

# The Effect of Four Weeks of Physical Activity on Rac1 Protein Levels and Plasticity of WDR Neurons in the Dorsal Horn of The Spinal Cord in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Amir Hossein Saffar Kohneh Quchan, Mohammad Reza Kordi\*, Fatemeh Shabkhiz

Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

## Article Info:

Received: 5 May 2022

Revised: 20 July 2022

Accepted: 2 Oct 2022

## ABSTRACT

**Introduction:** Changes in the morphology of dendrites and the function of nerve circuits in pain-sensing neurons in the dorsal horn of the spinal cord ultimately lead to neuropathic pain. Increased expression of Rac1 is associated with increased size and density of dendritic spines and increased pain threshold in multiple sclerosis (MS). This study aimed to investigate the effect of four weeks of physical activity in an enriched environment on Rac1 and structural changes of WDR neurons in the dorsal horn of the spinal cord, and pain sensitivity in the chronic course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model used to study the immunopathogenesis of MS. **Materials and Methods:** Thirty female C57BL6 mice were randomly divided into three groups. The first group was induced with MOG35-55 peptide (EAE group), the second group received a saline injection (healthy control group), and the third group, after induction with MOG35-55, was placed in the cage of the enriched environment (group living in enriched environment + EAE). On day 30 post-induction (chronic period of the disease), the formalin test assessed pain sensitivity. Then the mice were anesthetized with ketamine and xylazine, and the spinal cord tissue was removed. Rac1 protein levels were measured by immunohistochemistry. The length and density of dendritic spines were assessed using the Golgi-Cox staining. **Results:** Our findings showed that living in an enriched environment significantly reduced RAC1 levels, the length and density of dendritic spines of WDR neurons in the dorsal horn of the spinal cord, and pain sensitivity compared to the EAE group. **Conclusion:** Changing the environment and lifestyle to a happy and enriched environment and active lifestyle could reduce pain sensitivity in MS by preventing structural changes in pain-sensing neurons in the dorsal horn of the spinal cord.

## Keywords:

1. Neuralgia
2. Multiple Sclerosis
3. Neuronal Plasticity
4. Exercise

\*Corresponding Author: Mohammad Reza Kordi

Email: [mrkordi@ut.ac.ir](mailto:mrkordi@ut.ac.ir)



## تأثیر چهار هفته فعالیت بدنی بر سطوح پروتئین Rac1 و پلاستیسیته نورون‌های WDR در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی

امیرحسین صفارکهنه قوچان، محمدرضا کردی\*، فاطمه شب خیز

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۱۰ مهر ۱۴۰۱

اصلاحیه: ۲۹ تیر ۱۴۰۱

دریافت: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۱

### چکیده

**مقدمه:** تغییر در مورفولوژی دندریت‌ها و عملکرد مدارهای عصبی در نورون‌های درک کننده درد در شاخ خلفی نخاع در نهایت منجر به درد نوروپاتی می‌شود. افزایش در بیان Rac1 با افزایش اندازه و تراکم خارهای دندریتی و افزایش تحریک پذیری درد در بیماری MS همراه است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر چهار هفته فعالیت بدنی در محیط غنی شده بر Rac1 و تغییرات ساختاری نورون‌های WDR در شاخ خلفی نخاع و حساسیت به درد در دوره مزمن بیماری انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE)، مدل حیوانی مورد استفاده برای مطالعه ایمونوپاتوژنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس، می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** ۳۰ سر موش C57BL6 ماده به صورت تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول، با پپتید MOG35-55 القا شدند (گروه EAE)، گروه دوم، تزریق سالین داشتند (گروه کنترل سالم)، و گروه سوم، پس از القا با MOG35-55 در قفس محیط غنی شده قرار گرفتند (گروه زندگی در محیط غنی شده + EAE). در روز ۳۰ پس از القا (دوره مزمن بیماری EAE) حساسیت به درد با آزمون فرمالین انجام شد و سپس موش‌ها با تزریق کتامین و زایلازین بیهوش و بافت نخاع برداشته شد. سطوح پروتئین Rac1 با روش ایمونوهیستوشیمی و طول و تراکم خارهای دندریت با روش گلژی کاکس اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** یافته‌های پژوهش ما نشان داد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین Rac1، طول و تراکم خارهای دندریت نورون‌ها را در شاخ خلفی نخاع و حساسیت به درد را به طور معنی‌داری کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** تغییر محیط و سبک زندگی به محیطی شاد و غنی شده و سبک زندگی فعال می‌تواند با جلوگیری از تغییرات ساختاری نورون‌های درک کننده درد در شاخ خلفی نخاع حساسیت به درد را در بیماری MS کاهش دهد.

