

اثر فعالیت شنای اختیاری بر محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2، حافظه و عملکرد حرکتی رت‌های مدل مالتیپل اسکلروزیس القاء شده با کوپریزون

سید شفا مرعشی^۱، محمد رمی^۲، سعید شاکریان^۳، دی ماریاما آوانگ داود^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مالتیپل اسکلروزیس (MS (Multiple sclerosis) یکی از بیماری‌های التهابی مزمن، با واسطه‌گری دستگاه ایمنی، در دستگاه عصبی مرکزی است. از آنجایی که فعالیت بدنی دارای اثرات ضد التهابی و ضد اکسایشی است، لذا هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر فعالیت شنای اختیاری بر محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 و عملکرد شناختی و حرکتی رت‌های مدل MS می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۲۰ سر رت با میانگین سن ۱۲ هفته به چهار گروه شاهد سالم، شاهد بیمار، سالم تمرین و تمرین بیمار تقسیم شدند. به منظور القاء MS، رت‌های گروه‌های بیمار در تمام ۱۲ هفته طول پروتکل تحقیق با غذای محتوی کوپریزون ۰/۵ درصد تغذیه شدند. پس از پایان ۶ هفته پروتکل تمرینی و انجام آزمون‌های رفتاری، بافت هیپوکمپ استخراج و مقادیر پروتئین‌ها با استفاده از روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون‌های حافظه و عملکرد حرکتی نشان داد که عملکرد حافظه و فعالیت حرکتی و حفظ تعادل در گروه بیمار دچار اختلال شده و متعاقب یک دوره فعالیت شنا بهبود قابل توجهی یافت. همچنین نتایج نشان داد که محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 در گروه شاهد بیمار به صورت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد سالم افزایش یافت، همچنین مقادیر این پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه شاهد بیمار به صورت قابل توجهی کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، فعالیت ورزشی شنای اختیاری احتمالاً می‌تواند منجر به حفاظت بیشتری از عصب و ارتقاء عملکرد حافظه و فعالیت حرکتی و تعادل بیماران مبتلا به MS گردد و به عنوان یک راهبرد غیر دارویی امیدوارکننده باشد.

واژگان کلیدی: شنا؛ بیماری MS؛ هیپوکمپ؛ تمرین

ارجاع: مرعشی سید شفا، رمی محمد، شاکریان سعید، آوانگ داود دی ماریاما. اثر فعالیت شنای اختیاری بر محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2، حافظه و عملکرد حرکتی رت‌های مدل مالتیپل اسکلروزیس القاء شده با کوپریزون. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۸): ۱۱۱۸-۱۱۲۷.

حافظه و عملکرد حرکتی رت‌های مدل مالتیپل اسکلروزیس القاء شده با کوپریزون.

وجود دارد و بسته به محل درگیر در بیماری، امکان وقوع علائم متفاوت و گسترده‌ای از جمله اختلال در تعادل، حافظه و یادگیری و ایجاد سستی، گرفتگی عضلانی وجود دارد که زندگی را بر مبتلایان دشوار می‌سازد (۲). اگرچه جزئیات و سبب‌شناسی بیمار ام‌اس به‌طور کامل مشخص نیست، اما پژوهش‌های گسترده نقش نیتریک اکساید NO (Nitric oxide) را در پاتولوژی این بیماری تاحد زیادی مشخص کرده‌اند (۳). تحریک فاکتور هسته‌ای کاپایی (NF-kB) با

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS (Multiple sclerosis) یک بیماری التهابی مزمن و رایج، با واسطه‌گری دستگاه ایمنی، در دستگاه عصبی مرکزی CNS (Central nervous system) است. از بین رفتن غلاف میلین آکسونی و تخریب الیگودندروسیت‌ها که وظیفه‌ی میلین‌سازی را بر عهده دارند، از ویژگی‌های بارز این بیماری محسوب می‌شود (۱). امکان تخریب غلاف میلین در هر بخشی از بافت عصبی مرکزی

۱- کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، واحد تحقیقات سلامت از طریق ورزش و زندگی فعال (HEAL)، گروه علوم زیست پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و علوم بهداشتی، دانشگاه صباح مالزی، جالان

UMS، کوتا کینابالو، صباح، مالزی

نویسنده‌ی مسؤول: محمد رمی؛ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: m.rami@scu.ac.ir

داده شده است (۱۷-۱۹). اما نتایج یک مطالعه‌ی فراتحلیل نشان داد که تمرینات ترکیبی می‌توانند در بهبود علائم و کیفیت زندگی مبتلایان مؤثرتر واقع شوند (۲۰). طبق نتایج مطالعات، ورزش، تأثیرات ضدالتهابی و محافظت‌کننده از عصب دارد (۲۱)، اما شنا، احتمالاً می‌تواند در مقایسه با دیگر انواع فعالیت‌ها، منجر به حفاظت بیشتری از عصب گردد که احتمالاً به دلیل ماهیت ترکیبی هوازی-مقاومتی این نوع ورزش می‌باشد (۲۲) و منجر به صرفه‌جویی در زمان و بی‌نیاز کردن مبتلایان از انجام دو ورزش جداگانه خواهد شد. آب با دمای (۸۰ تا ۸۴ درجه فارنهایت، ۳۰ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد) سفتی عضلات را کاهش و به بیمار اجازه می‌دهد که راحت‌تر از خشکی حرکت کند و به دلیل فشار هیدرو استاتیک بر قسمت‌های مختلف بدن، گردش خون بهتر می‌شود و از افزایش دمای بدن و خستگی جلوگیری می‌کند. به دلایل ذکر شده پروتکل تمرینی در پژوهش حاضر شنای اختیاری می‌باشد. ما در این مطالعه در پی پاسخ به این پرسش هستیم که آیا ورزش شنای اختیاری به عنوان یک راهبرد غیر دارویی می‌تواند تغییرات ناشی از بیماری MS در CNS (به خصوص هیپوکمپ) را تعدیل کند؟ لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر شش هفته ورزش شنای اختیاری بر میزان پروتئین‌های iNOS و COX-2 بافت هیپوکمپ رت‌های مدل MS القا شده با کوپریزون می‌باشد.

روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی: در پژوهش حاضر، ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با میانگین سنی ۱۲ هفته از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری شد. در ابتدا به منظور سازگاری با محیط، رت‌ها دو هفته در خانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی دامپزشکی با دمای ۲۰ الی ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد، تهویه مناسب و ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند و به شکل آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. رت‌ها پس از آشنایی با نحوه‌ی فعالیت در استخر جوندگان، به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۵-تایی تقسیم شدند: گروه‌های شاهد سالم، کنترل بیمار، تمرین سالم و تمرین بیمار. تمامی مراحل مطالعه‌ی حاضر به تصویب کمیته‌ی اخلاق (IR.SCU.REC.1402.066) در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید.

