

## اثر پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید در پیشگیری از تخریب میلین در هیپوکامپ موش های نر نژاد C57BL/6

مریم نقیب زاده<sup>۱\*</sup>، روح اله رنجبر<sup>۲</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۳</sup>، عبدالحمید حبیبی<sup>۴</sup>

(۱) گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

(۲) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید پمران اهواز، اهواز، ایران

(۳) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه شهید پمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۰

### چکیده

**مقدمه:** مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری نورودژنراتیو رایج است که منجر به تخریب میلین و اختلال حرکتی می شود. فعالیت بدنی با جلوگیری از تخریب میلین و انهدام سلول های الیگودندروسیت، شروع فرآیندهای نورودژنراتیو را به تاخیر می اندازد. بنا بر این هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر پیش آماده سازی تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن های مرتبط با سنتز میلین و ژن فاکتور رشد عصب در هیپوکامپ مدل حیوانی تخریب میلین القاء شده با کوپریزون می باشد.

**مواد و روش ها:** موش های C57BL/6 نر (۴۰ سر) به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل، کوپریزون، تمرین تناوبی شدید، تمرین تناوبی شدید و کوپریزون. برنامه تمرینی بر روی تردمیل به مدت ۴ هفته انجام شد و پس از آن، القاء MS با رژیم کوپریزون ۲ درصد صورت گرفت، هم زمان با القاء MS برنامه تمرینی به مدت ۵ هفته ادامه داشت. بروز MS با تست میدان باز تایید شد. بیان ژن های فاکتور رشد عصب (NGF)، پروتئین پایه میلین (MBP) و پروتئین پروتئولپیدی میلین (PLP) با استفاده از روش Real time-PCR اندازه گیری شد، هم چنین هیپوکامپ جهت ارزیابی تعداد سلول های الیگودندروسیت با هماتوکسین-ائوزین رنگ آمیزی شد.

**یافته های پژوهش:** نتایج نشان داد حیواناتی که کوپریزون دریافت کردند، عملکرد حرکتی ضعیف تری داشتند، بیان NGF، MBP و PLP پایین تر و تعداد الیگودندروسیت کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند. سطوح NGF، MBP و PLP و سلول های الیگودندروسیت در گروه تمرین تناوبی+کوپریزون نسبت به گروه کوپریزون افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) و مانع حرکت غیرطبیعی حیوانات به واسطه کوپریزون شد. **بحث و نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که پیش آماده سازی با تمرین تناوبی فرآیند میلین سازی در هیپوکامپ را تقویت می کند و با بهبود بیشتر بیان ژن NGF تاثیر نوروپروتکتیو در برابر مولتیپل اسکلروزیس داشت.

**واژه های کلیدی:** تمرین تناوبی، مولتیپل اسکلروزیس، کوپریزون، فاکتور رشد عصب، پروتئین پایه میلین، پروتئین پروتئولپیدی میلین

\* نویسنده مسئول: گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Email: naghizadehmaryam@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

به طور کلی بیماری های عصبی توسط تخریب پیشرونده سلول های عصبی و آکسونی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) مشخص می شوند (۱) و در این بین بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از شایع ترین بیماری های تخریب کننده میلین است (۲). نشان داده شده است که بروز MS بین سنین ۲۰ تا ۵۰ سال رخ داده و زنان ۲ تا ۳ برابر بیشتر از مردان به این بیماری مبتلا می شوند (۳). میزان شیوع MS در سطح جهانی برابر با ۴۳/۸ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می باشد، هم چنین متوسط شیوع این بیماری در ایران برابر با ۵۴/۵۱ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است بنا بر این ایران جزو مناطق پر خطر از نظر ابتلاء به MS در جهان محسوب می شود (۴).

بیماری MS یک بیماری مزمن و با تغییر علائم التهابی، بی میلین شدن و تخریب آکسون همراه است. اطلاعات نشان می دهد که فرآیندهای التهاب و تخریب سلول های عصبی نقش کلیدی در آسیب شناسی MS بازی می کند (۵). سلول های الیگودندروسیت تولیدکننده میلین در CNS هستند، میلین پوشش خارجی آکسون های سیستم عصبی مرکزی و محیطی می باشد که در انتقال پیام های عصبی، حفظ، پایداری و نیز تغذیه آکسون ها نقش ایفا می کند. ۶۰-۷۰ درصد میلین از چربی و در حدود ۲۵-۲۰ درصد آن از پروتئین تشکیل شده است. فراوان ترین پروتئین های میلین به ترتیب، پروتئین پایه میلین (MBP) و پروتئین پروتئولیدی میلین (PLP) می باشند که در حدود ۸۰-۶۰ درصد از ترکیب پروتئین میلین CNS کل گونه ها را تشکیل می دهد (۶).

از علائم پاتولوژی مشترک بیماری MS و مدل تخریب میلین القاء شده با کوپریزون، دمیلیناسیون است (۷). در مدل های حیوانی القاء MS با کوپریزون مرگ سلول های الیگودندروسیت و تخریب میلین در مغز گزارش شده است (۸). وسعت و محل آسیب در CNS باعث اختلالات و علائمی مانند اسپاسم عضلانی و ضعف، اختلال در راه رفتن و تعادل، و کاهش کیفیت زندگی می شود (۹).