### واژه‌های کلیدی:

- ۱- نورالژی
- ۲- مالتیپل اسکلروز
- ۳- پلاستیسیته نورونی
- ۴- فعالیت ورزشی

\*نویسنده مسئول: محمدرضا کردی

پست الکترونیک: mrkordi@ut.ac.ir

## مقدمه

LTP می‌تواند در مسیرهای عصبی مرتبط با درد ایجاد شود و به افزایش غیر طبیعی حساسیت به درد ناشی<sup>۱</sup> از التهاب یا نوروپاتی کمک کند (۶). در شرایط پاتولوژیک بیماری MS افزایش التهاب باعث تغییرات ساختاری در دندریت نورون‌های با دامنه دینامیکی گسترده (WDR)<sup>۵</sup> در شاخ خلفی نخاع می‌شود که این تغییرات ساختاری با افزایش انتقال گلوتاماترژیک<sup>۶</sup> و اختلال در انتقال گابارژیک<sup>۷</sup> همراه است (۵). این تغییرات منجر به افزایش LTP و افزایش غیر طبیعی حساسیت به درد می‌شود که باعث می‌شود بیمار مبتلا به MS به محرک‌های غیر دردناک نیز با درد پاسخ بدهد (۵، ۶). با توجه به اهمیت پلاستیسیته ساختاری و عملکردی در DH در توسعه درد مزمن عصبی، عصب شناسان به دنبال جلوگیری از این تغییرات به منظور کنترل درد هستند. یکی از موثرترین راه‌ها مهار کیناز Rac1 است. Rac1 یک پروتئین داخل سلولی کوچک در خانواده Rho-GT-Pase است که مجموعه‌ای از عملکردهای سلولی از جمله سازماندهی اکتین اسکلت سلولی و خوشه‌بندی گیرنده گلوتاماترژیک AMPA در غشای خارهای دندریت نورون پس سیناپسی می‌شود (۷). افزایش بیش از حد در بیان Rac1 با افزایش اندازه و تراکم خارهای دندریتی، افزایش LTP و افزایش تحریک پذیری درد در مدل‌های مختلف درد عصبی همراه است (۷). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که مهار Rac1 به کمک مداخلات دارویی موجب کاهش تغییرات ساختاری و الکتروفیزیولوژیایی در نورون‌های WDR در مدل‌های مربوط به درد عصبی می‌شود (۸). انسفالومیلیت خودایمنی تجربی<sup>۸</sup> (EAE) مدل حیوانی بیماری MS است که پیشرفت این بیماری را در مرحله مزمن تقلید می‌کند و منجر به تخریب غلاف میلین در آکسون و التهاب در CNS می‌شود (۹). پژوهش‌ها نشان داده‌اند، مدل EAE رفتارهای درد و پاتولوژی مشابه با موارد مشاهده شده در افراد مبتلا به MS را نشان می‌دهد بنابراین می‌تواند برای مطالعه رفتار درد و تغییرات ساختاری در سیستم عصبی مورد استفاده قرار بگیرد (۱۰). فعالیت ورزشی و سبک زندگی فعال و به دور از استرس به‌عنوان یک مداخله غیر دارویی نقش مهمی در جلوگیری از تخریب عصبی و بهبود علائم ثانویه ناشی از این تخریب از جمله، خستگی، درد مزمن عصبی و افسردگی در بیماران مبتلا به MS دارد (۱۱). فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق کاهش بیان سلول‌های گلیا، مهار التهاب، استرس اکسیداتیو و افزایش فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)<sup>۹</sup> در شاخ خلفی نخاع و ریشه‌های خلفی گانگلیون<sup>۱۰</sup> از تغییر شکل و تخریب نورون‌های حس کننده درد جلوگیری

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی است که با التهاب و تخریب غلاف میلین همراه است. اصلی‌ترین پیامد بیماری MS کاهش پیشرونده عملکرد حرکتی است اما بسیاری از بیماران علائم ثانویه مثل اختلالات شناختی، اختلال در عملکرد مثانه، خستگی و درد را نیز تجربه می‌کنند. درد مزمن عصبی یکی از مشکلات ثانویه مهم در ۵۰ درصد بیماران مبتلا به MS است که کیفیت زندگی آن‌ها را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). درد در بیماران MS با افزایش حساسیت به محرک‌های غیر دردناک مثل لمس کردن پوست و پاسخ‌های طولانی مدت به محرک‌های دردناک مثل جراحی همراه است که برای بیماران بسیار آزاردهنده است. درد مزمن عصبی در بیماران MS به دلایل مختلفی از جمله افزایش التهاب، تخریب غلاف میلین و آسیب آکسونی در شاخ خلفی نخاع یا در تالاموس ایجاد می‌شود. یکی از مکانیسم‌های درد مزمن عصبی افزایش حساسیت مرکزی<sup>۱</sup> در سیناپس‌های شاخ خلفی<sup>۲</sup> نخاع (DH) است (۲). حساسیت مرکزی، افزایش پاسخ نورون‌های درک کننده درد به درون داد‌های طبیعی عصب‌های آوران است که به دلیل تغییرات ساختاری و عملکردی در این نورون‌ها یا همان پلاستیسیته عصبی رخ می‌دهد (۲). پلاستیسیته عصبی به معنی گسترده توانایی یادگیری و سازگاری عملکرد نورونی به تاثیرات محیطی و تغییرات ذاتی است. در زمینه درد پلاستیسیته عصبی به معنای تغییر در عملکرد مسیرهای عصبی درد برای سازگار شدن با درد مکرر و پیوسته ناشی از بیماری‌های التهابی و اختلالات نوروپاتی است (۳). التهاب ناشی بیماری‌های عصبی باعث تغییر در مورفولوژی خار دندریت‌ها و عملکرد مدارهای عصبی در نورون‌های درک کننده درد در شاخ خلفی نخاع و در نهایت درد مزمن عصبی می‌شود (۴). این تغییرات شامل افزایش تراکم خارهای دندریت نورون‌ها، توزیع مجدد خارهای دندریتی نزدیک به جسم سلولی و افزایش قطر سر خارهای دندریت است (۴). در سطح سلولی، این تغییرات در ساختار دندریت‌ها باعث افزایش جریان تحریکی به نورون پس سیناپسی می‌شود که با افزایش حساسیت به درد همراه است (۴). همچنین این افزایش در سبک و تراکم در خارهای دندریت نورون‌ها باعث افزایش تقویت طولانی مدت (LTP)<sup>۳</sup> می‌شود (۵). به طور کلی LTP به‌عنوان افزایش طولانی مدت در قدرت سیناپسی بین دو نورون پیش و پس سیناپسی تعریف می‌شود. LTP در سیناپس‌های هیپوکامپ عامل اصلی در یادگیری و شکل‌گیری حافظه است. با این وجود مطالعات اخیر نشان می‌دهد که