روش القای بیماری مالتیپل اسکلروزیس: جهت القای بیماری ام‌اس، کوپریزون با نسبت وزنی ۰/۵ درصد به پودر غذایی جوندگان اضافه، به خوبی مخلوط شده و با اضافه کردن آب، خمیر حاصله به پلت غذایی تبدیل شد و به مدت ۱۲ هفته (۶ هفته برای القای بیماری

لیپوبلی ساکارید و یا اینترفرون گاما (IFN- γ) موجب بیان آنزیم Inducible nitric oxide synthase (iNOS) که مسئول ساخت NO است و افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود (۴). NO می‌تواند باعث کاهش بیان پروتئین‌های ساختاری میلین شده و مرگ الیگودندروسیت‌ها را تسریع کند (۵) با وجود موارد ذکر شده برخی مطالعات افزایش سطح میلین‌زدایی را در آزمودنی‌هایی که NO کم‌تر از سطح طبیعی داشتند را نشان داده‌اند به این معنی که سطوحی از NO برای عملکرد طبیعی نورونی ضروری است (۶). iNOS می‌تواند بیان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) را افزایش دهد (۷). COX-2 وظیفه‌ی کاتالیز واکنش‌های ابتدایی ساخت پروستاگلندین‌ها و پروستاگلندین‌ها (PGs) از آراشیدونیک اسید را به عهده دارد (که خود نقش مهمی در فرایند التهاب بازی می‌کنند) و به عنوان فرآورده‌ی جانبی، ساخت گونه‌های اکسیژن آزاد (ROS) را به همراه دارد (۸). NO حاصل از iNOS به همراه ROS حاصل از COX-2، پراکسی نتریت (ONOO-) را تشکیل می‌دهند که باعث مهار انتقال‌دهنده‌های گلوتامات می‌شود و به‌طور مستقیم فعالیت آکسون و سلول‌های گلیا و غلاف‌های میلین را مختل و به عنوان یک نوروتاکسین نقش بازی می‌کند (۹). به علاوه غلظت‌های بالای NO با فعال کردن Caspase-3، موجب تسریع در آپوپتوز (۱۰) و همچنین با ایجاد اختلال در متابولیسم انرژی و تخریب DNA میتوکندریایی الیگودندروسیت‌ها از طریق اکسیداسیون و دی‌آمیناسیون، افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش بار کلسیم، موجب تسریع مرگ الیگودندروسیت‌ها می‌شود (۱۱) در کنار این موارد، NO باعث اختلال در سد خونی مغزی و افزایش نفوذپذیری آن نسبت به لکوسیت‌ها می‌شود (۱۲). ارتباط متقابل COX-2 و iNOS در نواحی از بافت عصبی نمونه‌های مبتلا به ام‌اس که میلین‌زدایی رخ داده است، قابل مشاهده می‌باشد و سند دیگری بر تأثیر این پروتئین‌ها بر پاتولوژی بیماری ذکر شده است (۱۳). طبق پژوهش‌های پیشین، ورزش در درازمدت کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی را به دنبال دارد (۱۴) و احتمالاً در نهایت به کاهش سطح بیان iNOS منتج خواهد شد. گزارش شده است که ورزش با افزایش PGC-1 α باعث کاهش استرس اکسیداتیو بافت هیپوکمپ خواهد شد (۱۵) و احتمالاً با کاهش ROS، از افزایش پراکسی نتریت جلوگیری خواهد کرد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که ورزش، بیان پروتئین‌های بانی آپوپتوز نظیر BAX و Caspase3 را کاهش و بیان BCL-2 که اثر حفاظت‌کننده در برابر آپوپتوز دارد را افزایش می‌دهد (۱۶). تأثیرات مثبت فعالیت‌هایی از قبیل تمرینات تناوبی پر شدت (HIIT) (High-intensity interval training)، مقاومتی و هوازی بر بهبود شکایات و علائم بالینی بیماری ام‌اس به شکل گسترده نشان

و ادامه تا هفته ۱۲) در اختیار رت‌ها قرار گرفت (۲۳). جهت تأیید القاء بیماری ام‌اس از آزمون روتارود استفاده شد (۲۴).

آزمون‌های رفتار حرکتی و حفظ تعادل: در پایان دوره‌ی تحقیق، جهت ارزیابی فعالیت حرکتی، حافظه احترازی، هماهنگی و تعادل از آزمون‌های جعبه باز، شاتل باکس و روتارود استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در دوره‌ی روشنایی فعالیت حیوان و بین ساعات ۹ صبح الی ۱۲ بعد از ظهر انجام شدند.

آزمون جمع‌ی باز: در آزمون جمع‌ی باز، فعالیت حرکتی حیوان، بر حسب جابه‌جایی از نقطه‌ای به نقطه‌ی دیگر، توسط دوربین دستگاه، اندازه‌گیری و محاسبه شد. این دستگاه شامل یک جعبه‌ی مکعبی روباز با کفی که با خطوطی به ۲۵ مربع تقسیم شده و دیواره‌های مشکی به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر است. رت‌ها در مرکز صفحه دستگاه قرار داده شده و فعالیت‌شان برای ۱۰ دقیقه ثبت شد. با این آزمون، متغیرهای رفتاری شامل: کل مسافت طی شده و سرعت حرکت، ثبت و مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

آزمون روتارود: آزمون روتارود به منظور سنجش تعادل و هماهنگی بین اندام‌های حرکتی در جوندگانی مانند رت استفاده می‌شود. دستگاه روتارود شامل یک گردانه (روی میله افقی چرخنده) با حدود ۲۰ سانتی‌متر فاصله از زمین می‌باشد که توسط صفحات کروی به ۴ بخش جدا از هم تقسیم می‌شود. در این آزمون سرعت چرخیدن ۷ rpm در نظر گرفته شده که تقریباً ۱۱-۱۰ دور در دقیقه است. برای ارزیابی تعادل، رت بر روی گردانه در حال چرخش که سرعت آن در مدت ۵ دقیقه از ۵ به ۴۵ دور در دقیقه افزایش داده می‌شود، قرار گرفت و مدت حفظ تعادل و باقی ماندن بر روی میله برای هر رت ثبت گردید (۲۶).

آزمون شاتل باکس: دستگاه شاتل باکس شامل دو محفظه‌ی تاریک و روشن به همراه یک درب که دو محفظه را از هم جدا می‌کند است که حیوان در محفظه‌ی تاریک، شوک دریافت می‌کند. کار با این دستگاه شامل یک فاز آشناسازی (صرفاً جهت آشنایی حیوان با دستگاه و بدون دریافت شوک) و ۳ مرحله‌ی آموزش، آزمون و یادآوری است.