رفتارهای ارتقاء دهنده سلامت که برای بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به MS طراحی شده اند حوزه مهمی از بررسی ها هستند (۱۰). مشارکت در فعالیت بدنی، برای بهینه سازی کیفیت زندگی، مدیریت علائم، بازگرداندن عملکرد، ارتقاء سلامتی در بیماران مبتلا به MS به طور فزاینده توصیه شده است، کاهش علائم MS مانند ناتوانی در راه رفتن، درد، افسردگی و جنبه های دیگر پس از یک برنامه ورزشی مشاهده شده است (۱۱).

مطالعات اخیر حاکی از اثرات مفید پیش آماده سازی با فعالیت ورزشی بر افزایش فاکتورهای نوروتروفیک، کاهش تخریب میلین و کاهش آسیب های ناشی از القاء MS می باشند (۱۲). فاکتورهای نوروتروفیک شامل فاکتور رشد عصب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول خطی گلیال (GDNF) و غیره می باشد. نشان داده شده است که NGF نقش مهمی در تنظیم تولید میلین در سلول های شوان و الیگودندروسیت ها در محیط کشت دارد (۱۳). فعالیت ورزشی یکی از رویکردهای حمایتی و غیرتهاجمی برای افزایش سطح نوروتروفین ها در مغز است، اثرات مفید فعالیت بدنی تا حدودی به تنظیم مثبت نوروتروفین ها مرتبط است، که به محافظت عملکرد عصبی کمک می کند (۱۴). نتایج تحقیق پاتل و وایت (۲۰۱۳) نشان داد که تمرین ورزشی اثر تعدیل کننده بر پروتئین NGF در مغز دارد و NGF اثر تعدیل کننده بر سیستم ایمنی دارد، بنا بر این پاسخ التهابی در MS را کاهش می دهد (۱۵). بسیاری از تحقیقات گزارش کرده اند که فعالیت ورزشی، بازسازی سلول های عصبی را با افزایش بیان NGF تحریک می کند. چا و کیم (۲۰۰۹) نشان دادند که فعالیت ورزشی بیان NGF را تحریک کرده و رشد، تمایز و آپوپتوز سلول های عصبی را کنترل می کند در نتیجه از آسیب سلول عصبی جلوگیری می کند (۱۶). هم چنین چانگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ۲ هفته تمرین بروی تردمیل باعث افزایش بیان NGF مغز در مقایسه با گروه کنترل می شود (۱۷).

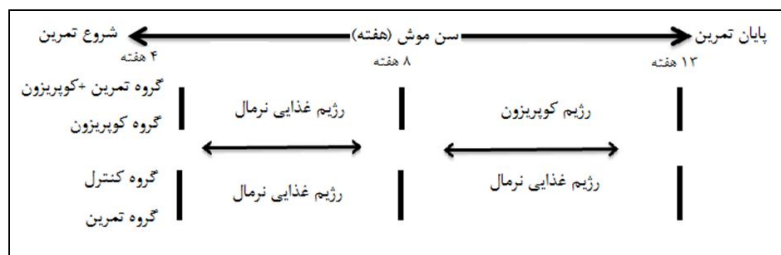
در هیپوکامپ مدل حیوانی تخریب میلین القاء شده با کوپریزون در موش را بررسی کنیم.

### مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. در این پژوهش ۴۰ سر موش نر نژاد C57BL/6 (۴ هفته و با وزن  $14/7 \pm 1/6$  گرم) مورد استفاده قرار گرفت و به طور تصادفی در چهار گروه تمرین تناوبی شدید+کوپریزون ( $13/8 \pm 2/1$ )، تمرین تناوبی شدید ( $15/4 \pm 1/6$ )، کوپریزون ( $15/2 \pm 1/9$ ) و کنترل ( $14/6 \pm 1/5$ ) تقسیم شدند. موش ها در شرایط دمایی  $23 \pm 2$  درجه سانتی گراد، چرخه تاریکی روشنایی ۱۲:۱۲ و بدون در نظر گرفتن محدودیت غذایی در قفس نگهداری شدند. در گروه تمرین تناوبی شدید+کوپریزون حیوانات قبل از القاء MS به مدت چهار هفته روی تردمیل دویدند، سپس جهت القاء MS با جیره غذایی حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون به مدت ۵ هفته تغذیه شدند (۸)، در طول این ۵ هفته تمرینات ادامه داشت و هم زمان گروه تمرین تناوبی شدید ۹ هفته، به اجرای فعالیت روی تردمیل (دانش سالار، ایران) پرداختند. دو گروه تمرین تناوبی شدید و گروه کنترل در همین مدت (۹ هفته) با جیره غذایی طبیعی تغذیه شدند، هم چنین گروه کوپریزون جهت القاء MS با جیره غذایی حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون به مدت ۵ هفته تغذیه شدند (شکل شماره ۱). برای تهیه مدل کوپریزون ۰/۲ درصد غذای حیوان پودر شده و کوپریزون با آن مخلوط و سپس همراه با آب به صورت خمیر و به شکل پلیت آماده گردید، به طوری که توسط حیوان تشخیص داده نشود. کوپریزون به صورت هفته ای دوبار جهت تغذیه حیوان آماده شد. در پایان هفته ۹ همه گروه ها آسان کشی شدند. ضمناً در طول مطالعه ریزش آماری وجود نداشت.