<sup>1</sup> Central sensitisation

<sup>2</sup> Dorsal horn

<sup>3</sup> Long-term potentiation

<sup>4</sup> Hyperalgesia

<sup>5</sup> Wide-dynamic-range (WDR) neurons

<sup>6</sup> Glutamatergic

<sup>7</sup> GABAergic

<sup>8</sup> Experimental autoimmune encephalomyelitis

<sup>9</sup> Brain-Derived Neurotrophic Factor

<sup>10</sup> Dorsal root ganglion

## القای EAE و ارزیابی بالینی

القای EAE بر روی موش‌ها در موسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری انجام شد. ۵۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیتس گلیکوپروتئین (MOG35-55) که در ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافرشده با فسفات (PBS) و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر ادوجوانت کامل فروند (CFA)<sup>۱۳</sup> مخلوط کرده و به صورت زیر جلدی در ناحیه هر دو پهلو حیوان تزریق شد. تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۲ (در روز تزریق و دو روز بعد از آن)، به صورت داخل صفاقی ۱۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین داشتند (۱۸). لازم به ذکر است گروه کنترل همزمان با باقی گروه‌ها تزریق سالین داشت. برای ارزیابی وزن بدن حیوانات روزانه وزن کشی شدند و علائم بالینی EAE توسط دو ناظر مستقل بر اساس مقیاس زیر مورد ارزیابی قرار گرفت: نمره ۰= بدون بیماری؛ نمره ۱= ضعف و فلجی در دم؛ نمره ۲= ضعف در اندام عقبی؛ نمره ۳= فلج کامل اندام عقبی؛ نمره ۴= فلج اندام عقبی با ضعف یا فلج در اندام جلویی؛ و نمره ۵= مرگ (۱۹).

## پروتکل فعالیت بدنی در محیط غنی شده

محیط غنی شده محیطی طراحی شده برای تسهیل فعالیت بدنی، شناختی و اجتماعی با تهیه تجهیزات و سازماندهی یک محیط ساختار یافته و پویا است (۲۰). پس از القای EAE موش‌ها برای زندگی به قفسی با محیط غنی شده با مشخصات [۱×۱×۱ متر (طول، عرض، ارتفاع)] با ۳ ویل رانینگ، اسباب بازی، نردبان، لوله‌های پلاستیکی، بطری‌های آب و ظروف غذا منتقل شدند و در کل دوره در این قفس زندگی کردند (۲۱). تعداد دور های ویل رانینگ و فعالیت موش‌ها در قفس غنی شده به وسیله یک مورد کامپیوتری ثبت شد.

## آزمون فرمالین

در روز ۳۰ پس از القا ۲۰ میکرولیتر فرمالین ۱ درصد به پنجه عقب سمت راست موش‌هایی که نمره بالینی ۱ را نشان داده بودند به صورت زیر جلدی تزریق شد. مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پایی که فرمالین به آن تزریق شده بود. به عنوان نشانگر پاسخ به درد در نظر گرفته شد. پاسخ به درد در دو فاز اول (۵ دقیقه) و فاز دوم (۳۰-۲۰ دقیقه) پس از تزریق فرمالین مشخص شد (۲۲).

## روش ایمونوهیستوشیمی

مکان‌یابی پروتئین‌های Rac1 در شاخ خلفی نخاع با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در ۵ نمونه از هر گروه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های نخاع با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته

کند (۱۲). در همین راستا بنسون<sup>۱۱</sup> و همکاران نشان دادند که فعالیت ورزشی اختیاری نفوذ سلول های ایمنی، استرس اکسیداتیو و التهاب را در شاخ خلفی نخاع موش های مبتلا به EAE کاهش داد علاوه بر این فعالیت ورزشی اختیاری فعالیت نورون ها و گیرنده های گلوتامات را تعدیل کرد که منجر به کاهش حساسیت به درد شد (۱۳). همچنین، چیانگ<sup>۱۲</sup> و همکاران نشان دادند، افراد مبتلا به دیابت فعال (انجام ۳۰ دقیقه یا بیشتر فعالیت ورزشی در روز) در مقایسه با افرادی که فعالیت نمی کردند و افراد کم تحرک (انجام فعالیت ورزشی کمتر از ۳۰ دقیقه در روز) کمتر در معرض خطر درد عصبی بودند (۱۴). محیط غنی سازی شده که نوعی فعالیت اختیاری است، شامل قفس های بزرگی می باشد که تعامل اجتماعی، فعالیت بدنی و فعالیت های حسی و شناختی را به صورت همزمان فراهم می کند که نتیجه ی آن پذیرا تر بودن سیستم عصبی مرکزی برای درمان های دارویی نسبت به روش های تمرینی اجباری است (۱۵). از آنجایی که جلوگیری از افزایش التهاب و تغییر در ساختار و عملکرد نورون های حس کننده درد با انتخاب نوع مناسب فعالیت ورزشی می تواند نقش مهمی در کنترل درد مزمن عصبی داشته باشد (۱۶)، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر سبک زندگی فعال و زندگی در محیط غنی سازی شده بر تغییر ساختار نورون های WDR در شاخ خلفی نخاع و تحریک پذیری درد در موش های ماده مبتلا به EAE است.