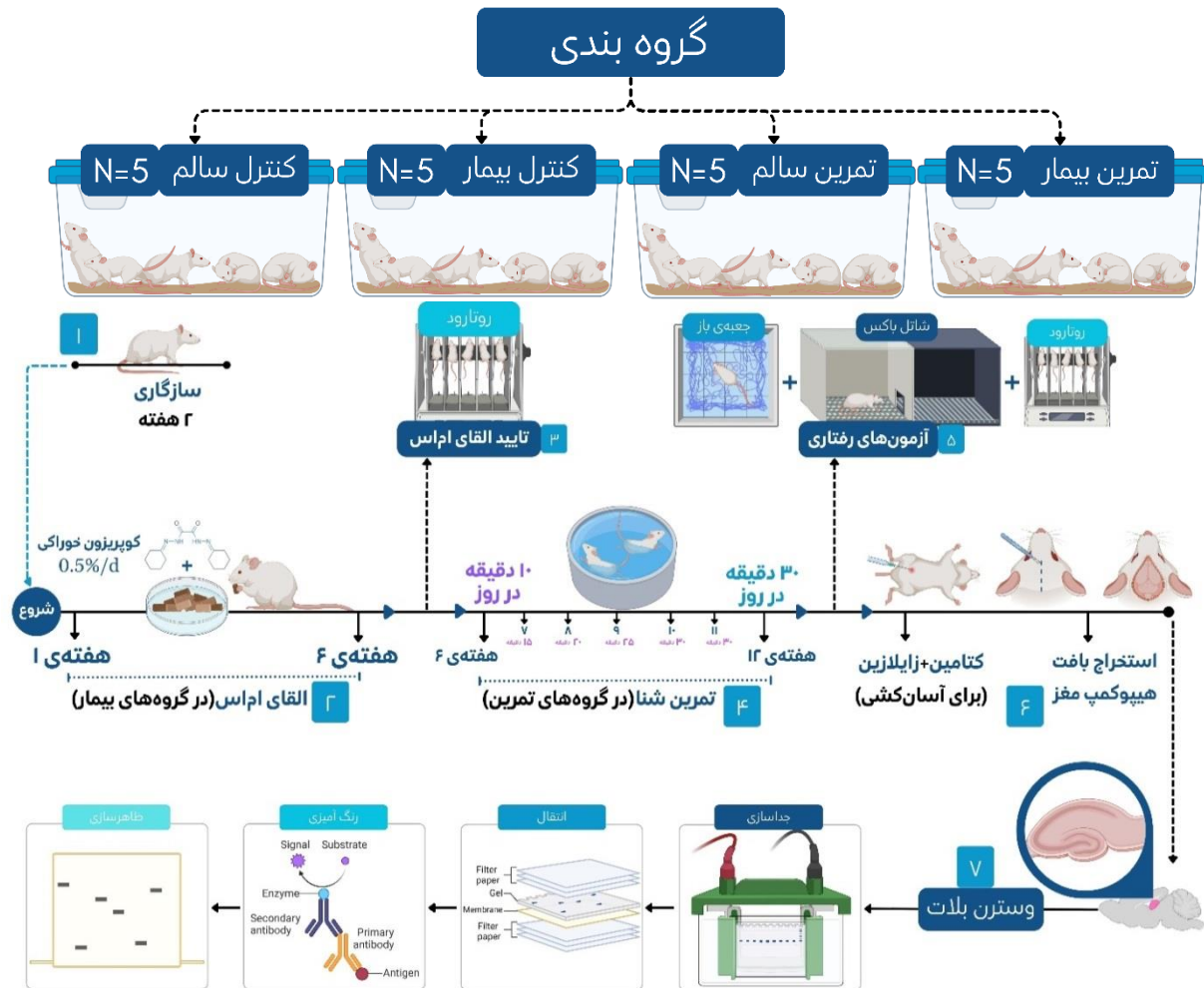
مرحله‌ی آموزش: ۲۴ ساعت بعد از آشناسازی، آزمودنی در درون دستگاه قرار گرفته و پس از گذشت ۱۰ ثانیه درب باز و به حیوان اجازه‌ی ورود به ناحیه‌ی تاریک داده می‌شود. به محض ورود حیوان به ناحیه‌ی تاریک درب بسته شده و شوک با شدت جریان مشخص (فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی‌آمپر و به مدت ۲ ثانیه) به پای حیوان اعمال شده و پس از گذشت ۲۰ ثانیه به قفس بازگردانده می‌شود.

آزمون: پس از ۲ دقیقه، حیوان دوباره در محفظه‌ی روشن قرار

داده می‌شود و اگر مجدداً وارد محفظه‌ی تاریک شود، شوک دریافت می‌کند. مدت زمان ماندن موش در ناحیه‌ی تاریک ۵ دقیقه است و اگر وارد ناحیه‌ی تاریک نشود، تعداد دفعات دریافت شوک را ثبت می‌کنیم. در صورت عدم ورود به ناحیه‌ی تاریک، آزمودنی از آزمایش حذف می‌شود.

مرحله‌ی به یادآوری: به منظور تست به خاطرآوری و حافظه‌ی درازمدت، ۲۴ ساعت بعد از آموزش، آزمودنی در قسمت روشن قرار داده شده و مشابه مراحل قبل بعد از ۱۰ ثانیه قرارگیری در ناحیه‌ی روشن، درب باز می‌شود اما به آزمودنی شوک وارد نمی‌شود. مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه‌ی تاریک و زمان سپری شده در محفظه‌ی تاریک به عنوان شاخص‌های حافظه اجتنابی درازمدت اندازه‌گیری می‌شوند. حداکثر زمان ماندن در ناحیه‌ی تاریک و روشن هر کدام ۵ دقیقه می‌باشد (۲۷) (شکل ۱). **پروتکل تمرینی:** پس از تأیید القای ام‌اس، برنامه‌ی تمرین شنای اختیاری در آب به مدت ۶ هفته، در استخر مخصوص جوندگان انجام شد. پروتکل تمرینی برگرفته از تحقیق Kim و همکاران در سال ۲۰۲۰ با اندکی تغییر است (۲۸). جهت رعایت اصل اضافه بار، تمرین شنای حیوانات به این صورت بود که مدت تمرین در هر هفته‌ی پنج دقیقه افزایش پیدا می‌کرد، به طوری که از ۱۰ دقیقه در هفته اول به ۳۰ دقیقه در هفته پنجم و ششم افزایش یافت.