تمرین تناوبی شدید به عنوان یک رویکرد کارآمد برای بهبود سلامت جسمی و شناختی، توجه زیادی را کسب نموده است (۱۸). علاوه بر این، برنامه های تمرینی برای بیماران معمولاً با شدت پایین تا متوسط اجرا می شود ولی امروزه به این نتیجه رسیده اند که تمرین تناوبی شدید با دوره های ریکاوری فعال، در بیماری های گوناگون، ممکن، ایمن و قابل تحمل هستند (۱۹). هم چنین تمرین تناوبی با شدت بالا می تواند یک جایگزین موثر برای تمرین تداومی باشد که تغییرات مشابه یا حتی بیشتر در نشانگرهای مرتبط با سلامت در افراد سالم و بیمار ایجاد می کند (۲۰). چندین مطالعه اثرات بیشتر تمرین تناوبی با شدت بالا در مقایسه با تمرینات هوازی تداومی در بهبود وضعیت آمادگی جسمانی و پلاستیسیته مغزی در بیماران سکنه مغزی و سالم را نشان داده اند (۲۱، ۲۲، ۱۸). در تحقیقی زیمر و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که تمرین تناوبی با شدت بالا باعث بهبود حافظه کلامی و آمادگی هوازی در بیماران مبتلا به MS شد (۲۳). با این وجود تاثیر تمرین تناوبی با شدت بالا بر وضعیت دمیلتاسیون در CNS مشخص نبوده و نیازمند مطالعات بیشتری است. بنا بر این در این مطالعه فرض شده است که تمرینات تناوبی به دلیل ماهیت شدت بالای آن سبب بهبود احتمالی وضعیت دمیلتاسیون بیماران MS می شود. هم چنین اطلاعات بیشتر در مورد اثرات پاتوفیزیولوژیک ورزش، مانند سطح نوروتروفین ها، برای کمک به شناسایی مکانیسم های خاص درگیر در فعالیت مورد نیاز است.

بنا بر این، در این مطالعه، ما به دنبال این هستیم که اثر پیش آماده سازی تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن فاکتور رشد عصب و ژن های مرتبط با سنتز میلین



شکل شماره ۱. طرح تحقیق: برنامه تمرینی به مدت ۹ هفته همراه با رژیم غذایی نرمال در ۴ هفته اول اجرا شد. جهت ایجاد مدل دمیلتاسیون به دو گروه تمرین+کوپریزون و گروه کوپریزون در ۵ هفته آخر رژیم غذایی کوپریزون داده شد.

پروتکل تمرینی: موش ها پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات به مدت سه روز برای سازگاری با محیط و رسیدن به حد وزنی مطلوب نگهداری شدند. ابتدا به منظور آشناسازی حیوانات با شرایط تمرین به مدت یک هفته روزانه با سرعت ۵-۱۰ متر در دقیقه، به مدت ۵-۱۰ دقیقه با شیب صفر درجه روی تردمیل به فعالیت پرداختند. در پایان هفته آشناسازی، آزمون عملکرد ورزشی مدرج برای اندازه گیری حداکثر سرعت اجرا شد. این آزمون با سرعت ۶ متر بر دقیقه آغاز و سرعت تردمیل به ازای هر ۱ دقیقه ۱ متر بر دقیقه افزایش یافت تا جایی که موش ها قادر به دویدن نباشند (۲۴). سپس تمرینات اصلی آغاز شد و گروه ها پنج روز در هفته به مدت ۹ هفته، به اجرای فعالیت روی تردمیل پرداختند. در طول این دوره، مدت زمان و

سرعت تمرین به طور منظم افزایش یافت. مدت زمان اولین جلسه ۱۱ دقیقه بود، برنامه تمرینی در ابتدا شامل ۳ دقیقه گرم کردن با سرعت ۶ متر در دقیقه، ۲ تناوب ۲ دقیقه ای با سرعت ۹ متر در دقیقه (شدت ۹۰-۸۵ درصد حداکثر سرعت) و استراحت فعال ۱ دقیقه ای بین تناوب ها با سرعت ۶ متر در دقیقه (شدت ۶۰-۵۰ درصد حداکثر سرعت) و ۳ دقیقه سرد کردن با سرعت ۶ متر در دقیقه، انجام پذیرفت. هر دو هفته یک وهله ۳ دقیقه ای به زمان تمرین اضافه شد. در پایان هر دو هفته، آزمون حداکثر سرعت انجام شد و سرعت تمرینی جدیدی برای تمرین هفته بعد، در نظر گرفته می شد. شیب تردمیل در همه مراحل تمرین صفر بود (جدول شماره ۱) (۲۴، ۲۵).

جدول شماره ۱. برنامه هفتگی تمرینات

سرعت در مرحله تناوب شدید m/min	سرعت در مرحله استراحت فعال m/min	مسافت طی شده (m)	سرعت در مرحله تناوب شدید m/min	تعداد تناوب ها	زمان اصلی تمرین (min)	گرم کردن	هفته ها
۹	۶	۷۸	۹	۲	۱۱	۵۰	هفته ۱
۹	۶	۱۰۲	۹	۳	۱۴	۵۰	هفته ۲
۱۱	۷	۱۲۲	۱۱	۳	۱۴	۶۰	هفته ۳
۱۱	۷	۱۵۱	۱۱	۴	۱۷	۶۰	هفته ۴
۱۳	۸	۱۷۶	۱۳	۴	۱۷	۶۰	هفته ۵
۱۳	۸	۲۱۰	۱۳	۵	۲۰	۶۰	هفته ۶
۱۵	۹	۲۴۰	۱۵	۵	۲۰	۶۰	هفته ۷
۱۵	۹	۲۷۹	۱۵	۶	۲۳	۶۰	هفته ۸
۱۷	۱۰	۳۱۴	۱۷	۶	۲۳	۶۰	هفته ۹