## مواد و روش ها

## روش پژوهش

۳۰ سر موش ماده C57BL/6 ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی  $18 \pm 2$  از انیستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه منتقل و پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه در هفته اول، به صورت تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. در گروه اول با MOG35-55 القای EAE انجام شد (گروه کنترل EAE)، گروه دوم، تزریق سالین داشتند (گروه کنترل سالم)، و گروه سوم، پس از القای EAE با-MOG35-55 در قفس محیط غنی شده که شامل ویل رانینگ، اسباب بازی، نردبان و لوله های پلاستیکی است قرار گرفتند (گروه زندگی در محیط غنی شده + EAE). در روز ۳۰ پس از القا (دوره مزمن بیماری EAE) که در این دوره علائم بالینی با یک کاهش جزئی نسبت به دوره اوج بیماری تقریباً به ثبات می‌رسند (۱۷)، تست های رفتاری مربوط به تحریک پذیری درد انجام و سپس موش ها با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) بیهوش سپس تشریح و بافت برداری شدند.

<sup>11</sup> Benson<sup>12</sup> Chiang<sup>13</sup> Complete Freund's Adjuvant

شوند. به منظور باز یابی آنتی ژنی بر روی نمونه ها اسیدکلریدریک ۲ طبیعی به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد سپس بافر بورات به منظور خنثی سازی اسید به مدت ۵ دقیقه اضافه و سلول ها با PBS شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذ پذیر کردن غشاء سلول ها استفاده شد. سپس نمونه ها دوباره با PBS شسته شدند و سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. نمونه ها با PBS شستشو و آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS را بر روی نمونه ها ریخته و یک ساعت در دمای محیط قرار داده می شود. پس از آن نمونه ها را ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده و ۱۰۰ لانداز (Linker PVP1000D-BioSystems Diagnostic) به مدت ۱۵ دقیقه به نمونه ها اضافه می شود. در ادامه ۳ مرتبه با PBS شستشو و ۱۰۰ لانداز محلول پلیمر (PVP1000D-BioSystems Diagnostic) به مدت ۳۰ دقیقه به نمونه اضافه می گردد. مجدد نمونه ها با PBS شستشو داده و در ادامه ۱۰۰ لانداز محلول (DABACV999ScyTek) به نمونه اضافه می شود. نمونه ها پس از ۵ دقیقه با آب شستشو داده و در انتها به مدت ۱۰ ثانیه داخل رنگ هماتوکسلین قرار داده می شود. پس از آن دوباره با آب شستشو و بعد از مراحل آبگیری و شفاف سازی، المل را روی نمونه چسبانده و با میکروسکوپ نوری (LABOMED) عکس برداری انجام می شود (۲۳).

### روش آماری

در این پژوهش از آمار توصیفی برای گزارش میانگین ها و درصد تغییرات استفاده می شود. همچنین برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک<sup>۱۴</sup> و برای بررسی همگن بودن واریانس ها از آزمون لوین<sup>۱۵</sup> و برای بررسی اختلاف داده ها در بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه<sup>۱۶</sup> و آزمون تعقیبی توکی استفاده می شود. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS16 استفاده خواهد شد. تمامی تحلیل ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام می شود.

### یافته ها

جدول ۱ یافته های توصیفی وزن و علائم بالینی بیماری EAE را در روز شروع علائم بالینی و روز ۳۰ پس از القا (دوره مزمن بیماری) نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، علائم بالینی بیماری در روز ۱۳ پس از القا آغاز شده است.

همچنین ثبت یافته های مربوط به ویل رانینگ در محیط غنی شده نشان می دهد که موش ها روزانه به طور میانگین  $700/37 \pm 3023/12$  دور معادل  $87/54 \pm 377/89$  متر در ویل رانینگ فعالیت داشته اند.

### روش گلژی کاکس

جهت آماده سازی بافت برای پروسه رنگ آمیزی به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند و بعد از آن نمونه ها به مدت هفت روز در محلول رنگ آمیزی گلژی کاکس نگهداری شد سپس قالب گیری توسط پارافین و مقطع گیری توسط میکروتوم روی تاری با برش های ۶۰ میکرومتری انجام شد و از هر

جدول ۱- یافته های توصیفی علائم بالینی و وزن موش ها در گروه های پژوهش (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد)

وزن روز ۳۰ ام	وزن روز شروع علائم (۱۳)	وزن روز القای EAE	علائم بالینی ۳۰ روز	شروع علائم بالینی (۱۳)	گروه کنترل سالم
پس از القا EAE	روز پس از القا (EAE)		پس از القا EAE	روز پس از القا (EAE)	
$20/33 \pm 0/95$	$19/70 \pm 0/91$	$17/74 \pm 0/60$	-	-	
$17/8 \pm 0/65$	$18/20 \pm 0/59$	$17/71 \pm 0/47$	$1/33 \pm 0/5$	$0/5 \pm 0/52$	گروه EAE
$22/19 \pm 0/91$	$19/82 \pm 0/93$	$17/74 \pm 0/49$	$0/50 \pm 0/52$	$0/20 \pm 0/42$	گروه زندگی در محیط غنی شده