سنجش پروتئین‌ها با استفاده از روش وسترن بلات: پس از پایان ۶ هفته تمرین، رت‌ها با استفاده از ترکیب کتامین و زایلازین (۱۰۰+۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از وزن بدن)، بی‌هوش و آسان‌کشی شدند و بافت هیپوکمپ جدا گردید. سپس نمونه‌ها به وسیله بافر لیزکننده با استفاده از دستگاه هموژنایزر (analytikjena، Speed Mill plus، آلمان) و با دور ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) هموژن شدند. در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. به منظور تعیین مقدار پروتئین در هموژن بافتی، از روش برادفورد استفاده شد. پس از انتقال نمونه‌ها در چاهک‌های الکتروفورز، جریان الکتریسیته ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ۶۰V و سپس به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰V برقرار شد. پس از الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE، ژل به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در بافر انتقال قرار داده شد. ساندویچی متشکل از ۵ لایه شامل دو لایه اسفنج، دو لایه کاغذ واتمن در دو طرف، یک لایه کاغذ نیترو سلولز و یک لایه ژل تهیه شدند. ساندویچ به همراه پایه کاست در تانک بلاتینگ قرار داده شد. پس از آن، فرایند انتقال با ولتاژ ۶۰ و به مدت ۱۰۵ دقیقه انجام شد. پس از شستشو با PBS، در مرحله‌ی بعد نمونه با آنتی‌بادی‌های اولیه COX-2 (D5H5) (Cox2



شکل ۱. طرح شماتیک از گروه‌بندی، نحوه‌ی القاء اماس با کوپریزون، آزمون‌های رفتاری، پروتکل تمرین شناختی، آسان‌کشی، استخراج بافت و سنجش پروتئین‌ها با روش وسترن بلات

گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین بیان شد. بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk انجام گرفت. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) و از آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه‌ی گروه‌های شاهد و آزمایش استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

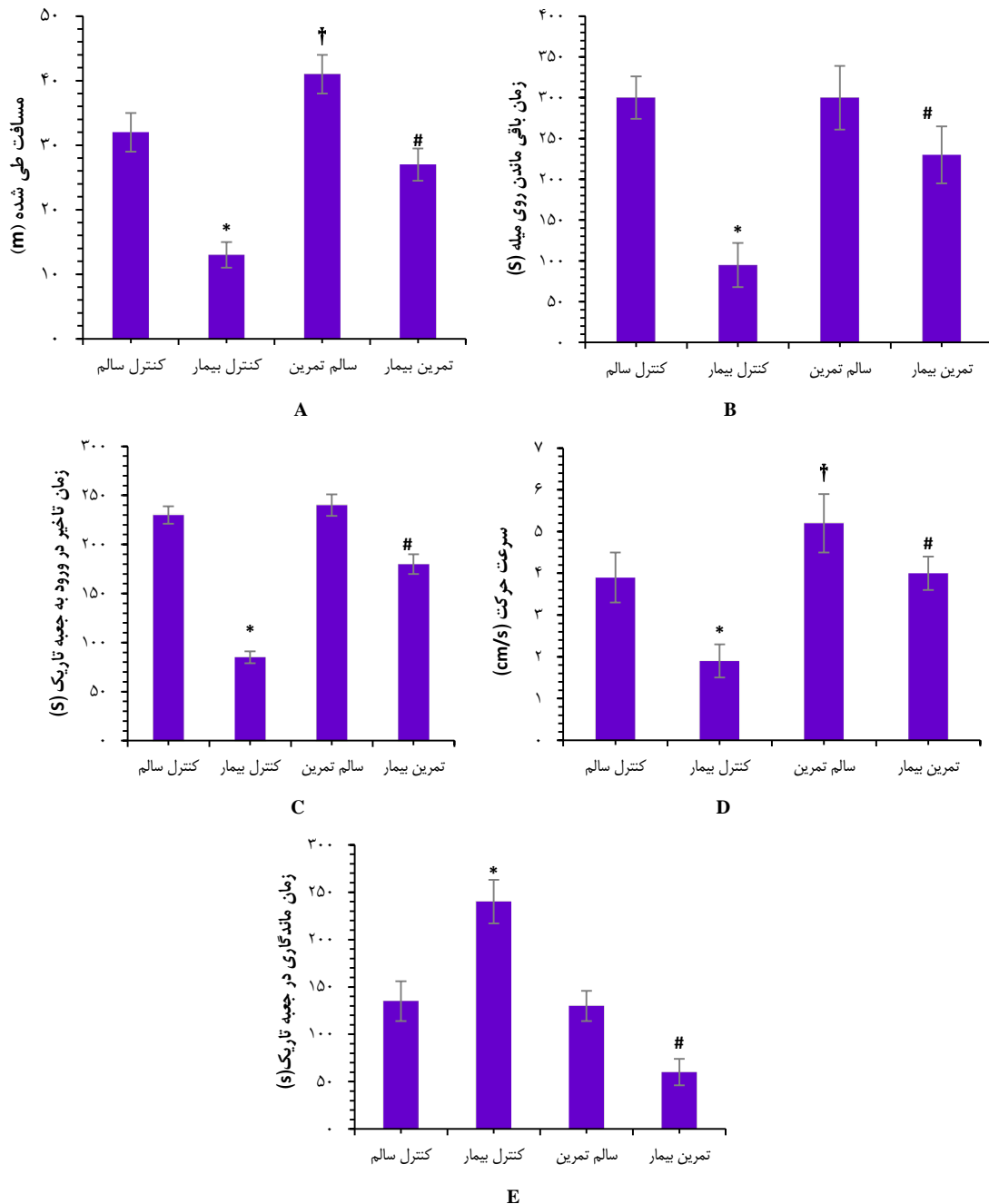
نتایج نشان داد که در آزمون رفتاری روتارود مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله در گروه شاهد بیمار در مقایسه با گروه شاهد سالم کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.001$) و شش هفته فعالیت شناختی اختیاری در گروه تمرین بیمار افزایش معنی‌داری را در مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله نسبت به گروه شاهد بیمار نشان داد.

iNOS (XP® Rabbit mAb: Cell Signaling Technology) و iNOS (D6B6S) Rabbit mAb: Cell Signaling Technology) با رقت ۱/۲۰۰۰ تا ۱/۵۰۰۰۰ در بافر PBS مورد بررسی قرار گرفتند. از آنتی‌بادی ثانویه (mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357) نیز با رقت ۱/۲۰۰۰ در بافر PBS برای اتصال به آنتی‌بادی اولیه به مدت ۱ ساعت استفاده شد. پس از آن در اتاق تاریک در زیر نور قرمز با استفاده از کیت ECL (۱۳۳۴۰۸، abcam، آمریکا) به مدت ۱ دقیقه کاغذ را به محلول ظهور آغشته کرده، سپس درون کاست محافظ پلاستیکی حاوی فیلم حساس قرار دادند و در دستگاه پردازشگر X-RAY (LD-14، چین) ظهور باندها انجام شد. کاغذهای حساس به نور با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (BonninTech، چین) اسکن و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار دستگاه JS 2000 مورد بررسی قرار گرفت.

