مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هشتم، شماره دوازده، اسفند۱۳۹۹
تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۷/۱۳

تاثیر یک دوره تمرینات اختیاری بعد از القای آنسفالومیلیت خودایمن تجربی بر برخی پروتئین‌های میلین‌ساز در موش‌های ماده نژاد C57BL/6

یاسمن هنرمندنسب[۱]،محمدرضا کردی*[۲]، عباسعلی گائینی[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر یک دوره تمرینات اختیاری بعد از القای آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) بر برخی پروتئین‌های میلین ساز در موش‌های ماده نژاد C57BL/6 است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا ۲۸ سر موش ۶-۸ هفته‌ای خریداری و به‌روش تصادفی به ۳ گروه فعالیت ورزشی (n=۲۱) ، کنترل سالم (n=۸) و کنترل EAE (n=۸) تقسیم شدند. گروه فعالیت ورزشی پس از القاء EAE و پس از اینکه ۲ روز پیاپی نمره بالینی ۱ را ثبت کردند، ۵ روز در هفته، ۱ ساعت به مدت ۴ هفته فعالیت ورزشی اختیاری را اجرا کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌ها معدوم و بافت برداری شدند. از روش ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بیان پروتنین‌های MBP و CNPase استفاده شد. با نرم‌افزار SPSS version 16 برای بررسی اختلاف داده‌ها در بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس چندگانه و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد.

نتایج: نتایج پژوهش نشان داد بیان هر دو پروتئین در نتیجه تمرین اختیاری افزایش معناداری در گروه ورزش اختیاری در مقایسه با گروه کنترل EAE داشت (P<۰/۰۵). در ماده سفید: MBP ورزش اختیاری و کنترل EAE (P=۰/۰۱۷) ورزش اختیاری و کنترل سالم (P=۰/۰۰۱) CNPase ورزش اختیاری و کنترل EAE (P=۰/۰۱۵)؛ ورزش اختیاری و کنترل سالم (p<۰/۰۰۰۱) در ماده خاکستری: MBP ورزش اختیاری و کنترل EAE (p<۰/۰۰۰۱) ، ورزش اختیاری و کنترل سالم (p<۰/۰۰۰۱) CNPase. ورزش اختیاری و کنترل EAE (P=۰/۰۰۵)؛ ورزش اختیاری و کنترل سالم (P=۰/۰۰۱)

نتیجه‌گیری: فعالیت ورزشی اختیاری احتمالاً تاثیر مثبتی بر افزایش میلین‌سازی در جهت درمان و کنترل بیماری ام اس دارد.

واژه‌های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس (MS)، EAE، فعالیت ورزشی، میلین‌زایی

ارجاع: هنرمندنسب یاسمن، کردی محمدرضا، گائینی عباسعلی. **تاثیر یک دوره تمرینات اختیاری بعد از القای آنسفالومیلیت خودایمن تجربی بر برخی پروتئین‌های میلین ساز در موش‌های ماده نژاد** C57BL/6. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹؛ ۲۸ (۱۲): ۱۲-۳۳۰۰.

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۳۰۰۰۷۶، پست الکترونیکی: mrkordi@ut.ac.ir، صندوق پستی :۱۴۷۳۱۳۷۸۵۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

مقدمه

مولتیپل‌اسکلروزیس (MS) احتمالاً شناخته‌شده‌ترین بیماری خودایمنی است. که به‌علت ضایعات میلین‌زدایی چند بخشی توسط آسیب زدن به الیگودندروسیت های تولیدکننده میلین و آکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌شود. از دست دادن میلین اکسونال متعاقباً انتقال آکسون را مهار می‌کند، که منجر به طیف وسیعی از اختلالات عملکردی، از جمله نقص‌های شناختی، اختلال عملکرد حرکتی یا بینایی و افسردگی می‌شود (۱,۲). علت‌های مکانیکی ام- اس ناشناخته است. تصور بر این است که حمله‌های خود ایمنی ضایعات دمیلینه ایجاد می‌کند که نشانه‌ای از مراحل اولیه بیماری MS هستند. این ضایعات می‌توانند در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی (CNS) و در هر دو ماده سفید و خاکستری رخ دهد. ماده سفید به بطن‌های مغز، مسیرهای بینابینی و نخاع به شدت تحت‌تأثیر پلاک‌های حاصل از میلین‌زدایی قرار می‌گیرند (۳). محل و تعداد ضایعات، علائم بیماری را تعیین می‌کند (۴). به‌دنبال از دست دادن پاتولوژیک میلین، از طریق توانایی درون‌زایی قابل‌توجه CNS در بازسازی میلین، غلاف میلین جدیدی به دور آکسون تشکیل می‌شود. این امر خواص هدایتی آکسون را بازیابی می‌کند (۵,۶). میلین‌سازی مجدد که در بسیاری از ضایعات بیماری MS رخ می‌دهد به‌طور فزاینده ناقص و ناکافی است و در نهایت در بسیاری از ضایعات و بیماران با شکست مواجه می‌شود. تلاش برای درک علل این شکست در میلین‌سازی مجدد تحقیقات را به سمت زیست‌شناسی این پدیده و مجموعه آن وابسته به عوامل سلولی و مولکولی درون سلولی و برون سلولی که این روند را تنظیم می‌کنند هدایت کرده است (۵). طبق تحقیقات انجام شده بازسازی میلین در دو مرحله انجام می‌شود: مرحله اول شامل مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیتی به محل ضایعات و مرحله دوم تمایز سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) به الیگودندروسیت‌های میلین‌ساز می‌باشد که به آکسون‌های دمیلینه متصل شده و به دور آن‌ها غلاف میلین تولید می‌کنند.