<sup>14</sup> Shapiro wilks

<sup>15</sup> Leven

<sup>16</sup> One-way ANOVA



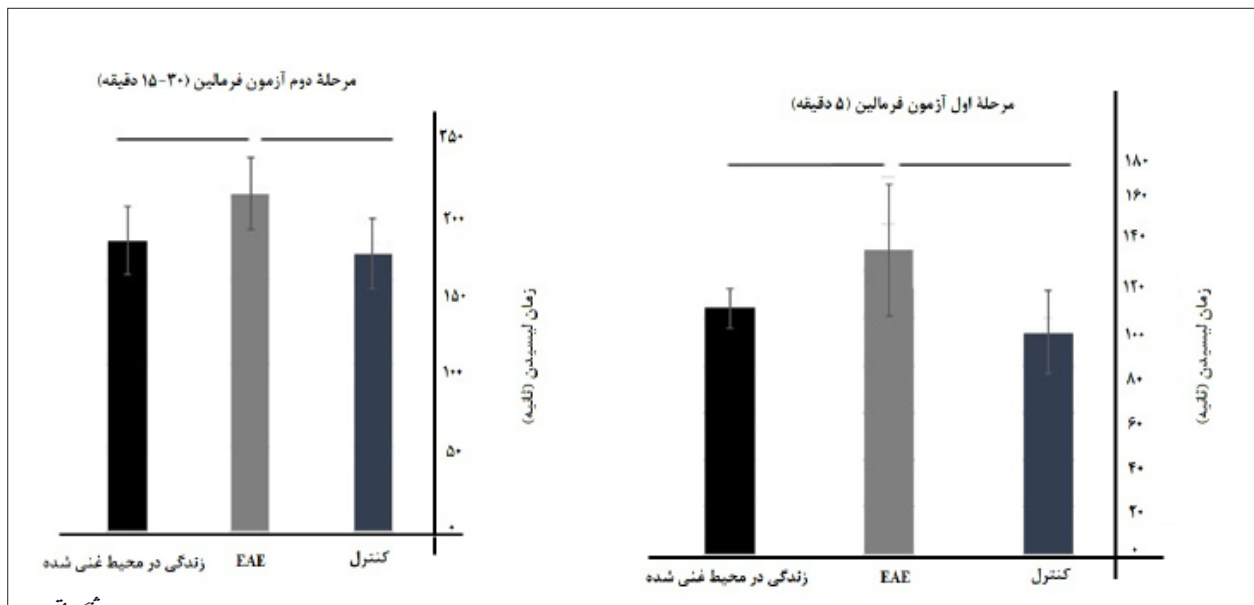
EAE در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد. نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که بین گروه‌های پژوهش در بیان پروتئین Rac1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $F=159/20$ ,  $P=0/00$ , تصویر ۲). بیان پروتئین Rac1 در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع به طور معنی‌داری افزایش یافته است ( $P=0/00$ , تصویر ۲) و فعالیت بدنی در محیط غنی شده بیان پروتئین Rac1 را در مقایسه با گروه EAE کاهش داده است ( $P=0/00$ , تصویر ۲).

زندگی در محیط غنی شده طول و تراکم خارهای دندریت نورون‌های WDR را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد.

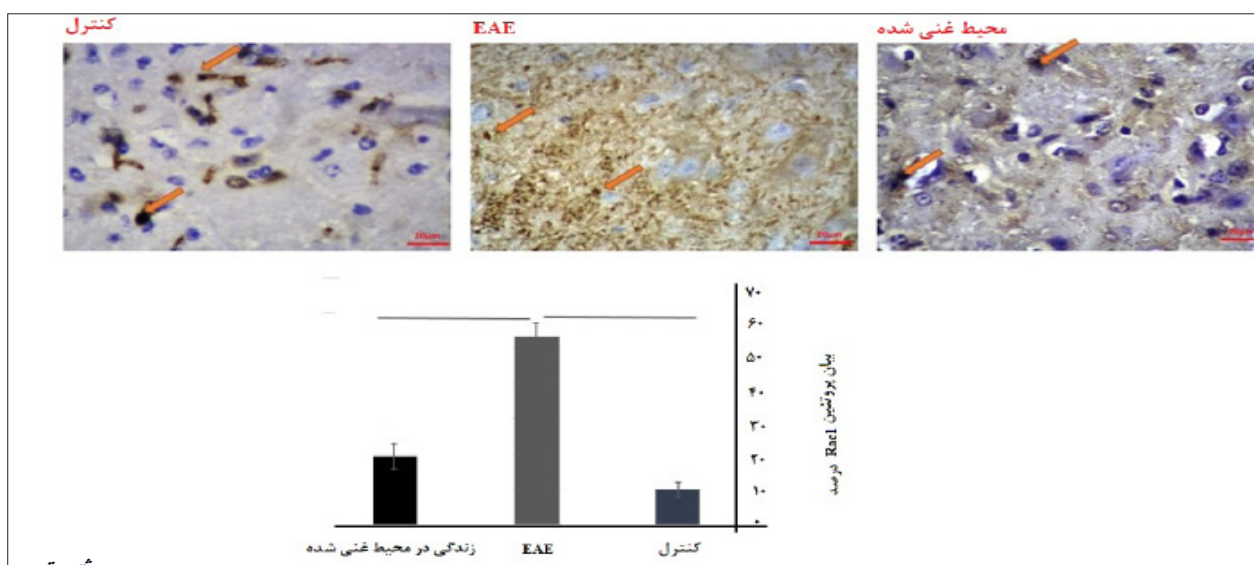
فعالیت بدنی در محیط غنی شده حساسیت به درد را در موش‌های مبتلا به EAE در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد.

نتایج آزمون فرمالین نشان داد که فعالیت بدنی در محیط غنی شده به طور معنی‌داری حساسیت به درد را در دوره مزمن بیماری کاهش داد ( $P<0/05$ ). فعالیت بدنی زمان لیس زدن را در مقایسه با گروه EAE در هر دو مرحله اولیه داد. کاهش زمان و تعداد لیس زدن در آزمون فرمالین بیانگر کاهش حساسیت به درد است (تصویر شماره ۱).

زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین Rac1 را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به



تصویر ۱- آزمون فرمالین- نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد زندگی در محیط غنی شده زمان لیس زدن را در مقایسه با گروه EAE در هر دو مرحله اولیه و ثانویه کاهش داد  $P<0/05$ .



تصویر ۲- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی- نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین Rac1 را در شاخ خلفی نخاع (لامین IV-VI) کاهش می‌دهد  $P<0/05$ .

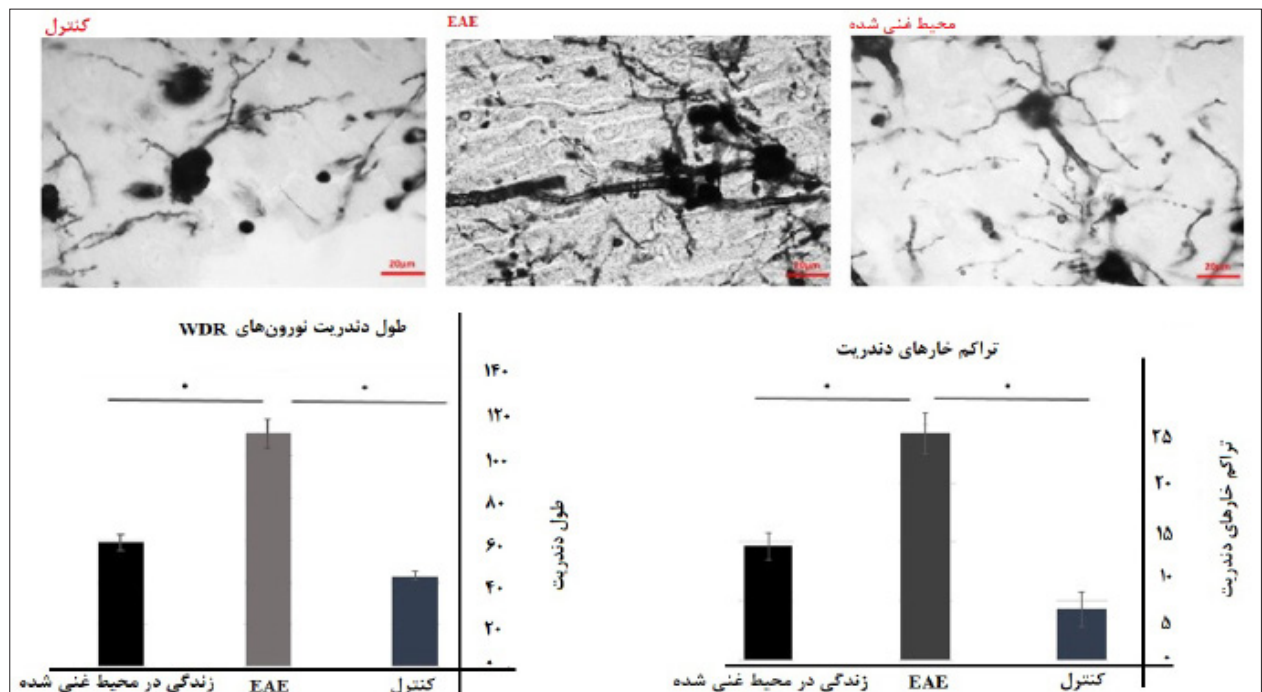
همکاران گزارش کردند، در شروع بیماری EAE بیشتر موش‌ها افزایش حساسیت به درد را نشان دادند، تجزیه تحلیل پلاستیسیته عصبی نورون‌های شاخ خلفی نخاع در این پژوهش نشان داد که طول دندریت در موش‌های نر با حساسیت بالا به درد لمسی<sup>۱۸</sup> افزایش یافته بود در حالی که این افزایش در موش‌های ماده دیده نشد. آن‌ها در توجیه یافته‌های خود عنوان کردند که در شروع بیماری EAE افزایش حساسیت به درد در موش‌های ماده بیشتر ممکن است بر افزایش التهاب و سیستم ایمنی مرتبط باشد، در حالی که درد در موش‌های نر مبتلا به EAE بیشتر به مکانیسم‌های تخریب‌کننده و پلاستیسیته وابسته است(۱).

افزایش پلاستیسیته ساختاری و تغییرات مورفولوژیک در خارهای دندریت نورون‌های WDR ممکن است باعث افزایش تعداد گیرنده‌های پس سیناپسی تحریکی (یعنی گیرنده‌های AMPA) شود. این تغییرات با افزایش نرخ آتش پتانسیل عمل همراه است که منجر به حساسیت بیش از حد به درد و علائم رفتاری درد نوروپاتی می‌شود (۴). Rac1 کینازی تنظیمی است که مجموعه‌ای از عملکردهای سلولی از جمله سازماندهی اکتین اسکلت سلولی، خوشه‌بندی گیرنده‌های AMPA در غشای پس سیناپسی خارهای دندریت و تنظیم التهاب و سیستم ایمنی بر عهده دارد بنابراین افزایش بیان Rac1 باعث افزایش تراکم و طول خارهای دندریت نورون‌های

نتایج رنگ آمیزی گلژی- کاکس نشان می‌دهد که بین گروه‌های پژوهش در طول دندریت ( $F=177/99, P=0/00$ )، تراکم خارهای دندریت ( $F=87/66, P=0/00$ ) در شاخ خلفی نخاع در دوره مزم بیماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. یافته‌های آماری نشان داد که گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل طول دندریت بلندتر ( $P=0/00$ ) و تراکم خارهای دندریت ( $P=0/00$ ) (شکل ۳) بیشتری دارند. زندگی در محیط غنی شده طول ( $P=0/00$ ) و تراکم دندریت ( $P=0/00$ ) (تصویر ۳) را در شاخ خلفی نخاع به طور معنی‌داری کاهش داد.