بررسی اثرات کوپریزون بر رفتار حیوانات مورد مطالعه: در این مرحله رفتار حیوانات مورد مطالعه بر اساس تست استاندارد میدان باز (اوپن فیلد)، در هفته های مختلف جهت اندازه گیری تاثیر کوپریزون روی فعالیت حرکتی نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جعبه میدان باز از جنس چوب و به رنگ سفید با اندازه ۷۲ در ۷۲ سانتی متر ارتفاع ۳۶ سانتی متر تشکیل شده بود. خطوط کف جعبه به ۱۶ مربع ۱۸ در ۱۸ سانتی متر تقسیم شد (۲۶). مدت زمان هر تست ۵ دقیقه بود. پس از قرار دادن هر موش و پایان تست جعبه توسط الکل اتیلن ۷۰ درصد تمیز می شد. تست ها راس ساعت ۹-۱۱ صبح پنج شنبه هر هفته، از هفته ۵ تا هفته ۹ انجام می شد و دو متغیر میزان مسافت طی شده در

طول تست جهت اندازه گیری فعالیت حرکتی و متغیر تعداد ایستادن ها روی دوپا (ریپرینگ ها) جهت اندازه گیری حرکت عمودی حیوان ثبت شد. پایین بودن میزان این متغیرها در گروه کوپریزون حاکی از تایید اثر کوپریزون می باشد.

بی هوش نمودن و آسان کشی موش ها و نمونه گیری بافت ها: جهت بی هوش کردن موش ها از داروی کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی استفاده شد. پس از جدا کردن سر حیوانات، جداسازی بافت مغز و سپس هیپوکامپ انجام شد. بافت های پنج نمونه در فرمالین ۱۰ درصد جهت آزمایش های بافتی و پنج نمونه دیگر

در فریزر ۷۰- برای ارزیابی های بیوشیمیایی نگهداری شد.

*ارزیابی بافتی:* نمونه های تثبیت شده در محلول فرمالین خارج شدند و جهت انجام عملیات آماده سازی قطعات بافتی به دستگاه تمام اتوماتیک هیستوکینت (RX- 11B, Tissue tek rotary, Japan) انتقال داده شدند. سپس برش هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر با استفاده از دستگاه میکروتوم (Germany LEICA -RM2245) از هر یک از نمونه ها تهیه گردید. مقاطع تهیه شده پس از انتقال به روی لام به روش معمولی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند و تصاویر مناسب با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و دوربین Microscope Digital Dinolite نصب شده روی میکروسکوپ و نرم افزار Capture Dino تهیه شد، نهایتاً هیپوکامپ شاخ آمون (CA) و شکنج دندان ای (DG) از نظر تعداد سلول های الیگوندروسیت مورد بررسی قرار گرفت.

*استخراج RNA و سنتز cDNA* استخراج RNA از نمونه ها با استفاده از کیت RNXTM (SinaClon Bioscience, Iran) و مطابق دستورالعمل کیت انجام

شد. غلظت و میزان خلوص RNA استخراج شده با استفاده از قرائت جذب نمونه ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ با استفاده از اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر (Eppendorf, Germany) انجام و نمونه هایی که نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ آن ها بالای ۱/۸ بود، جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت (YT4500, Iran) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت.

*اندازه گیری بیان کمی ژن:* به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن های NGF، PLP و MBP از آزمون PCR در زمان حقیقی، دستگاه Light cycler Detection System (Roche، آمریکا) و کیت SYBR Green qPCR MasterMix 2X (یکتا تجهیز، ایران) بر پایه کاربرد رنگ سایبرگرین استفاده شد. در این مطالعه از ژن GAPDH موش به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده و به طور موازی با ژن هدف تکثیر شد. در جدول شماره ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی که توسط شرکت بیونر کره جنوبی تولید شده مشخص شده است.

جدول شماره ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای Real-time PCR

Gene name	Sequence
PLP-mice-F	CACTTACAGCAGGTGATTAGAGG
PLP-mice-R	AAACAAGAGATAAACAACCTGGGA
MBP-mice-F	AGTCGCAGAGGACCCAAGAT
MBP-mice-R	GACAGGCCTCTCCCTTTC
NGF-mice-F	CTTACAGAGTTTTGGCCTG
NGF-mice-R	CATTACGCTATGCACCTCAGA
GAPDH-mice-F	CTGGAGAAACCTGCCAAGTA
GAPDH-mice-R	GAAGAGTGGGAGTTGCTGTT

مقتر استریل فاقد RNase در استریپ های مخصوص ۰/۲ میلی لیتری در پوش دار مخصوص واکنش PCR در زمان حقیقی محصول شرکت (Biorad، آمریکا) انجام شد.

واکنش زنجیره ای پلی مرز با شرایط زیر انجام شد: ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۵۰ تکرار با چرخه های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها به الگو و طویل سازی.