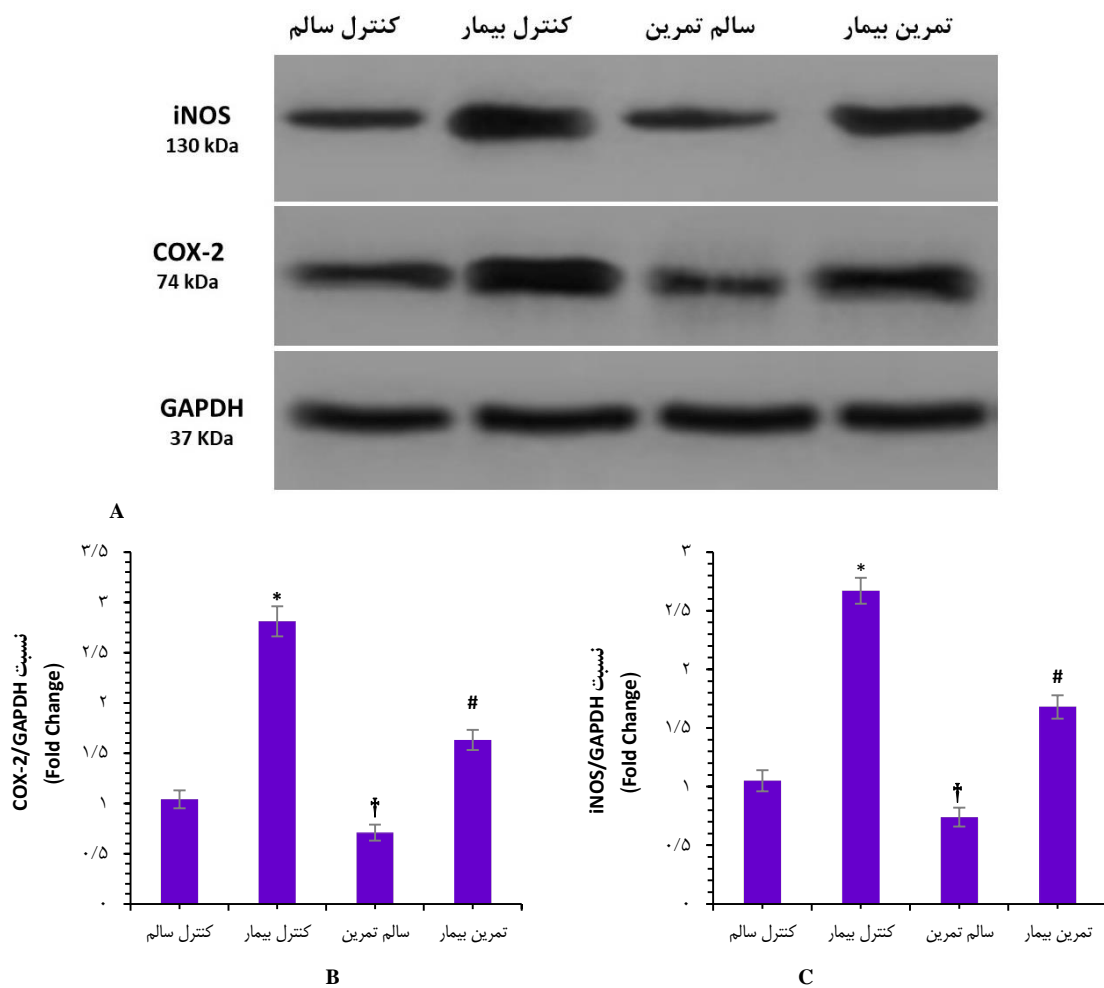
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵

به گروه شاهد بیمار نشان می‌دهد ($P < 0/001$). همچنین نتایج آزمون جعبه‌ای باز در گروه‌های سالم نشان داد که هم مسافت طی شده و هم سرعت حرکت در رت‌های گروه تمرین سالم نسبت به گروه شاهد سالم افزایش معنی‌داری یافته است ($P < 0/001$) (شکل ۲).

($P < 0/001$). نتایج حاصل از آزمون جعبه‌ای باز نشان داد که هم مسافت طی شده و هم سرعت حرکت در رت‌های گروه شاهد بیمار نسبت به گروه شاهد سالم کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0/001$) در حالی که این متغیرها در گروه تمرین بیمار افزایش قابل توجهی را نسبت



شکل ۲. نتایج آزمون‌های رفتاری در گروه‌های مختلف. (A) نتایج آزمون روتارود (زمان باقی ماندن روی میله)، (B و C) نتایج آزمون جعبه‌ای باز (مسافت طی شده و سرعت حرکت)، (D و E) نتایج آزمون شاتل باکس (زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک و زمان ماندگاری در جعبه تاریک). * : نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار گروه شاهد بیمار با گروه شاهد سالم؛ # : نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار گروه تمرین بیمار با گروه شاهد سالم؛ † : نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار گروه سالم تمرین و شاهد سالم ($P < 0/001$).



شکل ۳. (A) محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 در چهار گروه‌های مختلف با استفاده از روش وسترن بلات. (B, C) تجزیه و تحلیل باندهای وسترن بلات پروتئین‌های iNOS و COX-2 در گروه‌های مختلف. * نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار گروه شاهد بیمار با گروه شاهد سالم ($P < 0.001$); † نشانه تفاوت معنی‌دار گروه تمرین بیمار با گروه شاهد بیمار ($P < 0.05$); ‡ نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار گروه تمرین سالم با گروه شاهد سالم ($P < 0.05$).

پروتئین‌های iNOS و COX-2 در بافت هیپوکمپ رت‌های مدل ام‌اس القا شده با کوپریزون بود. کوپریزون با آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها، میلین‌زدایی، افزایش استرس اکسیداتیو و استرس شبکه‌ی آندوپلاسمی، تخریب آکسون‌ها، میکروگلیوز، آستروگلیوز، پراکسیداسیون لیپیدی منجر به ایجاد شرایطی کاملاً مشابه با بیماری ام‌اس می‌گردد و در نتیجه یکی از مناسب‌ترین مدل‌های تجربی برای بررسی سازوکارهای این بیماری محسوب می‌شود (۲۹)؛ بنابراین روش انتخابی ما برای القا ام‌اس در پژوهش حاضر استفاده از کوپریزون بود. بیماری ام‌اس یا استفاده از کوپریزون، با تأخیر در پتانسیل عمل ماهیچه‌ای و مرگ سلول‌های عصبی به ویژه در منحنی، موجب ایجاد اختلال در حرکت و تعادل می‌شود که با آزمون‌های رفتاری از قبیل روتارود، شاتل باکس و جعبه‌ی باز قابل مشاهده است (۳۰-۳۳). ما در

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه بیانگر تفاوت معنی‌دار مقادیر پروتئین‌ها در گروه‌های مختلف است ($P < 0.05$). نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 در گروه شاهد بیمار به صورت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد سالم افزایش یافت ($P < 0.001$)، همچنین مقادیر این پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه شاهد بیمار به صورت قابل توجهی کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$)، علاوه بر این، مقادیر پروتئین‌های iNOS و COX-2 در گروه تمرین سالم نسبت به شاهد کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$) (شکل ۳).