### بحث و نتیجه‌گیری

درد مزم یک علامت بالینی شدید و ناتوان کننده مرتبط با ام اس است، با این حال، تا به امروز مکانیسم‌های درد مزم مرتبط با ام اس هنوز به خوبی شناخته نشده است. مدل‌های حیوانی MS که جنبه‌های مختلف بیماری را تقلید می‌کنند، برای دهه‌ها برای مطالعه ویژگی‌های پاتولوژیک بیماری و اخیراً برای بررسی تغییرات رفتاری مرتبط با حساسیت بیش از حد درد مورد استفاده قرار می‌گیرند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که بیان پروتئین Rac1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزم EAE افزایش یافت که این افزایش با افزایش طول نورون‌ها و تراکم خارهای دندریت نورون‌های WDR و افزایش حساسیت به درد همراه بود. کاتونانو<sup>۱۷</sup> و



تصویر ۳- رنگ آمیزی گلژی- کاکس- نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE طول دندریت‌های WDR و تراکم خارهای دندریت را در شاخ خلفی نخاع (لامین IV-VI) کاهش می‌دهد ( $P < 0/05$ ).

17 Catuneanu  
18 Tactile pain  
19 Sun  
20 Benson

مسیر نزولی و شاخ خلفی نخاع تحریک کند همچنین فعالیت بدنی می‌تواند سطوح BDNF را در نخاع افزایش دهد، BDNF یک نوروتروفین مهم در حمایت از بقای نورون‌ها و بلوغ سیستم مهاری GABAergic است (۳۱). در همین راستا بنسون<sup>۲۰</sup> و همکاران نشان دادند، فعالیت ورزشی اختیاری شروع بیماری EAE را به تاخیر می‌اندازد و آلودینای مکانیکی را کاهش می‌دهد. این بهبودهای رفتاری با کاهش فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژ، افزایش سطح گابا، کاهش C-fos و NR1 فسفریله (زیر واحد گیرنده گلوتامات) در شاخ خلفی نخاع همراه است که نشان دهندهٔ سرکوب حساسیت مرکزی است (۲۷). در پژوهش حاضر مانند سایر پژوهش‌هایی که از محیط غنی شده به‌عنوان مداخله استفاده می‌کنند کنترل کردن دقیق فعالیت حیوانات در طی شبانه روز در محیط غنی شده با محدودیت‌هایی روبرو بود، اما سعی کردیم با متصل کردن چرخ گردان داخل قفس‌ها به برد کامپیوتری تا حدی این محدودیت را کنترل کنیم.

تغییر محیط و سبک زندگی به محیطی شاد و غنی شده و سبک زندگی فعال می‌تواند با جلوگیری از تغییرات ساختاری نورون‌های درک کنندهٔ درد در شاخ خلفی نخاع حساسیت به درد را در بیماری MS کاهش دهد و کیفیت به زندگی بیماران را افزایش دهد.

#### ملاحظات اخلاقی

پژوش حاضر مورد تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران با شناسه IR.UT.SPORT.REC.1400.049 قرار گرفته است. این مقاله از رساله دکتری نویسنده اول، در گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، استخراج شده است.

- Catuneanu A, Paylor JW, Winship I, Colbourne F, Kerr BJ. Sex differences in central nervous system plasticity and pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pain*. 2019; 160(5): 1037-49.
- Sandkühler J. Understanding LTP in pain pathways. *Molecular pain*. 2007; 3: 9.
- Kuner R. Spinal excitatory mechanisms of pathological pain. *Pain*. 2015; 156: S11-S7.
- Tan AM. Dendritic spine dysgenesis in neuropathic pain. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015; 131: 385-408.
- Bassi MS, Mori F, Buttari F, Marfia GA, Sancesario A, Centonze D, et al. Neurophysiology of synaptic functioning in multiple sclerosis. *Clinical Neurophysiology*. 2017; 128(7): 1148-57.

WDR در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE می‌شود. در همین راستا پژوهش‌های متعددی نشان دادند که مهار Rac1 باعث کاهش تغییرات ساختاری نورون‌های شاخ خلفی نخاع و کاهش حساسیت به درد در مدل‌های آسیب نخاعی، آسیب عصب‌های محیطی و دیابت نوروپاتی می‌شود (۲۴-۲۶). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت بدنی در محیط غنی شده بیان پروتئین Rac1 را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE کاهش داد. همچنین طول و تراکم خارهای دندریت نورون‌های WDR و حساسیت به درد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که تغییرات محیطی و تغییر سبک زندگی باعث بهبود نوروپلاستیسیته، بهبود عملکرد شناختی و کاهش درد مزمن عصبی می‌شود (۲۷، ۲۸). زندگی در محیط غنی شده با کاهش عوامل التهابی مثل IL-1B، TNF-a، NF-KB، کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش عوامل ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی مثل IL-10 و NRF-2 می‌تواند حساسیت به درد را کاهش دهد (۲۹). برای مثال ما در پژوهش قبلی خود نشان دادیم که انجام فعالیت ورزشی منظم سطوح NRF2، IL-10 را در نخاع موش‌های مبتلا به EAE افزایش و سطوح IL-17 و نفوذ سلول‌های ایمنی به داخل نخاع را کاهش می‌دهد (۲۳). زندگی و فعالیت بدنی در محیط غنی شده با کاهش بیان Rac1 احتمالاً از طریق مهار مسیر NF-KB و کاهش التهاب و کاهش تغییرات ساختاری در نورون‌های شاخ خلفی نخاع حساسیت به درد را کاهش داده است. سان<sup>۱۹</sup> و همکاران نشان دادند که مهار Rac1 از طریق غیرفعال کردن مسیر NF-KB و سرکوب فعال شدن میکروگلیا در شاخ خلفی نخاع حساسیت به درد را در مدل درد التهابی کاهش می‌دهد (۳۰). علاوه بر این زندگی در محیط غنی شده می‌تواند آزادسازی GABA و سروتونین را در