چندین مولکول درون سلولی و برون سلولی که این دو مرحله را تنظیم می‌کنند شناخته شده است (۵). پروتئین‌های مختلفی در میلین بیان می‌شود. این پروتئین‌ها برای میلین نسبتاً اختصاصی هستند، به‌طوری که تفاوت‌های اساسی بین محتوا پروتئین میلین مرکزی و میلین محیطی وجود دارد. بیان ژن پروتئین‌های میلین از هسته الیگودندروسیتی آغاز می‌شود و پس از فرآیند رونویسی وارد فضای سیتوپلاسمی می‌گردد. در سیتوپلاسم این سلول‌ها، طی فرآیند ترجمه، پروتئین‌های مختلف میلین ساخته شده و به بخش‌های مختلف میلین یا سلول الیگودندروسیتی مهاجرت می‌کنند. چند پروتئین مهم میلین و الیگودندروسیت‌های بالغ عبارتنداز: Myelin basic protein MBP)، فسفولیپید پروتئین Proteolipid protein (PLP) و دیگر ایزوفرم آن DM20 که حدود ۸۰ درصد، Cyclic nucleotide phosphodiesterase CNPase که حدود ۴ درصد گلیکوپروتئین مشتق از میلین (MAG) که حدود ۱ درصد و میلین الیگودندروسیت الیگوپروتئین (MOG) که کمتر از ۰/۱ درصد محتوای پروتئینی میلین را تشکیل می‌دهد (۷,۸). MBP در حفظ پایداری ساختاری میلین مهم است و یک عامل ضروری برای هدایت عصبی کارآمد می‌باشد (۹). ثابت شده است که فقدان MBP به‌عنوان پروتئین اصلی میلین منجر به از دست دادن پیشرونده آکسون در موش و انسان شده است. هم‌چنین موش‌های فاقد فسفودی‌استراز حلقوی (CNPase)، آنزیمی کلیدی که توسط الیگودندروسیت بیان می‌شود، نیز انحطاط آکسونی شدیدی داشتند. CNPase آنزیمی است که توسط الیگودندروسیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد تا دور آکسون‌های عصبی پیچیده و غلاف میلین را تشکیل دهند. از آنجا که انتشار CNPase مربوط به مهاجرت و گسترش غشاء الیگودندروسیت در طول میلیناسیون است، افزایش سطح CNPase ممکن است نشان دهنده افزایش میلیناسیون باشد (۵,۱۰). به همین علت دو پروتئین MBP و CNPase به‌ترتیب به‌عنوان ماکرهای میزان میلین‌سازی و فعالیت الیگودندروسیت در این مطالعه استفاده شده است. اگرچه MS یک بیماری برگشت‌ناپذیر همراه با اختلالات

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

حرکتی مزمن است و تاکنون هیچ درمان قطعی برای آن یافت نشده و تنها برخی داروها جهت بهبود علایم و کند نمودن سیر بیماری در دسترس است. بنابراین مداخلات درمانی که می‌توانند تاثیر بیماری را کاهش دهند و کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشند، مورد نیاز است. فعالیت‌های موثری که CNS را تحریک می‌کند باعث بهبود عملکرد مغز در بیماری می‌شود. تا به‌حال استراتژی‌های که جلوی میلین‌زدایی را گرفتند به‌عنوان عمده‌ترین راه درمان این بیماری مورد توجه بوده است و این در حالی است که روش‌های منجر به پیش برد بازسازی میلین و کاهش از دست دادن آکسون‌ها از ابزارهای مهم درمانی به‌شمار می‌آیند. از آنجایی‌که فعالیت ورزشی نسبت به دارو فواید بیشماری دارد بنابراین با توجه به پیشینه بیماری MS بسیار مهم است تا تاثیر نوع فعالیت‌ها بر عوامل میلین‌ساز مشخص شود (۱۱,۱۲). اگر چه کاربرد ورزش در بیماری CNS به‌نظر می‌رسد به هدف عصب‌زایی برای تضعیف ناتوانی‌های عصبی دائمی برمی‌گردد، اما مکانیزم‌های مولکولی تحت‌تاثیر آن، به‌ویژه در MS، ناشناخته است. مدل‌های ورزشی معمولی که در مطالعات حیوانی استفاده می‌شوند شامل دویدن داوطلبانه در چرخ دوار، دویدن اجباری تردمیل و شنا است. در دویدن داوطلبانه در چرخ دوار حیوانات قادر هستند دوره و مدت ورزش را کنترل کنند. هم‌چنین بر خلاف فعالیت ورزشی اجباری تاثیر عوامل استرس‌زا کاهش می‌یابد (۱۳). در مورد میلین‌سازی در CNS تحقیق جیان ژن و همکاران ۲۰۱۹ نشان داد که ۲ هفته تمرین چرخ‌گردان داوطلبانه (VWR) Voluntary wheel running به‌طور قابل‌توجهی میلین‌سازی و توانایی حرکتی را از طریق مهار سیگنالینگ در سلول‌های دودمان الیگودندروگلیال (WNT) تقویت می‌کند (۱۴). در مطالعه دیگری تمرین داوطلبانه در چرخ دوار در مدل کوپریزون Cuprizone model مورد بررسی قرار گرفت که حیوانات با کوپریزون ۰/۲ ٪ تغذیه شدند و برای استفاده ۳ تا ۶ هفته از چرخ دوار مجاز شدند. آنالیز وسترن بلات و ایمونوهیستوشیمی در هر دو دوره افزایش MBP و CNPase را در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با گروه دمیلینه بی‌تحرک نشان دادند. هم‌چنین کاهش تلفات الیگودندروسیتی و از دست دادن میلین در نتیجه مسمومیت با کوپریزون را به نمایش گذاشتند (۱۵). در پژوهشی از پریور Pryor et al و همکارانش (۲۰۱۵)، نتایج حاکی از کاهش نفوذ سلول‌های ایمنی بر CNS و افزایش میلین‌سازی مجدد موش‌ها بعد از القا با تمرین داوطلبانه چرخ‌گردان بود. این مطالعه نشان داد تمرین ورزشی مزمن قادر به مقابله با از بین رفتن میلین در نخاع است (۱۶). دویدن داوطلبانه در چرخ دوار حیوان را قادر می‌سازد که دوره و مدت فعالیت ورزشی خود را کنترل کند. هم‌چنین برخلاف تمرینات اجباری، عوامل استرس‌زا در برخی از نتایج تاثیرگذار نیستند. انواعی از مدل‌های in vivo و in vitro جهت مطالعه فرآیندهای التهابی دمیلینه کننده و نورودژنراتیو بیماری MS وجود دارد که یکی از متداول‌ترین آن‌ها Experimental autoimmune encephalomyelitis EAE است. EAE یک مدل حیوانی برای بررسی شاخص‌های التهابی و رفتاری بیماری ام اس است. این مدل معمولاً با مواجهه مستقیم حیوان با آنتی‌ژن‌های میلینی القا می‌شود. در مدل EAE سلول‌های T بر علیه آنتی‌ژن میلینی فعال شده و دمیلیناسیون را القا می‌کنند (۱۷). پاتوفیزیولوژی EAE بسیار شبیه MS است. آسیب آکسونال و دمیلینیشن، به‌عنوان یک نتیجه از (در EAE) مرگ سلولی الیگودندروسیت و تخریب پروتئین پایه میلین (MBP)، پروتئین پروتئولیپید و دیگر پروتئین‌های مرتبط با میلین است (۲). پیشنهاد می‌شود که ورزش دارای اثر مستقیم محافظت نورونی در آنسفالومیلیت خودایمنی تجربی (EAE)، مدل حیوانی MS است. در پژوهش‌های اخیر از مقایسه تمرینات استقامتی و مقاومتی به کرار استفاده شده است، ولی در این پژوهش از ورزش اختیاری استفاده شد. هم‌چنین مطالعات اندکی بر روی بررسی تعیین تاثیر ورزش بر رمیلیناسیون در مدل EAE صورت گرفته و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه و بررسی سازوکار اثر آن‌ها وجود دارد. بنابراین با توجه به تاثیر مثبت فعالیت ورزشی بر بازسازی غلاف میلین، هدف از پژوهش حاضر بررسی چهار هفته فعالیت ورزشی اختیاری بعد از آغاز علائم بالینی بیماری بر روند بازسازی غلاف میلین در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

