درون‌زا (Endogenous Opioids) را در نواحی ساقه مغز که در تعدیل درد مهم هستند، افزایش می‌دهد (40). همچنین فرزاد و همکاران (2018) در یک مطالعه تجربی به بررسی اثرات تمرین شنا بر درد نوروپاتی و بیان Irisin و GAD65 (Glutamic acid decarboxylase 65-kilodalton isoform) و گیرنده P2X3 (ATP-activated ion channels) پس از آسیب خراش مزمن (CCI: Chronic constriction injury) عصب سیاتیک پرداختند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که چهار هفته تمرین شنا اثرات توانبخشی مفیدی بر علامت درد نوروپاتی دارد که این اثرات تا حدی با افزایش GAD65 مرتبط است (41).

سپاسگزاری

پژوهش حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی است. بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند تقدیر و تشکر می‌شود. پژوهش حاضر دارای کد اخلاق (IR.KMU.REC.1399.190) از دانشگاه علوم پزشکی کرمان است.

به‌طور کلی یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فعالیت کاهش یافته پس از تمرین استقامتی می‌تواند منجر به ایجاد اثرات مخرب بر دستگاه عضلانی و ظهور نشانه‌هایی از آتروفی عضلانی گردد. با توجه به یافته‌های این پژوهش مبنی بر مخرب بودن اثر فعالیت کاهش یافته پس از تمرینات استقامتی، به افرادی که تمرین استقامتی انجام می‌دهند توصیه می‌شود که از بی‌حرکی‌های طولانی مدت پرهیز کنند.

References

1. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 146: 159-216.
2. Steele J, Fisher J, McGuff D, Bruce-Low S, Smith D. Resistance training to momentary muscular failure improves cardiovascular fitness in humans: a review of acute physiological responses and chronic physiological adaptations. *Journal of Exercise Physiology Online* 2012; 15(3): 53-80.
3. dwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phy Med Reh* 2002; 81(11 Suppl): S40-S51.
4. Hodges P, Kaigle Holm A, Hansson T, Holm S. Rapid atrophy of the lumbar multifidus follows experimental disc or nerve root injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31(25):2926-2933.
5. Britannica T. Editors of Encyclopaedia. Argon. *Encyclopedia Britannica*, 2020. [online] Available: <https://www.britannica.com/science/argon-chemical-element>.
6. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg focus* 2004; 16(5): 1-7.
7. Verhees KJP, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Op den Kamp CMH, van der Velden JLJ, Langen RCJ. Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(5): C995-C1007.
8. Fanzani A, Fanzani A, Conraads V M, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2012; 3(3): 163-179.
9. Giger JM, Bodell PW, Zeng M, Baldwin K M, Haddad F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* 2009; 107(4): 1204-1212.
10. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard J C, Hadj Sassi A, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(22): 4361-4371.
11. Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 2003; 95(6): 2185-2201.
12. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 89(2): 823-839.
13. Kazemi A, Said A. Effect of Spinal Nerve Ligation (SNL) on the expression of TRAF6 and MuRF1 genes in soleus muscle of Wistar

- rats after HIT training. *Journal of Sport Biosciences* 2020; 12(3): 347-362.
14. Bodine SC, Stitt T N, Gonzalez M, Kline W O, Stover G L, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11): 1014-1019.
 15. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela D M, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 2009; 185(6): 1083-1095.
 16. Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I, Derijard B. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev* 2006; 127(10): 794-801.
 17. Gomes M D, Lecker S H, Thomas Jagoe R, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(25): 14440-14445.
 18. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294(5547): 1704-1708.
 19. Graves JD, Draves KE, Gotoh Y, Krebs EG, Clark EA. Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14909-14915.
 20. Wei B, Dui W, Liu D, Xing Y, Yuan Z, Ji G. MST1, a key player, in enhancing fast skeletal muscle atrophy. *BMC Biology* 2013; 11(1): 1-13.
 21. Kazemi A. The effect of the mechanical unloading of lower limb on MST1 and Atrogin1 gene expression in Plantaris and soleus muscles of Wistar rats. *Journal of Knowledge & Health* 2018; 13(3): 34-41.
 22. Reed SA. Inhibition of IkappaB kinase alpha (IKK α) or IKKbeta (IKK β) plus forkhead box O (Foxo) abolishes skeletal muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(3): 491-496.
 23. Rahmati M, Kazemi A, Zarei L, Abbasi Moghadam M. Adaptive response of slow and fast skeletal muscle following mechanical hindlimb suspension in Wistar male rats. *Journal of Exercise & Organ Cross Talk* 2021; 1(3): 19-27.
 24. Sun H, Qiu J, Chen Y, Yu M, Ding F, Gu X. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle. *International journal of molecular medicine* 2014; 33(6): 1586-1596.
 25. Laurin JL, Reid JJ, Marcus M, Lawrence M, FMiller B. Long-term aerobic exercise preserves muscle mass and function with age. *Current Opinion in Physiology* 2019; 10: 70-74.
 26. Kim SH, Chung J M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50(3): 355-363.
 27. Chae CH, Kim HT. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochemistry Int* 2009; 55(4): 208-213.
 28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45-e45.
 29. Kazemi A, Rahmati M, Ziasistani A. Effects of 6 weeks decreased activity in the form of

- neuropathic pain on sunday driver gene expression in the rat sciatic nerve fibers. *Sport Physiology* 2016; 8(39): 121-134.
30. Kazemi, A. and T. Dahesh, The Effect of 4 Weeks of High Intensity Training on Gene Expression of MST1 and MAFbx in EDL Muscle of Aged Mice. 2019.
 31. Moradi Y, Zehsaz F, Nourazar MA. Concurrent exercise training and Murf-1 and Atrogin-1 gene expression in the vastus lateralis muscle of male Wistar rats. *Apunts Sports Medicine* 2020; 55(205): 21-27.
 32. Tam B, Pei XM, Yu AP, Sin TK, Leung KK, Au KK, et al. Autophagic adaptation is associated with exercise-induced fibre-type shifting in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; 214(2): 221-236.
 33. Gonçalves NG, Cavaletti SH, Pasqualucci CA, Martins MA, Lin CJ. Fructose ingestion impairs expression of genes involved in skeletal muscle's adaptive response to aerobic exercise. *Genes & Nutrition* 2017; 12: 33.
 34. Stefanetti RJ, Lamon S, Wallace M, Vendelbo MH, Russell AP, Vissing K, et al. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflügers Arch* 2015; 467(7): 1523-1537.
 35. Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 87.
 36. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; 117(3): 399-412.
 37. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007; 69(2): 310-321.
 38. Zhao B, Li L, Guan KL. Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123(23): 4001-4006.
 39. Gharakhanlou R, Kazemi A, Azarbayjani M A. The effect of the decreased activity on Murf-1 and Atrogin-1 gene expression of soleus muscle of Wistar rats following endurance, resistance and combination training. *The Scientific Journal of Rehabilitation Medicine (JRM)* 2021; 114373. 2531 (in Press).
 40. Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* 2011; 114(4): 940-948.
 41. Farzad B, Rajabi H, Gharakhanlou R, Allison DJ, Hayat P, Jameie SB. Swimming training attenuates allodynia and hyperalgesia induced by peripheral nerve injury in an adult male rat neuropathic model: effects on Irisin and GAD65. *Pain Med* 2018; 19(11): 2236-2245.