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی اثر تمرین شنای اختیاری بر محتوای

این مطالعه، این آزمون‌ها را برای تأیید وجود و القای بیماری و نیز بررسی اثرات تمرین شنا مورد استفاده قرار دادیم.

در این مطالعه از آزمون شاتل باکس برای بررسی حافظه و یادگیری استفاده شد. بر اساس یافته‌های آزمون روتارود، کاهش قابل توجه زمان باقی ماندن آزمودنی‌های گروه شاهد بیمار بر روی گردانه‌ی دستگاه، نشان از تأثیرگذاری کوپریزون بر القاء ام‌اس بود که منطبق با پژوهش‌های پیشین می‌باشد (۲۴). این زمان در گروه تمرین بیمار، پس از اجرای پروتکل تمرینی، به شکل قابل توجهی افزایش پیدا کرد با این وجود، نسبت به گروه‌های شاهد سالم و سالم تمرین کمتر بود که ممکن است این تفاوت با افزایش مدت دوره‌ی تمرین، کاهش یابد. بر اساس نتایج آزمون شاتل باکس، زمان تأخیر در ورود به محفظه‌ی تاریک در گروه شاهد بیمار به شکل معنی‌داری کاهش پیدا کرد اما زمان در گروه تمرین بیمار به اندازه‌ی قابل توجهی بیشتر بود که نشان از کاهش ظرفیت حافظه و یادگیری بر اثر بیماری و افزایش آن بر اثر تمرین دارد. با این وجود، در مورد پارامتر ذکر شده، بین گروه‌های شاهد سالم و سالم تمرین، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و همچنین زمان تأخیر گروه تمرین بیمار از گروه‌های سالم کمتر بود. به علاوه زمان باقی ماندن در محفظه‌ی تاریک به شکل قابل توجهی در گروه شاهد بیمار افزایش و در گروه تمرین بیمار کاهش پیدا کرد که با مطالعه‌ی Tomas-Roig و همکاران که کاهش مشابه را با قطع کوپریزون گزارش کردند، همسو بود (۳۴) و این کاهش، میزان ماندگاری گروه تمرین بیمار را نسبت به گروه‌های سالم به طور قابل توجهی کمتر کرد.

نتایج آزمون جعبه‌ی باز نشان داد که هم مسافت طی شده و هم سرعت حرکت در رت‌های مبتلا به MS کاهش یافته است که منطبق با مطالعات Tomas-Roig و همکاران (۳۴) و Han و همکاران (۳۵) بود که متعاقب یک دوره فعالیت شنای اختیاری به میزان قابل توجهی بهبود پیدا کرد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 در گروه شاهد بیمار نسبت به گروه شاهد سالم افزایش معنی‌داری یافته است که با نتایج مطالعه‌ی Kim و همکاران همسو بود (۲۸) که به نظر می‌رسد به دلیل افزایش سطوح سایتوکاین‌های التهابی و افزایش تحریک Nf-kB ناشی از القاء بیماری باشد.

همچنین نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که یک دوره فعالیت شنای اختیاری محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 در بافت هیپوکمپ آزمودنی‌های گروه بیمار تمرین کرده در مقایسه با گروه شاهد بیمار به صورت معنی‌داری کاهش داده است. همسو با این نتایج، Kim و همکاران نشان دادند که تمرین شنا موجب کاهش محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 و سایتوکاین‌های التهابی در گروه

بیمار مدل ام‌اس القا شده به ام‌اس تجربی به وسیله‌ی میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین ۳۳-۵۵ (MOG₃₃₋₅₅)، در مقایسه با گروه شاهد می‌شود و بزرگی و تأثیر این تغییرات با درمان دارویی (IFN-B) تفاوت قابل توجهی ندارد (۲۸).

Benson و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز کاهش محتوای iNOS در پاسخ به تمرین تردمیل اختیاری را در آزمودنی‌های مدل EAE نشان دادند (۳۶). یکی از سازوکارهای احتمالی این رخداد می‌تواند به دلیل تأثیر فعالیت ورزشی بر کاهش سطوح سایتوکاین‌های التهابی باشد (۱۴).

Kim و همکاران، کاهش سطوح IL-1B و TNF-a را در آزمودنی‌های مدل EAE، در پاسخ به تمرین شنا نشان دادند (۲۸). Donia و همکاران نیز در یک پژوهش با نمونه‌های انسانی مبتلا به ام‌اس، کاهش در سطوح TNF-a را در پاسخ به تمرین هوازی نشان دادند (۳۷). به‌طور مشابه Kierkegaard و همکاران نیز کاهش مشابه با مطالعات ذکر شده، در سطوح TNF-a بعد از ۱۲ هفته تمرین مقاومتی در نمونه‌های انسانی مبتلا به ام‌اس را نشان دادند (۳۸).

کاهش سطوح سایتوکاین‌هایی التهابی در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) از قبیل فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-a)، اینترلوکین ۱بتا (IL-1B) و INF-y با کاهش تحریک Nf-kB، می‌تواند باعث کاهش رونوشت آنزیم iNOS شود. با توجه به اینکه شنا، ورزشی با ماهیت ترکیبی (مقاومتی و هوازی) است احتمالاً می‌تواند اثرات مثبت خود را با سازگاری‌های مولکولی هر دو نوع تمرین بر بهبود بیماری اعمال کند (۲۲). ورزش، بر تکثیر الیگودندروسیت‌ها، قطورسازی غلاف‌های میلین از طریق فعال‌سازی PGC1-a، افزایش BDNF، کاهش نفوذپذیری سد خونی مغزی (BBB (Blood-brain barrier)، حفاظت مغز و جلوگیری از آتروفی آن (به ویژه هیپوکمپ)، بازیابی آکسونی و کاهش آستروگلیوسیز (که باعث کاهش سلول‌های ایمنی التهابی در CNS است)، اثر دارد (۳۹). به علاوه فعالیت ورزشی منظم می‌تواند باعث کاهش نسبت نوتروفیل به لنفوسیت شود (که با میزان اختلالات جسمی - حرکتی مبتلایان به ام‌اس در ارتباط است) (۴۰) و از التهاب و تخریب عصب جلوگیری کند (۴۱).