نخاع موش‌های مبتلا به EAE می‌باشد. بنابراین در این مطالعه از موش‌های مدل مایس برای تجزیه و تحلیل اینکه آیا ورزش منظم اختیاری می‌تواند در عادی سازی روند پاتولوژی میلین زدایی و فرآیند میلین‌سازی در نخاع موش EAE نقش داشته باشد، استفاده شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ابتدا ۲۸ سر موش ماده C57BL/6 ۶-۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور خریداری شد و به‌روش تصادفی ساده به ۳ گروه فعالیت ورزشی (n=۱۲)،کنترل سالم(n=۸) و کنترل EAE (n=۸) تقسیم شدند (تعداد بیشتر نمونه در گروه ورزشی به‌علت ریسک بیشتر از بین رفتن آن‌ها در حین پروتکل تمرینی بود). سپس، موش‌ها به‌منظور آشناسازی با محیط نگهداری، به‌مدت یک هفته در معرض چرخ‌گردان (۱ ساعت در روز و ۳ روز متوالی به قفس چرخ‌گردان دسترسی داشتند تا به چرخ‌گردان عادت کنند و اطلاعات پایه دویدن جمع‌آوری گردد) قرار گرفتند. به این صورت که پس از تقسیم تصادفی گروه‌ها و انجام پروتکل آشناسازی، گروه ورزش اختیاری پس از القاء EAE و پس از اینکه ۲ روز پیاپی نمره بالینی۱ را ثبت کردند، ۴ هفته فعالیت ورزشی را اجرا کردند و در این حین نمرات بالینی آن‌ها نیز بررسی شد و گروه کنترل با القای EAE (n=8) و بدون القای EAE (n=8) نیز برای مقایسه با گروه ورزش اختیاری در قفس ماندند. در نهایت پس از آزمایش‌های مربوطه، برای سنجش داده‌ها و مقایسه آن با تمامی گروه‌ها، موش‌ها معدوم شدند. حیوانات در قفس‌های عمومی و در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (۱±۲۲ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. آن‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشته و در سرتاسر دوره تحقیق موش‌ها توسط یک نفر نیز جابجا و دستکاری گردیدند. تمام پروتکل‌های آزمایشگاهی طبق مقررات کمیته بین‌المللی یونسکو UNESCO در استفاده اخلاقی از حیوانات انجام شد و توسط کمیته اخلاق دانشگاه تهران تایید شد. تلاش شده تا درد و رنج حیوانات به حداقل برسد و تعداد حیوانات مورد استفاده کاهش یابد.

نحوهٔ القای EAE: موش‌های C57BL/6 با ایمن‌سازی زیر جلدی از پهلو با ۲۰۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیتس گلیکوپروتئین Myelin oligodendrocytes glycoprotein (MOG35-55) که در محلول بافرشده با فسفات-Phosphate buffered saline (PBS) حل شده است، ایمن‌سازی شدند و با حجم مساوی از دوای کامل فروند Complete Freund's adjuvant (CFA) تکمیل شده با ۴۰۰ میکروگرم عصاره مایکوباکتریوم تیوبرکیولوسیس Mycobacterium tuberculosis H37Ra به حالت ذرات ریز و پایدار (امولسیون) در آمدند. تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۲ (در روز تزریق و دو روز بعد از آن)، به صورت داخل صفاقی ۳۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین Pertussis toxin داشتند. این مدل در "مؤسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری" تولید شد. لازم به ذکر است گروه کنترل همزمان با باقی گروه‌ها تزریق سالین Saline داشت. برای ارزیابی وزن بدن (پارامتر سلامت)، حیوانات روزانه وزن‌کشی شدند و برای علائم بالینی EAE، توسط دو ناظر مستقل مورد ارزیابی قرار گرفتند و از یک سیستم نمره‌دهی بالینی EAE برای ارزیابی اختلال عصبی در مدل EAE با توجه به مقیاس زیر استفاده شد: نمره ۰ = بدون بیماری؛ نمره ۱= کم شدن وزن و ضعف 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 (۱۸,۱۹).

پروتکل تمرین اختیاری: موش‌ها یک ساعت در روز و ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته در یک قفس به یک چرخ‌گردان (ساخت شرکت مهندسی پیشرو اندیشه صنعت) دسترسی پیدا کردند. در آن یک ساعت، موش ها از قفس خود برداشته شده و در یک قفس مشابه و استاندارد تنها با پوشال و یک چرخ‌گردان قرار گرفتند. مسافت پیموده شده با استفاده از یک کامپیوتر ثبت شد (۴،۱۹).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