در ابتدا برای انجام Real-time PCR، نمونه cDNA ساخته شده به نسبت ۱ به ۲ با آب مقطر استریل رقیق شد. برای این منظور چون حجم نهایی cDNA مورد نظر ۲۰ میکرولیتر بود به آن ۲۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد.

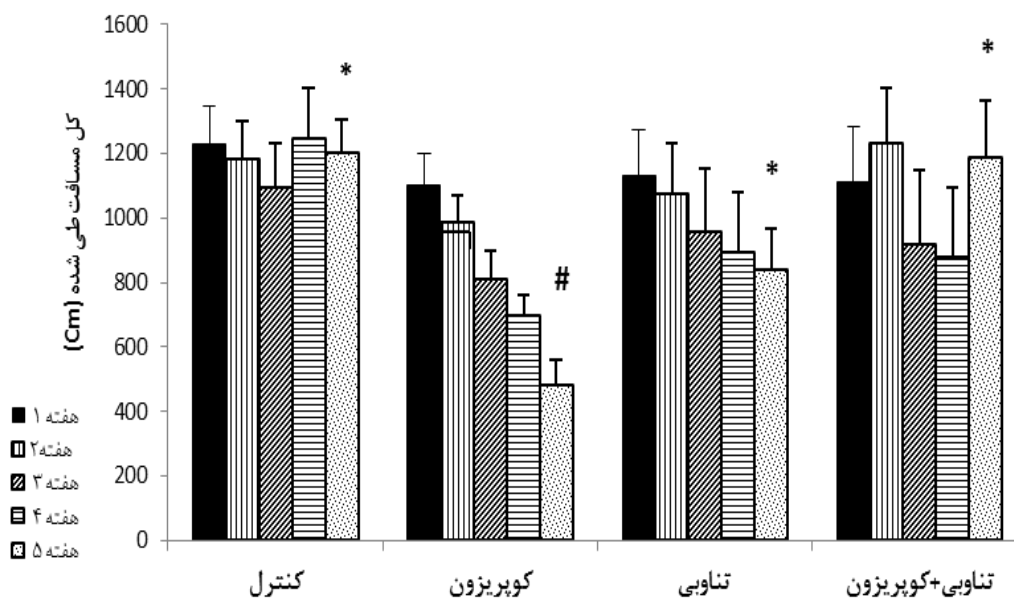
واکنش ها در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر محلول xSyber Green qPCR Master Mix، ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۲/۷۵ میکرولیتر آب

آزمون تحلیل واریانس برای اندازه های تکراری استفاده شد.

### یافته های پژوهش

نتایج ارزیابی رفتاری میدان باز: نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر رفتار حیوانات در تست میدان باز در هفته های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که کل مسافت طی شده در هفته پنجم در گروه کوپریزون ( $483/83 \pm 75/03$ ) کاهش معناداری نسبت به دیگر گروه های تحقیق داشت، علاوه بر این بیشترین تغییرات رفتاری در گروه کوپریزون در هفته پنجم دیده شد ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱).

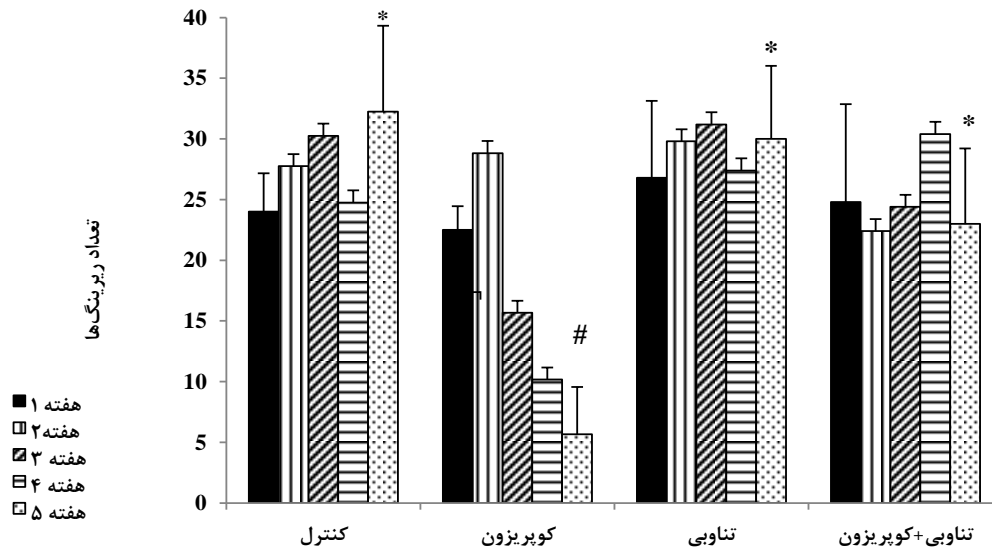
برای هر واکنش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. نمونه های کنترل منفی فاقد cDNA و نمونه حاوی RNA در هر واکنش در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از روش مقایسه ای  $\Delta\Delta Ct$  و با استفاده از نرم افزار Light Cycler SW1.1 مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بر اساس فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش شدند. تجزیه و تحلیل/اطلاعات: اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS vol.21 تحلیل شد. به منظور بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. برای ارزیابی اختلاف بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون پیگیری LSD استفاده شد. برای آنالیز داده های رفتاری (مسافت پیموده شده و ایستادن بر روی دو پا) از



نمودار شماره ۱. کل مسافت طی شده در تست رفتاری میدان باز در گروه کوپریزون در مقایسه با دیگر گروه ها. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. \*: تفاوت معنادار با گروه کوپریزون در هفته پنجم ( $P < 0.05$ ). #: تفاوت معنادار بین هفته چهارم و پنجم در گروه کوپریزون ( $P < 0.05$ ).