داروها در خط اول درمان ام‌اس قرار دارند تا عملکرد دستگاه ایمنی و تأثیر آن بر CNS را اصلاح کنند؛ اما تهی از عوارض جانبی نیستند (۴۲) و نیاز به روش‌های بدون عارضه در کنار درمان دارویی احساس می‌شود. از این رو می‌توان فعالیت ورزشی، به خصوص تمرین شنا را، به عنوان روشی مؤثر، ایمن، غیرتهاجمی و بی‌عارضه برای بهبود بیماری ام‌اس در نظر گرفت. با توجه به درگیری مسیرهای سیگنالی مختلف در بروز اختلالات تخریب عصبی ناشی از بیماری ام‌اس و نیاز به بررسی‌های بافت‌شناسی در نواحی مختلف سیستم

درمانی آن مورد نیاز است.

عصبی مرکزی، لزوم انجام مطالعات گسترده‌تر و دقیق‌تر در این زمینه احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی ورزشی می‌باشد که در دانشگاه شهید چمران اهواز به تصویب رسیده و با حمایت مالی/اعتبار پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره SCU.SS1402.266 به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات و پشتیبانی‌های معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز تقدیر و تشکر می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، می‌توان اظهار داشت که تمرینات شنا با تأثیر مثبتی که بر روی تنظیم و تعدیل محتوای پروتئین‌های iNOS و COX-2 و نتایج آزمون‌های رفتاری دارد، می‌تواند در بهبود عملکرد سیستم عصبی مرکزی، به خصوص ناحیه‌ی هیپوکمپ، بیماران مبتلا به ام‌اس مؤثر بوده و به عنوان یک راهبرد غیر دارویی امیدوارکننده باشد. اما به هر حال برای کاربرد بالینی این تمرینات در درمان بیماران مبتلا به MS مطالعات بیشتر در خصوص این شیوه‌ی تمرینی و پتانسیل‌های

References

- Calahorra L, Camacho-Toledano C, Serrano-Regal MP, Ortega MC, Clemente D. Regulatory cells in multiple sclerosis: From blood to brain. *Biomedicines* 2022; 10(2): 335.
- Disanto G, Zecca C, MacLachlan S, Sacco R, Handunnetthi L, Meier UC, et al. Prodromal symptoms of multiple sclerosis in primary care. *Ann Neurol* 2018; 83(6): 1162-73.
- Förster M, Nelke C, Räuber S, Lassmann H, Ruck T, Sormani MP, et al. Nitrosative Stress Molecules in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. *Biomedicines* 2021; 9(12): 1899.
- Khaledi E, Noori T, Mohammadi-Farani A, Suredda A, Dehpour AR, Yousefi-Manesh H, et al. Trifluoperazine reduces cuprizone-induced demyelination via targeting Nrf2 and IKB in mice. *Eur J Pharmacol* 2021; 909: 174432.
- Shefa U, Yeo SG, Kim MS, Song IO, Jung J, Jeong NY, et al. Role of gasotransmitters in oxidative stresses, neuroinflammation, and neuronal repair. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 1689341.
- Kamble M, Saadi F, Kumar S, Saha B, Sarma JD. Inducible Nitric Oxide Synthase deficiency leads to early demyelination by altering the balance between pro-and anti-inflammatory responses against Murine-β-Coronavirus. *bioRxiv* 2022: 2022.02.08.479662.
- Kumar N, Gupta G, Anilkumar K, Fatima N, Karnati R, Reddy GV, et al. Lipoxigenase metabolites of α-linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* 2016; 6(1): 31649.
- Ferrer MD, Busquets-Cortés C, Capó X, Tejada S, Tur JA, Pons A, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Curr Med Chem* 2019; 26(18): 3225-41.
- Tang X, Li Z, Zhang W, Yao Z. Nitric oxide might be an inducing factor in cognitive impairment in Alzheimer's disease via downregulating the monocarboxylate transporter 1. *Nitric Oxide* 2019; 91: 35-41.
- Nakamura T, Cho DH, Lipton SA. Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol* 2012; 238(1): 12-21.
- Lan M, Tang X, Zhang J, Yao Z. Insights in pathogenesis of multiple sclerosis: nitric oxide may induce mitochondrial dysfunction of oligodendrocytes. *Rev Neurosci* 2018; 29(1): 39-53.
- Ghasemi M, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 45: 168-82.
- Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 2004; 149(1-2): 40-9.
- Metsios GS, Moe RH, Kitis GD. Exercise and inflammation. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2020; 34(2): 101504.
- Lin JY, Kuo WW, Baskaran R, Kuo CH, Chen YA, Chen WS, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(8): 6852-64.
- Kim TW, Park SS, Shin MS, Park HS, Baek SS. Treadmill exercise ameliorates social isolation-induced memory impairment by enhancing silent information regulator-1 expression in rats. *J Exerc Rehabil* 2020; 16(3): 227-33.
- Campbell E, Coulter EH, Paul L. High intensity interval training for people with multiple sclerosis: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord* 2018; 24: 55-63.
- Taul-Madsen L, Connolly L, Dennett R, Freeman J, Dalgas U, Hvid LG. Is aerobic or resistance training the most effective exercise modality for improving lower extremity physical function and perceived fatigue in people with multiple sclerosis? A systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 2021; 102(10): 2032-48.
- Langeskov-Christensen M, Hvid LG, Jensen HB, Nielsen HH, Petersen T, Stenager E, et al. Efficacy of