#### منابع

- West SJ, Bannister K, Dickenson AH, Bennett DL. Circuitry and plasticity of the dorsal horn-toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2015; 300: 254-75.
- Kuner R. The plastic spinal cord: functional and structural plasticity in the transition from acute to chronic pain. *e-Neuroforum*. 2017; 23(3): 137-43.
- Lu J, Luo C, Bali KK, Xie R-G, Mains RE, Eipper BA, et al. A role for Kalirin-7 in nociceptive sensitization via activity-dependent modulation of spinal synapses. *Nat Commun*. 2015; 6: 6820.
- Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun*. 2013; 45: 31-9.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic



- pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain*. 2009; 141(1-2): 156-64.
11. Learmonth YC, Motl RW. Exercise Training for Multiple Sclerosis: A Narrative Review of History, Benefits, Safety, Guidelines, and Promotion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18(24): 13245.
  12. Rostami Z, Ghasemi S, Farzadmanesh H, Safari M, Ghanbari A. Sex Difference in Trigeminal Neuropathic Pain Response to Exercise: Role of Oxidative Stress. *Pain Research and Management*. 2020; 2020: 3939757.
  13. 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). *Experimental neurology*. 2015; 271: 279-90.
  14. Chiang SS, Lee CL, Liu HC, Wang JS, Lee IT, Song YM, et al. Physical activity and albuminuria were associated with painful diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes in an ethnic Chinese population. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016; 462: 55-9.
  15. Silva BA, Ferrari CC. Environmental enrichment as a promising strategy for aiding multiple sclerosis treatment. *Neural Regen Res*. 2020; 15(9): 1660-1.
  16. Rodrigues DH, Leles BP, Costa VV, Miranda AS, Cisalpino D, Gomes DA, et al. IL-1 $\beta$  Is Involved with the Generation of Pain in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Molecular neurobiology*. 2016; 53(9): 6540-7.
  17. Zorzella-Pezavento SF, Chiuso-Minicucci F, França TG, Ishikawa LL, da Rosa LC, Marques C, et al. Persistent inflammation in the CNS during chronic EAE despite local absence of IL-17 production. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 519627.
  18. Segal JP, Bannerman CA, Silva JR, Haird CM, Baharnoori M, Gilron I, et al. Chronic mechanical hypersensitivity in experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by disease severity and neuroinflammation. *Brain, behavior, and immunity*. 2020; 89: 314-25.
  19. Shahidi SH, Kordi MR, Rajabi H, Malm C, Shah F, Quchan ASK. Exercise modulates the levels of growth inhibitor genes before and after multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020; 341: 577172.
  20. Ball NJ, Mercado E, Orduña I. Enriched Environments as a Potential Treatment for Developmental Disorders: A Critical Assessment. *Frontiers in Psychology*. 2019; 10.
  21. Fournier AP, Baudron E, Wagnon I, Aubert P, Vivien D, Neunlist M, et al. Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis Journal-Experimental, Translational and Clinical*. 2020; 6(4): 2055217320959806.
  22. Li Z, Wang Y, Zhao J, Zhang H. Dieckol attenuates the nociception and inflammatory responses in different nociceptive and inflammatory induced mice model. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021; 28(9): 4891-9.
  23. Saffar Kohneh Quchan AH, Kordi MR, Namdari H, Shabkhiz F. Voluntary wheel running stimulates the expression of Nrf-2 and interleukin-10 but suppresses interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Letters*. 2020; 738: 135382.
  24. Tan AM, Chang Y-W, Zhao P, Hains BC, Waxman SG. Rac1-regulated dendritic spine remodeling contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*. 2011; 232(2): 222-33.
  25. Tan AM, Samad OA, Fischer TZ, Zhao P, Persson A-K, Waxman SG. Maladaptive Dendritic Spine Remodeling Contributes to Diabetic Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*. 2012; 32(20): 6795.
  26. Tan AM, Stamboulian S, Chang YW, Zhao P, Hains AB, Waxman SG, et al. Neuropathic pain memory is maintained by rac1-regulated dendritic spine remodeling after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2008; 28(49): 13173-83.
  27. 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). *Experimental neurology*. 2015; 271: 279-90.
  28. Honarmandnasab Y, Kordi MR, Gaeini AA. Effect of Voluntary Training after the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on Some Myelin-Producing Proteins in Female C57BL/6 Mice. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2021; 28(12): 300-12.
  29. Einstein O, Katz A, Ben-Hur T. Physical exercise therapy for autoimmune neuroinflammation: Application of knowledge from animal models to patient care. *Autoimmunity Reviews*. 2022; 21(4): 103033.
  30. Sun X, Li X, Zhou Y, Wang Y, Liu X. Up-regulating TIPE2 alleviates inflammatory pain by suppressing microglial activation-mediated inflammatory response via inhibiting Rac1/NF- $\kappa$ B pathway. *Experimental cell research*. 2021; 404(1): 112631.
  31. Tai LW, Yeung SC, Cheung CW. Enriched Environment and Effects on Neuropathic Pain: Experimental Findings and Mechanisms. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*. 2018; 18(8): 1068-82.