آماده‌سازی بافت: بعد از تکمیل پروتکل ورزش، تمام حیوانات تحت بی‌حسی عمیق بوسیله ترکیب کتامین و زالازین قربانی شدند. به‌دنبال آن پس از برداشت بافت قطعاتی به‌صورت برش عرضی از نخاع، با استفاده از محلول برئن ثابت‌سازی انجام گرفت. به‌منظور آبگیری بافت، نمونه را به ترتیب در الکل ۵۰ درصد، ۷۰ درصد، ۹۰ درصد و مطلق قرار گرفت. سپس نمونه در داخل محلول پزیلول قرار گرفت که آن نیز جایگزین الکل شد. در مرحله آغشتگی نمونه را داخل پارافین مذاب توسط دستگاه اتوتکنیکون قرار گرفت. در مرحله قالب‌گیری ضمن انجماد پارافین، نمونه نیز داخل باقی‌مانده و آماده مقطع‌گیری گردید. در مرحله برش‌گیری نمونه همراه با قالب پارافین توسط دستگاهی به نام میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون، برش داده شد. و در چند منطقه با لنز ۴۰ مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

روش ایمونوهیستوشیمی Immunohistochemistry: مکان یابی پروتئین‌های MBP و CNPase در ماده سفید و خاکستری نخاع با استفاده از تکنیک IHC بر روی ۶ نمونه از هر گروه، مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا نمونه با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. به‌منظور بازیابی آنتی ژنی بر روی نمونه‌ها اسیدکلریدریک ۲ نرمال به‌مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد. بافر بورات به منظور خنثی‌سازی اسید به‌مدت ۵ دقیقه اضافه گردید. سلول‌ها با PBS شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها استفاده گردید. با PBS شستشو داده شدند. سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به‌صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به نمونه اضافه گردید و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به‌مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. روز بعد ظرف حاوی بافت از یخچال خارج شد و سپس ۴ بار و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. به نمونه آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه گردید و سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۱ ساعت و۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل گردید و بعد از ۴ بار شستشو، به آن‌ها DAPI اضافه گردید، بلافاصله برداشته شد و روی نمونه PBS ریخته شد. در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت مدل Olympus و با لنز ۴۰۰ برای تایید مارکرها مشاهده شدند (۲۱).

تجزیه و تحلیل آماری

از شاخص‌های گرایش به مرکز و پراکندگی (میانگین و انحراف استاندارد) برای در سطح آمار توصیفی استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون شاپرووِیلک Shapiro wilks تایید شد. همگن بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون لوین Leven بررسی شد و این پیش فرض مورد تایید واقع گردید. برای مقایسه گروه‌های تحقیق از آزمون تحلیل واریانس چند متغیره استفاده شد. آزمون تعقیبی LSD برای مقایسه چندگانه گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. اندازه اثر با استفاده از شاخص مجدور ایتا گزارش شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS version 16 و پریزم بود.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه تهران تایید شده است (کد اخلاق IR.UT.SPORT.REC.1397.028)

نتایج

نمودار۱. نمرات بالینی به منظور دنبال کردن روند بیماری در دو گروه کنترل EAE و ورزش اختیاری را به‌مدت ۴ هفته (۲۸ روز) بعد از القای بیماری با آزمون من‌ویتنی با سطح معناداری P<۰/۰۵ نشان می‌دهد. همان‌گونه که در نمودار می‌بینید امتیازات بالینی گروه ورزش اختیاری به‌مراتب در طول دوره تمرین پایین‌تر از گروه کنترل EAE قرار دارد و در طول این دوره به صفر نزدیک شده است. در ادامه تحقیق به بررسی توصیفی متغیرهای تحقیق در گروه‌ها پرداخته شد. جدول ۱ نتایج آمار توصیفی متغیرهای تحقیق را نشان می‌دهد. همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود هر دو پروتئین MBP و CNPase در نتیجه تمرین ورزشی اختیاری سطح بالاتری پس از القا EAE نسبت به‌گروه کنترل EAE و نزدیک به‌گروه کنترل

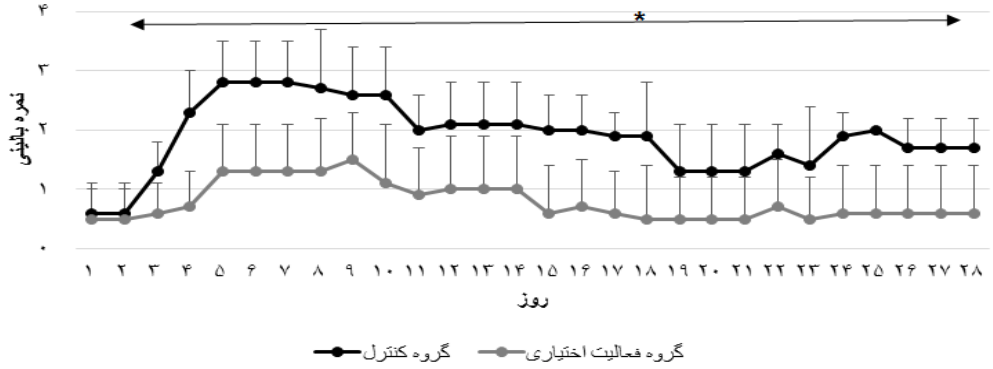
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

سالم نشان دادند که این نمایش‌گر فرآیند رمیلیناسیون و جلوگیری از وقوع دمیلیناسیون در نتیجه فعالیت ورزشی اختیاری است. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها از آزمون تحلیل واریانس چند متغیره برای بررسی تفاوت در MBP و CNPase در ماده خاکستری و سفید استفاده شد. در همین راستا نتایج آزمون لامبدای ویکلز نشان داد که تفاوت معنی‌داری در حداقل یکی از شاخص های MBP و CNPase در ماده خاکستری و سفید وجود دارد (η^2=۰/۹۴۲، p=۰/۰۰۱، $F_{۴ ،۱۰}$=۲۱/۶۳، Value=۰/۰۳۰). جدول ۲. نتایج تحلیل MANOVA را نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در شاخص‌های MBP و CNPase تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تحقیق مشاهده می‌شود (p<۰/۰۱). در ادامه با استفاده از آزمون تعقیبی LSD به مقایسه چندگانه گروه‌های تحقیق پرداخته شد. نمودار ۲ و ۳ نتایج این تحلیل را نشان می‌دهد.