گروه های تحقیق داشت، علاوه بر این بیشترین تغییرات رفتاری در گروه کوپریزون در هفته پنجم دیده شد (نمودار شماره ۲).

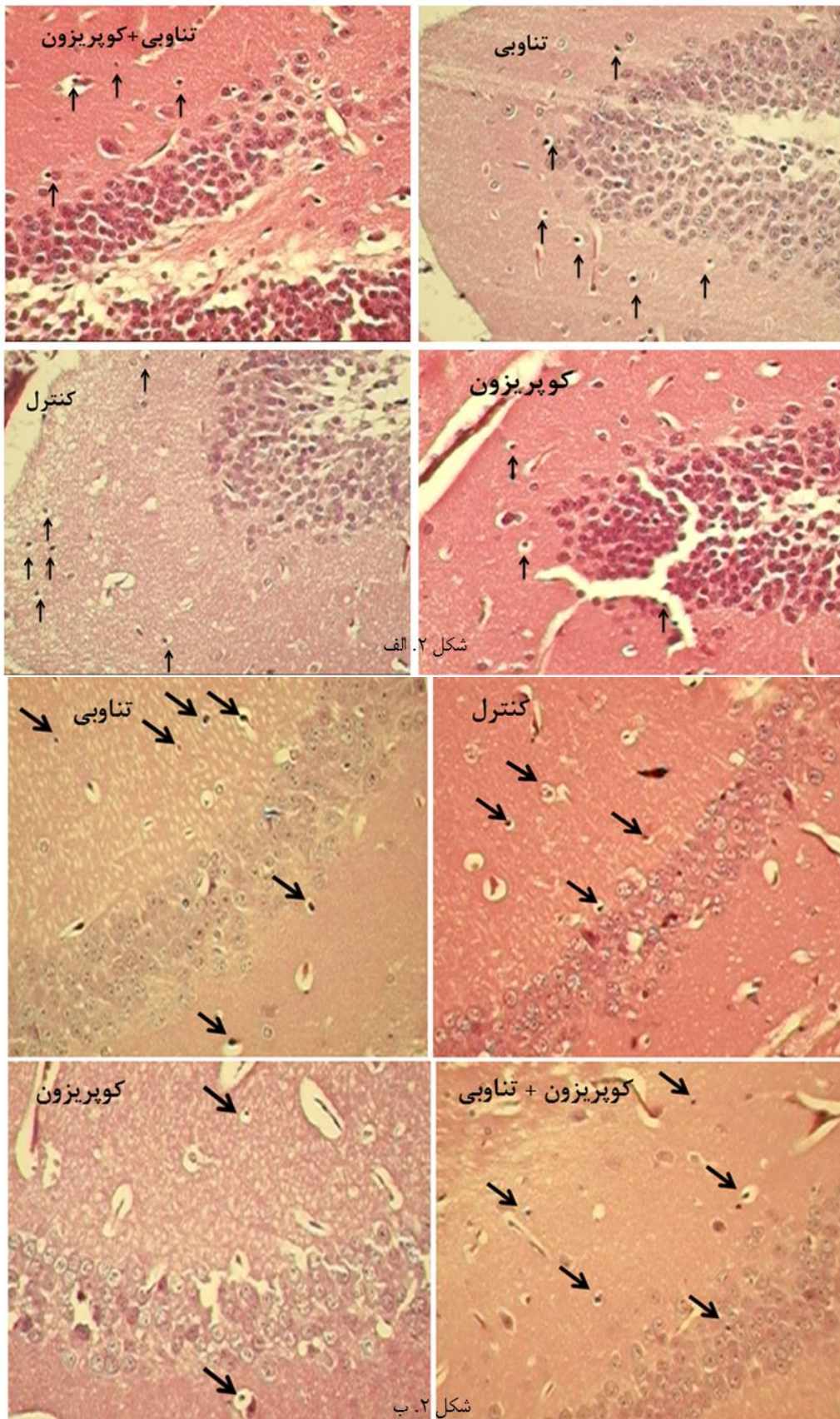
هم چنین نتایج نشان داد که تعداد ایستادن ها (ریپرینگ ها) در هفته پنجم در گروه کوپریزون ( $5/67 \pm 1/94$ ) کاهش معناداری نسبت به دیگر



نمودار شماره ۲. تعداد ربرینگ‌ها در تست رفتاری میدان باز در گروه کوپریزون در مقایسه با دیگر گروه‌ها. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. \*: تفاوت معنادار با گروه کوپریزون در هفته پنجم ( $P < 0.01$ ). #: تفاوت معنادار بین هفته چهارم و پنجم در گروه کوپریزون ( $P < 0.05$ ).