- high-intensity aerobic exercise on common multiple sclerosis symptoms. *Acta Neurol. Acta Neurol Scand* 2022; 145(2): 229-38.
20. Torres-Costoso A, Martínez-Vizcaíno V, Reina-Gutiérrez S, Álvarez-Bueno C, Guzmán-Pavón MJ, Pozuelo-Carrascosa DP, et al. Effect of exercise on fatigue in multiple sclerosis: A network meta-analysis comparing different types of exercise. *Arch Phys Med Rehabil* 2022; 103(5): 970-87.e18.
 21. Mahalakshmi B, Maurya N, Lee SD, Kumar VB. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; 21(16): 5895.
 22. Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lécolle S, et al. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 2009; 587(Pt 14): 3561-72.
 23. Zimmermann J, Emrich M, Krauthausen M, Saxe S, Nitsch L, Heneka MT, et al. IL-17A Promotes granulocyte infiltration, myelin loss, microglia activation, and behavioral deficits during cuprizone-induced demyelination. *Mol Neurobiol* 2018; 55(2): 946-57.
 24. Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor behavioral deficits in the cuprizone model: Validity of the rotarod test paradigm. *Int J Mol Sci* 2022; 23(19): 11342.
 25. Ghotbeddin Z, Basir Z, Jamshidian J, Delfi F. Modulation of behavioral responses and CA1 neuronal death by nitric oxide in the neonatal rat's hypoxia model. *Brain Behav* 2020; 10(11): e01841.
 26. Ghotbeddin Z, Khazaeel K, Tabandeh MR, Aliheydari M, Yaghoubi H. Effects of omega-3 fatty acid supplementation during chronic maternal hypoxia on behavioral disorders in male rat offspring: The role of Trk family and oxidative stress. *Metab Brain Dis* 2022; 37(6): 1959-67.
 27. Zarrindast MR, Farajzadeh Z, Rostami P, Rezayof A, Nourjah P. Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. *Behav Brain Res* 2005; 163(1): 100-6.
 28. Kim JY, Yi ES, Lee H, Kim JS, Jee YS, Kim SE, et al. Swimming exercise ameliorates symptoms of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting inflammation and demyelination in rats. *Int Neurol J* 2020; 24(Suppl 1): S39-47.
 29. Hagemeyer K, Lürbke A, Hucke S, Albrecht S, Preisner A, Klassen E, et al. Puma, but not noxa is essential for oligodendroglial cell death. *Glia* 2013; 61(10): 1712-23.
 30. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 2007; 100(2): 295-306.
 31. Hashemi R, Morshedi M, Asghari Jafarabadi M, Altafi D, Saeed Hosseini-Asl S, Rafie-Arefhosseini S. Anti-inflammatory effects of dietary vitamin D(3) in patients with multiple sclerosis. *Neurol Genet* 2018; 4(6): e278.
 32. Ünsal C, Özcan M. Neurotoxicity of cuprizone in female and male rats: Electrophysiological observations. *Neurophysiol* 2018; 50: 108-15.
 33. Omotoso GO, Gbadamosi IT, Afolabi TT, Abdulwahab AB, Akinlolu AA. Ameliorative effects of Moringa on cuprizone-induced memory decline in rat model of multiple sclerosis. *Anat Cell Biol* 2018; 51(2): 119-27.
 34. Tomas-Roig J, Torrente M, Cabré M, Vilella E, Colomina MT. Long lasting behavioural effects on cuprizone fed mice after neurotoxicant withdrawal. *Behav Brain Res* 2019; 363: 38-44.
 35. Han SR, Kang YH, Jeon H, Lee S, Park SJ, Song DY, et al. Differential expression of miRNAs and behavioral change in the cuprizone-induced demyelination mouse model. *Int J Mol Sci* 2020; 21(2): 646.
 36. Benson C, Paylor JW, Tenorio G, Winship I, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* 2015; 271: 279-90.
 37. Donia SA, Allison DJ, Gammage KL, Ditor DS. The effects of acute aerobic exercise on mood and inflammation in individuals with multiple sclerosis and incomplete spinal cord injury. *NeuroRehabilitation* 2019; 45(1): 117-24.
 38. Kierkegaard M, Lundberg IE, Olsson T, Johansson S, Ygberg S, Opava C, et al. High-intensity resistance training in multiple sclerosis - An exploratory study of effects on immune markers in blood and cerebrospinal fluid, and on mood, fatigue, health-related quality of life, muscle strength, walking and cognition. *J Neurol Sci* 2016; 362: 251-7.
 39. Guo LY, Lozinski B, Yong VW. Exercise in multiple sclerosis and its models :Focus on the central nervous system outcomes. *J Neurosci Res* 2020; 98(3): 509-23.
 40. Joisten N, Proschinger S, Rademacher A, Schenk A, Bloch W, Warnke C, et al. High-intensity interval training reduces neutrophil-to-lymphocyte ratio in persons with multiple sclerosis during inpatient rehabilitation. *Mult Scler J* 2021; 27(7): 1136-9.
 41. Song SH, Jee YS, Ko IG, Lee SW, Sim YJ, Kim DY, et al. Treadmill exercise and wheel exercise improve motor function by suppressing apoptotic neuronal cell death in brain inflammation rats. *J Exerc Rehabil* 2018; 14(6): 911-9.
 42. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol* 2019; 15(1): 53-8.

The Effects of Voluntary Swimming on iNOS and COX-2 Protein Contents as Well as Memory and Motor Performance in Cuprizone-Induced Multiple Sclerosis Rats Model

Sayed Shafa Marashi¹, Mohammad Rami², Saeed Shakeryan³, D. Maryama Awang Daud⁴

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease that affects the central nervous system and is mediated by the immune system. Since physical activity has anti-inflammatory and anti-oxidative effects, Therefore, this study aims to investigate the effect of voluntary swimming activity on the iNOS & COX-2 protein content, as well as the cognitive and motor performance of the Multiple Sclerosis rats model.

Methods: In the present study, 20 rats with an average age of 12 weeks were categorized into four groups, including healthy control, MS control, healthy training, and MS training. To induce MS, the rats of the MS groups were fed food infused with 0.5% cuprizone throughout the entire 12-week research protocol. After the end of 6 weeks of training protocol and conducting behavioral tests, the hippocampus tissue was extracted, and the number of proteins was measured using the western blot method.

Findings: The results of the memory and motor function tests revealed that subjects with MS had impaired memory function, motor activity, and difficulty maintaining balance. However, following a period of swimming activity, these functions significantly improved. The results also showed that the levels of iNOS and COX-2 proteins in the MS control group were significantly elevated compared to the healthy control group. On the other hand, the MS training group showed significant reductions in the levels of these proteins compared to the MS control group.

Conclusion: Based on the results of the current research, voluntary swimming exercise activity could potentially lead to more nerve protection and improvement of memory function, motor activity, and balance in patients with MS and can be promising as a non-pharmacological treatment strategy.

Keywords: Swimming; Multiple sclerosis; Hippocampus; Exercise

Citation: Marashi SS, Rami M, Shakeryan S, Awang Daud DM. **The Effects of Voluntary Swimming on iNOS and COX-2 Protein Contents as Well as Memory and Motor Performance in Cuprizone-Induced Multiple Sclerosis Rats Model.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(748): 1118-27.

1- MSc, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Health Through Exercise and Active Living (HEAL) Research Unit, Department of Biomedical Sciences, School of Medicine and Health Sciences, University Malaysia Sabah, Kota Kinabalu 88400, Jalan UMS, Kota Kinabalu 88450, Sabah, Malaysia

Corresponding Author: Mohammad Rami, Assistant Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: m.rami@scu.ac.ir