همانگونه که در نمودارهای ۲ و ۳ مشاهده می‌شود در ماده سفید و خاکستری بعد از القای EAE تفاوت معنی‌داری در بیان پروتئین MBP و CNPase بین گروه‌های کنترل با SE و SER و نیز بین گروه‌های SE و SER وجود دارد (p<۰/۰۵). کمترین میزان در گروه SE به‌دست آمد و گروه SER نیز نسبت به‌گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود. در شکل ۱ و ۲ به‌ترتیب تصاویر رنگ‌آمیزی به‌روش ایمونوهیستوشیمی دو پروتئین MBP و CNPase را در سه گروه کنترل سالم، کنترل EAE و ورزش اختیاری، بعد از القای EAE می‌بینید.



*P<0.05

نمودار ۱: نمرات بالینی دو گروه کنترل EAE و ورزش اختیاری

تغییرات معنی‌دار در کاهش امتیازات بالینی در گروه ورزش اختیاری در مقایسه با گروه کنترل EAE

جدول ۱: نتایج آمار توصیفی شاخص‌های MBP و CNPase در ماده سفید و خاکستری بعد از القای EAE

پروتئین	نوع ماده	کنترل(سالم)		بعد از القا EAE			
				EAE		اختیاری	
		M	SD	M	SD	M	SD
MBP	سفید	۴۳/۰۶	۱/۹۰	۱۹/۴۳	۴/۱۵	۲۸/۳۳	۲/۸۰
	خاکستری	۴۳/۵۳	۱/۳۶	۱۹/۷۳	۰/ ۶۰	۳۱/۰۵	۲/۲۳
CNPase	سفید	۵۲/۷۶	۲/۷۰	۲۲/۸۶	۶/۵۰	۸۶/۳۲	۲/۱۵
	خاکستری	۴۹/۹۳	۱/۲۵	۲۱/۲۳	۴/۸۶	۳۳/۸۶	۳/۷۵

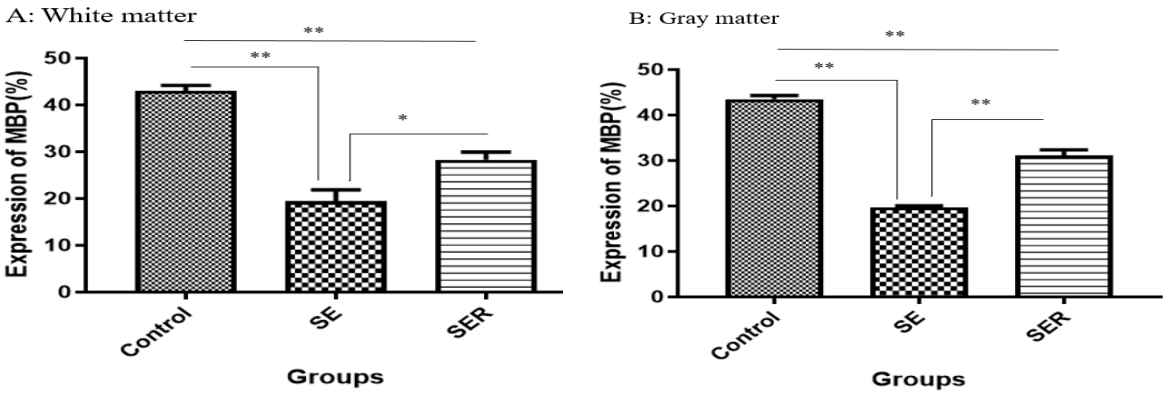
یادداشت: M: میانگین، SD: انحراف استاندارد، EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

جدول ۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیره در MBP و CNPase بعد از القا EAE

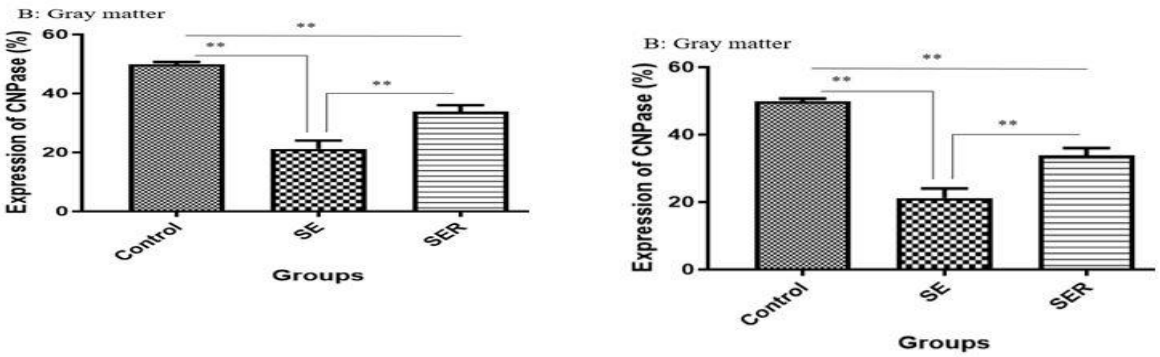
	شاخص	ماده	F	sig	η^2
بعد از القا EAE	CNPase	خاکستری	۴۷/۳۴	۰/۰۰۱	۰/۹۴۹
		سفید	۳۸/۴۲	۰/۰۰۱	۰/۹۲۸
	MBP	خاکستری	۱۷۶/۵۰	۰/۰۰۱	۰/۹۸۳
		سفید	۴۴/۴۷	۰/۰۰۱	۰/۹۳۷