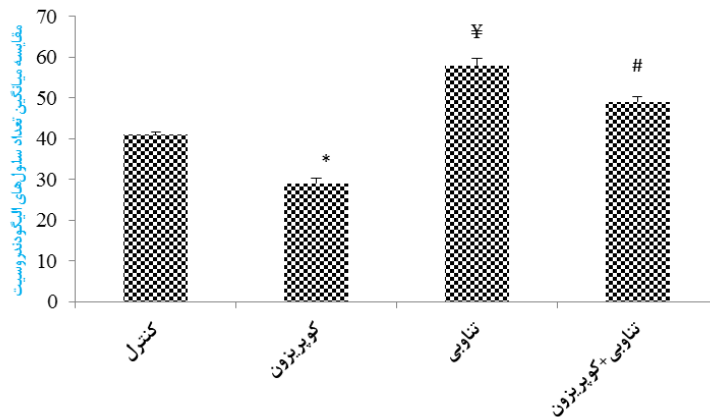
نتایج بافت شناسی: نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌های الیگودندروسیت در هیپوکامپ در گروه‌های مختلف (شکل شماره ۲) نشان داد که بیشترین تعداد الیگودندروسیت در گروه تمرین تناوبی ( $58 \pm 1/7$ ) و کمترین تعداد در گروه کوپریزون ( $29 \pm 1/4$ ) بود و تفاوت معناداری بین گروه‌های مداخله نسبت به گروه کنترل ( $41 \pm 0/63$ ) وجود داشت. تعداد سلول‌های الیگودندروسیت در گروه کوپریزون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت و پیش‌آماده‌سازی با تمرین تناوبی باعث افزایش معنادار تعداد الیگودندروسیت‌ها در هیپوکامپ در گروه تخریب میلین القاء شده با کوپریزون ( $49 \pm 1/2$ ) نسبت به گروه کوپریزون شد ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۳ و جدول شماره ۳).

نتایج بافت شناسی: نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌های الیگودندروسیت در هیپوکامپ در گروه‌های مختلف (شکل شماره ۲) نشان داد که بیشترین تعداد الیگودندروسیت در گروه تمرین تناوبی ( $58 \pm 1/7$ ) و کمترین تعداد در گروه کوپریزون ( $29 \pm 1/4$ ) بود و تفاوت معناداری بین گروه‌های مداخله نسبت به گروه کنترل ( $41 \pm 0/63$ ) وجود داشت. تعداد سلول‌های



شکل شماره ۲. تصاویر رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین سلول های الیگودندروسیت در هیپوکامپ گروه های مختلف الف. شکنج دندانته ای و ب. شاخ آمون (فلش های سیاه سلول های الیگودندروسیت را نشان می دهد، بزرگ نمایی 400x)

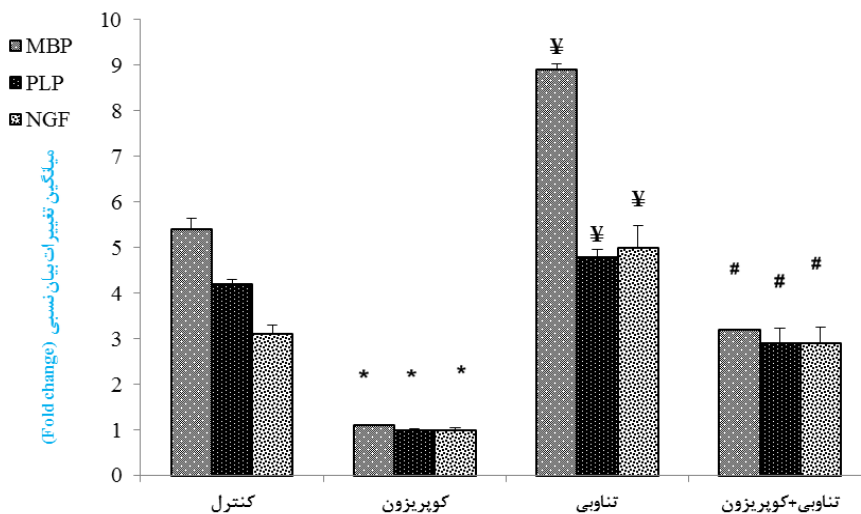




نمودار شماره ۳. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های الیگودندروسیت‌ها در هیپوکامپ گروه‌های تحقیق. (\*) تفاوت معنادار با گروه کنترل. (#) تفاوت معنادار با گروه کنترل و کوپریزون. (¥) تفاوت معنادار با گروه کنترل، تناوبی+کوپریزون و کوپریزون ( $P<0.05$ )

داشت. علاوه بر این، پیش آماده سازی با تمرین تناوبی در گروه تخریب میلین القاء شده با کوپریزون ( $3/38 \pm 0/20$ ) منجر به افزایش معنادار بیان ژن MBP در مقایسه با گروه کوپریزون شد. هم چنین تغییر بیان ژن PLP هیپوکامپ در گروه‌های مختلف نشان داد که تمرین تناوبی ( $5/23 \pm 0/23$ ) منجر به افزایش معنادار آن نسبت به گروه کنترل ( $4/25 \pm 0/13$ ) شد. کوپریزون ( $1/18 \pm 0/07$ ) اثر منفی بر بیان ژن PLP در مقایسه با گروه کنترل داشت. هم چنین پیش آماده سازی با تمرین تناوبی در گروه تخریب میلین القاء شده با کوپریزون ( $2/37 \pm 0/10$ ) منجر به افزایش معنادار بیان ژن PLP در مقایسه با گروه کوپریزون شد ( $P<0.05$ ) (نمودار شماره ۴ و جدول شماره ۳).