نمودار ۲: (A و B): مقایسه پروتئین MBP در سطح سفید و خاکستری بعد از القای EAE

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

یادداشت: SE: Spinal cord EAE. SER: Spinal cord EAE+ wheel running



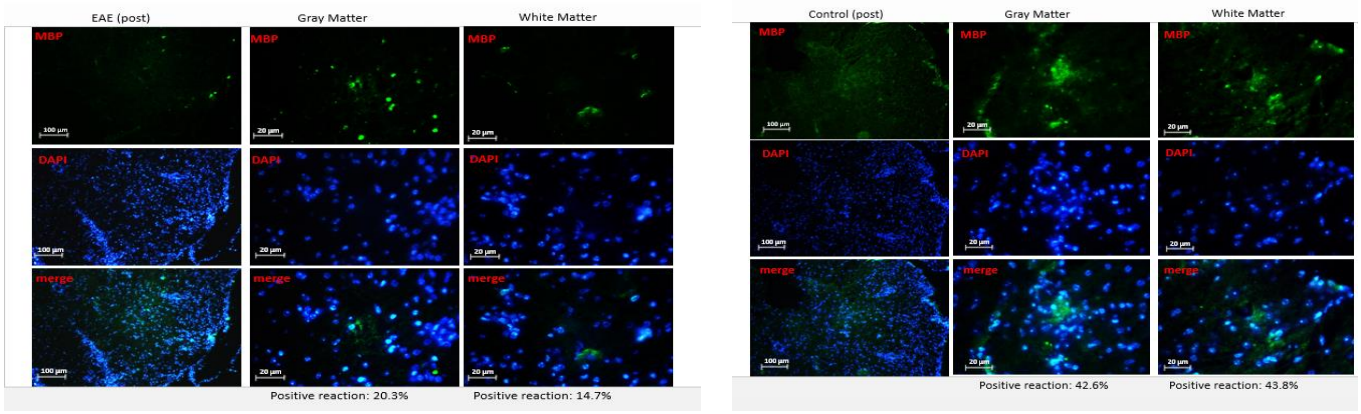
** $p < 0.01$ * $p < 0.0$

نمودار ۳ (A و B): مقایسه در پروتئین CNPase در سطح سفید و خاکستری بعد از القای EAE

یادداشت: SE: Spinal cord EAE. SER: Spinal cord EAE+ wheel running

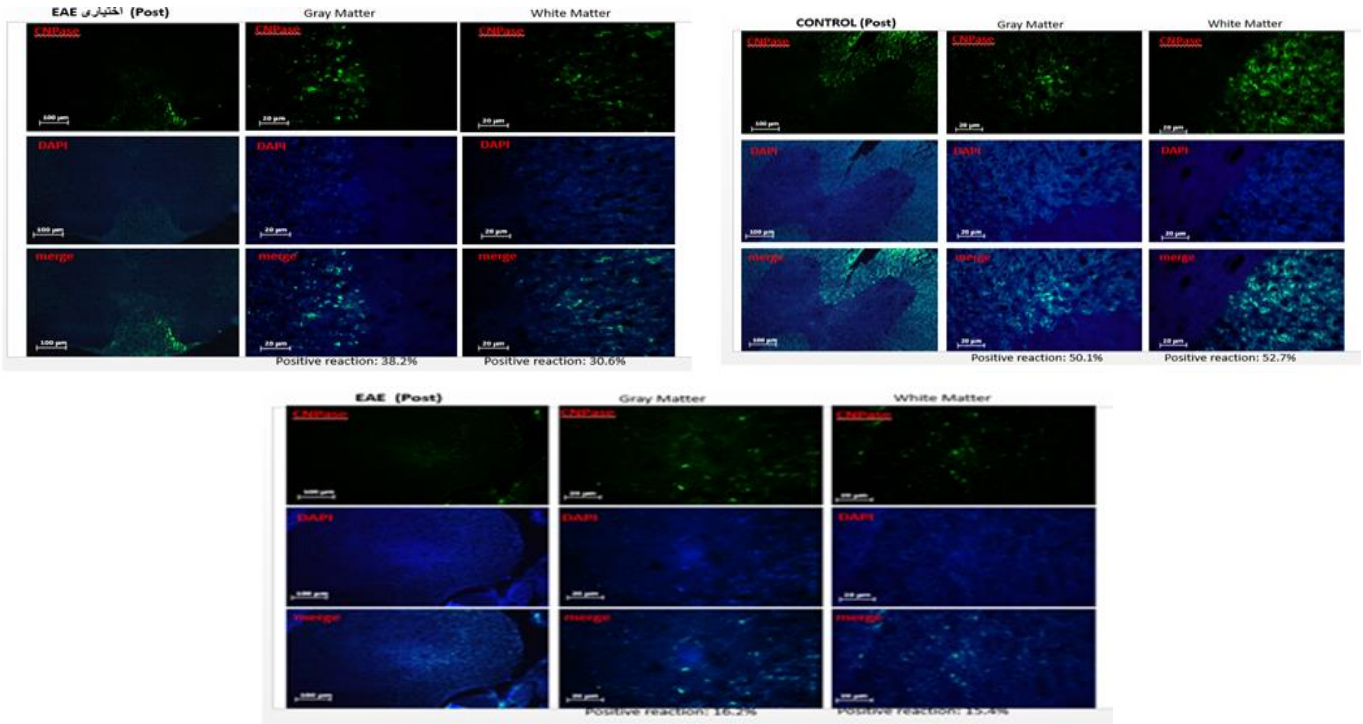
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]



شکل ۱: تصاویر رنگ آمیزی پروتئین MBP در سه گروه کنترل، EAE و ورزش اختیاری بعد از EAE

مطابق تصویر افزایش بیان پروتئین در هر دو ماده سفید و خاکستری در گروه ورزش اختیاری در مقایسه با گروه کنترل EAE و تقریباً مشابه گروه کنترل سالم دیده می‌شود.



شکل ۲: تصاویر رنگ آمیزی پروتئین CNPase در سه گروه کنترل، EAE و ورزش اختیاری بعد از EAE

مطابق تصویر افزایش بیان پروتئین در هر دو ماده سفید و خاکستری در گروه ورزش اختیاری در مقایسه با گروه کنترل EAE و تقریبا مشابه گروه کنترل سالم دیده می‌شود

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی اختیاری دویدن در چرخ دوار با افزایش معنی‌دار هر دو پروتئین MBP و CNPase به‌ترتیب به‌عنوان مارکرهای میزان میلین و فعالیت الیگودندروسیت در نخاع (هم در ماده سفید و هم در ماده خاکستری) پس از القا EAE همراه است. هم‌چنین با کاهش نمرات بالینی در گروه ورزش اختیاری در مقایسه با گروه کنترل EAE و نزدیک شدن به صفر اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که احتمالاً ورزش اختیاری در افزایش میلین‌سازی و کاهش میلین‌زدایی و در نهایت کنترل بیماری اماس موثر است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق فعال‌کردن سه مسیر شامل مسیرهای سیگنالی فاکتور رشد شبه انسولینی (Insulin like growth factor IGF1)، Prifertor-activated receptor gama coactivated 1alpha(PGC1a) و مسیر تعدیل رژیم غذایی می‌تواند در میلین‌سازی موثر باشد (۲۲). ارتباط بین دو پروتئین MBP و CNPase، به‌عنوان مارکرهای بلوغ رده الیگودندروسیتی در مراحل مختلف رشد و نمو دودمان الیگودندروسیت و تشکیل غلاف میلین از سلول‌های مولد نورون (NPC Neuronal progenitor cells) تا الیگودندروسیت میلین‌کننده (OLMyelinating oligodendrocyte) به این صورت است که CNPase در حین انتقال از مرحله تولید تا تمایز الیگودندروسیت‌ها بیان می‌شود. در حالیکه الیگودندروسیت‌های تمایز یافته میلین‌کننده آکسون به‌وسیله بیان پروتئین‌های میلین (MBP, MAG, MOG و Galc) مشخص می‌شود (۲۳). در دویدن داوطلبانه در چرخ‌دوار حیوانات قادر هستند دوره و مدت ورزش را کنترل کنند. هم‌چنین بر خلاف فعالیت ورزشی اجباری همچون تردمیل و شنا تاثیر عوامل استرس‌زا کاهش می‌یابد در حالی‌که شدت ورزش توسط تمرین داوطلبانه چرخ دوار کمتر قابل دستکاری است و از محدودیت‌های این تحقیق می‌باشد (۱۳). از دیگر محدودیت‌های مطالعه دسترسی یک ساعته روزانه (۵ روز در هفته) به چرخ‌گردان به‌جای دسترسی آزاد ۲۴ ساعته حیوانات به چرخ به علت محدودیت تعداد دستگاه‌های چرخ‌گردان در دسترس بود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه جنسن و همکاران ۲۰۱۸، مندولسی و همکاران ۲۰۱۹، جیانگ ژنگ و همکاران ۲۰۱۹ همسو است (۱۴,۱۵,۲۴). مطالعه ناهمسویی یافت نشد. نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعه جنسن و همکاران ۲۰۱۸ است که در آن تاثیر ورزش بر الیگودندروژنزoligodendrogenesis در میلیناسیون مرکزی در نتیجه تمرین دویدن چرخ‌دوار تحت نظارت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که تعداد OPCs و الیگودندروسیت‌ها در هر دو روز ۷ و ۱۴ پس از القا (dpi) Days post-immunization با ورزش افزایش پیدا کرد که همین افزایش OPCs در چرخه سلولی در گروه ورزش از مرحله تکثیر OPCs حمایت می‌کند و در نتیجه بیان شد که دوباره‌سازی OPCs و الیگودندروسیت‌ها در نتیجه فعالیت دویدن چرخ‌دوار منجر به افزایش رمیلیناسیون می‌شود که توسط میکروسکوپ الکترونی در محل ضایعات بررسی شد. داده‌های ایمونوهیستوشیمی در میکروسکوپ الکترونی ۱۴ روز بعد از ایمن‌سازی افزایش معنی‌دار در پروتئین MBP، چگالی آکسون‌های رمیلین شده و ضخامت میلین‌های تازه تولید شده، دیده شد (۲۴). مطالعه اخیر همسو با نتایج پژوهش حاضر مطالعه مندولسی ۲۰۱۹ است که در آن تمرین داوطلبانه در چرخ‌دوار در مدل کوپریزون Cuprizone model (مدل دیگری از بیماری MS)، مورد بررسی قرارگرفت. آنالیز وسترن‌بلات و ایمونوهیستوشیمی در هر دو دوره ۳ و ۶ هفته تمرین افزایش MBP و CNPase را در موش‌های تحت فعالیت در مقایسه با گروه دمیلینه بی‌تحرک نشان داد. هم‌چنین کاهش تلفات الیگودندروسیت و از دست دادن میلین در نتیجه مسمومیت با کوپریزون را به نمایش گذاشتند. با این حال و به ظاهر در تضاد با این نتایج، روش ایمونوهیستوشیمی برای نشانگرهای الیگودندروسیتی olig2 و APC (CC1) نشان داد که موش‌های تمرین کرده کاهش تعداد الیگودندروسیت های بالغ در هفته ۳ و ۶ را به نمایش گذاشتند. نویسندگان این یافته‌ها را به الیگودندروسیت‌های متفاوت پایین دست olig2 و الیگودندروسیت‌های میلینی که دیگر CC1

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

تولید نمی‌کنند نسبت دادند. در کل نویسندگان اینگونه نتیجه گرفتند که ورزش باعث بازسازی الیگودندروسیت در مدل دمیلینه کننده کوپریزون می‌شود (۱۵). هم‌چنین مطالعه همسو دیگر مطالعه جیان ژنگ و همکاران (۲۰۱۹) است که بررسی‌های مداوم ایمونوهیستوشیمی نشان داد که دو هفته تمرین داوطلبانه از طریق دویدن بر روی چرخ‌دوار افزایش قابل‌توجهی در میزان mRNA و پروتئین MBP در قشر حرکتی و نه در کالوسCorpus callosum و جسم مخطط straiatum نسبت به گروه شاهد نشان دادند. تجزیه تحلیل رگرسیون ارتباط معنی‌داری بین مسافت پیموده شده با فلورسانس MBP در قشر حرکتی در موش‌های Voluntary wheel running VWR نشان داد. در نتیجه محققان گزارش کردند که VWR به‌طور قابل‌توجهی میلین‌سازی و توانایی هماهنگی حرکتی را از طریق مهار سیگنالینگ در سلول‌های دودمان الیگودندروگلیال(WNT) تقویت می‌کند (۱۴).

نتیجه‌گیری

در نهایت هم‌سو با مطالعات ذکر شده پژوهش حاضر نشان داد که احتمالاً ورزش دویدن بر چرخ دوار داطلبانه می‌تواند از طریق مسیر سیگنالینگ الیگودندروژنز و رمیلیناسیون در درمان و کنترل بیماری اماس موثر باشد. هرچند به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری یاسمن هنرمندنسب در رشته فیزیولوژی ورزشی عصبی عضلانی دانشگاه تهران می‌باشد.

حامی مالی: ندارد

تعارض در منافع : ندارد.

References:

1-Stys PK. ***Pathoetiology of Multiple Sclerosis: Are We Barking up the Wrong Tree?*** F1000 prime Rep 2013; 5: 20.

2-Bernardes D, Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Karmally S, Dellarole A, Carvalho-Tavares J, et al. ***Prior Regular Exercise Improves Clinical Outcome and Reduces Demyelination and Axonal Injury in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis***. J Neurochemistry 2016; 136(S1): 63-73.

3-Love S. ***Demyelinating Diseases***. J Clin Pathol 2006; 59(11): 1151-9.

4-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.

5-Chari DM. ***Remyelination in Multiple Sclerosis***. International Review of Neurobiology 2007; 79: 589-620.

6-Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. ***Current Concepts in Multiple Sclerosis: Autoimmunity Versus Oligodendrogliopathy***. Clin Rev Allergy & Immunol 2012; 42(1): 26-34.

7-Loers G, Aboul-Enein F, Bartsch U, Lassmann H, Schachner M. ***Comparison of Myelin, Axon, Lipid, and Immunopathology in the Central Nervous System of Differentially Myelin-Compromised Mutant Mice: A Morphological and Biochemical Study***. Mol Cell Neurosc 2004; 27(2): 175-89.

8-Verkhratsky A, Butt A. ***Glial Neurobiology: A Textbook***. New Jersey: John Wiley & Sons 2007; 125-52

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

9-Shanshiashvili LV, Kalandadze IV, Ramsden JJ, Mikeladze DG. ***Adhesive Properties and Inflammatory Potential of Citrullinated Myelin Basic Protein Peptide 45-89***. Neurochem Res 2012; 37(9): 1959-66.

10-Chao F, Zhang L, Luo Y, Xiao Q, Lv F, He Q, et al. ***Running Exercise Reduces Myelinated Fiber Loss in the Dentate Gyrus of the Hippocampus in APP/PS1 Transgenic Mice***. Current Alzheimer Res 2015; 12(4): 377-83.

11-Torabimehr F, Kordi MR, Nouri R, Ai J, Bakhtiari Moghadam B, Shirian S. ***The Effect of Voluntary and Forced Exercise on the Expression Level of NCAM-PSA Protein in the Neuromuscular Junction of Soleus Muscle in a Mice Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model***. The Neuroscience J Shefaye Khatam 2020; 8(2): 39-46.[Persian]

12-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 Neuroimmunology 2020; 341: 577172.

13-Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. ***Humanized Animal Exercise Model for Clinical Implication.*** Pflügers Archiv-European J Physiology 2014; 466(9): 1673-87.

14-Zheng J, Sun X, Ma C, Li B-M, Luo F. ***Voluntary Wheel Running Promotes Myelination in the Motor Cortex through Wnt Signaling in Mice.*** Molecular Brain 2019; 12(1): 85.

15-Mandolesi G, Bullitta S, Fresegna D, De Vito F, Rizzo FR, Musella A, et al. ***Voluntary Running Wheel Attenuates Motor Deterioration and Brain Damage in Cuprizone-Induced Demyelination.*** Neurobiology of Disease 2019; 129:102-17.

16-Pryor WM, Freeman KG, Larson RD, Edwards GL, White LJ. ***Chronic Exercise Confers Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis***. J Neurosci Res 2015; 93(5): 697-706.

17-Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, Rus H. ***Oligodendrocyte Cell Death in Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Protection of Oligodendrocytes From Apoptosis by Complement***. J Rehabil Res Dev 2006; 43(1): 123-32.

18-Mifflin KA, Frieser E, Benson C, Baker G, Kerr BJ. ***Voluntary Wheel Running Differentially Affects Disease Outcomes in Male and Female Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis***. J Neuroimmunol 2017; 305: 135-44.

19-Mifflin K, Baker GB, Kerr BJ. ***Effect of Voluntary Wheel Running on Neuroactive Steroid Levels in Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis***. Neurosci Lett 2018; 685:150-4.

20-Quchan AHSK, 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.*** Neurosci Lett 2020; 378: 135382.

21-Ramos-Vara J. ***Technical Aspects of Immunohistochemistry***. Veterinary Pathology 2005; 42(4): 405-26.

22-Yoon H, Kleven A, Paulsen A, Kleppe L, Wu J, Ying Z, et al. ***Interplay Between Exercise and Dietary Fat Modulates Myelinogenesis in the***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

Central Nervous System. Biochim Biophys Acta 2016;1862(4): 545-55.

23-Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. ***Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond***. Cells 2019; 8(11): 1424.

24-Jensen SK, Michaels NJ, Ilyntskyy S, Keough MB, Kovalchuk O, Yong VW. ***Multimodal Enhancement of Remyelination by Exercise with a Pivotal Role for Oligodendroglial PGC1α***. Cell Rep 2018; 24(12): 3167-79

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 28| NO 12 | Mar 2021

Received: 12 Aug 2020
Accepted: 4 Oct 2020

Effect of Voluntary Training after the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on Some Myelin-Producing Proteins in Female C57BL/6 Mice

Yasaman Honarmandnasab[1], Mohammad Reza Kordi[†2], Abbas Ali Gaeini[3]

Original Article

Introduction: The aim of the present study was to investigate the effect of voluntary training period after the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) on some myelin-producing proteins in C57BL/6 female mice.

Methods: In this experimental study first 28 mice, which were 6-8 weeks old, were purchased and were randomly divided into three groups. Exercise activity (n=12), healthy control (n=8) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) control (n=8). Voluntary exercise group did exercises, 1 hour, 5 days a week for 4 weeks after induction of EAE and having the clinical score one for two days in a row. 48 hours after final exercise section, the mice were killed and immunohistochemistry was used to evaluate the expression of MBP and CNPase proteins. Using SPSS version 16 software, multiple analysis of variance and LSD post hoc test were used to examine the groups' data differences.

Results: The results showed that the expression of both proteins as a result of voluntary exercise had a significant increase in the exercise group compared to the EAE control group ($p<0.05$).(in White Matter: MBP, Wheel Running and Control EAE, P= .017; Wheel Running and Healthy Control, P= .001; CNPase, Wheel Running and Control EAE, P= .015; Wheel Running and Healthy Control, P= .000; in Gray Matter: MBP, Wheel Running and Control EAE, P= .000; Wheel Running and Healthy Control, P= .000; CNPase, Wheel Running and Control EAE, P= .005; Wheel Running and Healthy Control, P= .001.

Conclusion: Voluntary exercise may have a positive effect on increasing myelination in treatment and control of MS.

Keywords: Multiple sclerosis, Experimental autoimmune encephalomyelitis, Exercise, Remyelination.

Citation: Honarmandnasab Y, Kordi M.R, Gaeini A.A. **Effect of Voluntary Training after the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on Some Myelin-Producing Proteins in Female C57bl/6 Mice.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 28(12): 3300-12.

[1-3]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09123300076**, email:** mrkordi@ut.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v28i12.5777]