نتایج بیان ژن: نتایج تغییرات بیان ژن در هیپوکامپ گروه‌های مختلف نشان داد که تمرین تناوبی ( $5/4 \pm 0/38$ ) منجر به افزایش معناداری در بیان ژن NGF نسبت به گروه کنترل ( $3/06 \pm 0/21$ ) شد. هم چنین کوپریزون ( $1/16 \pm 0/12$ ) اثر منفی بر بیان ژن NGF در مقایسه با گروه کنترل داشت و پیش آماده سازی با تمرین تناوبی در گروه تخریب میلین القاء شده با کوپریزون ( $2/9 \pm 0/36$ ) منجر به افزایش معنادار بیان ژن NGF در مقایسه با گروه کوپریزون شد. در رابطه با تغییر بیان ژن MBP، تمرین تناوبی ( $8/98 \pm 0/17$ ) منجر به افزایش معنادار آن نسبت به گروه کنترل ( $5/23 \pm 0/20$ ) شد و در گروه کوپریزون ( $1/04 \pm 0/03$ ) تفاوت معناداری با گروه کنترل وجود



نمودار شماره ۴. مقایسه میانگین تغییرات بیان نسبی ژن‌های هدف در مقایسه با بیان ژن GAPDH در گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. (\*) تفاوت معنادار با گروه کنترل. (#) تفاوت معنادار با گروه کنترل و کوپریزون. (¥) تفاوت معنادار با گروه کنترل، تناوبی+کوپریزون و کوپریزون ( $P<0.05$ ).

جدول شماره ۳. نتایج آماری و مقایسه بین گروهی

متغیر	گروه	MD	P	گروه	MD	P	گروه	MD	P
الیگودندروسیت	تناوبی+ کوپریزون	-۹	*۰/۰۰	تناوبی	۱۷/۲	*۰/۰۰	کنترل	۱۱/۶	*۰/۰۰
	کنترل	۸/۲	*۰/۰۰	کوپریزون	۲۸/۸	*۰/۰۰	کنترل	۸۵/۲	*۰/۰۰
	کوپریزون	۱۹	*۰/۰۰						
NGF	تناوبی+ کوپریزون	-۲/۱	*۰/۰۰	تناوبی	۱/۸	*۰/۰۰	کنترل	۲/۱	*۰/۰۰
	کنترل	-۰/۲	*۰/۰۰	کوپریزون	۴	*۰/۰۰	کنترل	۲۵/۹	*۰/۰۰
	کوپریزون	۱/۸	*۰/۰۰						
MBP	تناوبی+ کوپریزون	-۵/۶	*۰/۰۰	تناوبی	۳/۴	*۰/۰۰	کنترل	۴/۳	*۰/۰۰
	کنترل	-۲/۲	*۰/۰۰	کوپریزون	۷/۸	*۰/۰۰	کنترل	۵۵۰/۶	*۰/۰۰
	کوپریزون	۲/۱	*۰/۰۰						
PLP	تناوبی+ کوپریزون	-۱/۸	*۰/۰۰	تناوبی	۰/۶۲	*۰/۰۰	کنترل	۳/۱	*۰/۰۰
	کنترل	-۱/۲	*۰/۰۰	کوپریزون	۳/۷۵	*۰/۰۰	کنترل	۷۳/۸	*۰/۰۰
	کوپریزون	۱/۸	*۰/۰۰						

MD: اختلاف میانگین. \* تفاوت معنادار.

### بحث و نتیجه گیری

با توجه به کمبود اطلاعات در مورد اثر پیش درمانی فعالیت ورزشی در بیماران MS، این مطالعه با هدف بررسی اثر حفاظتی پیش آماده سازی فعالیت ورزشی، به روش تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن فاکتور رشد عصب و ژن های مرتبط با سنتز میلین در مدل کوپریزون انجام شد. نتایج نشان داد که ۵ هفته رژیم کوپریزون موجب کاهش تعداد کل سلول های الیگودندروسیت و میزان بیان ژن های NGF، MBP و PLP در هیپوکامپ می شود. هم چنین، فعالیت ورزشی پیش از دمیالیناسیون سبب افزایش تعداد سلول های الیگودندروسیت و افزایش بیان ژن های NGF، MBP و PLP در بافت هیپوکامپ و مانع اختلالات حرکتی شد.

سرکوب پیشرونده سیستم ایمنی برای درمان MS پیشرونده کافی نیست. بنا بر این، مدل های تجربی دیگری، برای مطالعه دمیلینه شدن بدون واسطه سیستم ایمنی و تحلیل آکسون از طریق تخریب الیگودندروسیت ها مورد نیاز است. برای این منظور از مدل سمی تخریب میلین با کوپریزون استفاده شد. اگر موش های جوان با کوپریزون تغذیه شوند، دمیلینه شدن رخ می دهد. بعد از قطع سم کوپریزون، میلین سازی مجدد خود به خودی دیده می شود. در نتیجه مدل کوپریزون به عنوان یک ابزار مفید برای پژوهش در MS، همبستگی خوبی با ویژگی های هیستوپاتولوژیک MS دارد (۲۷).

یافته های پژوهش حاضر در رابطه با تعداد سلول های الیگودندروسیت با نتایج آوارز ساودرا و همکاران (۲۰۱۶) و آن و همکاران (۲۰۱۶) هم خوان می باشد؛ آوارز ساودرا و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه ای بر روی موش مدل آتاکسیا نشان دادند که با تمرین در چرخ دوار میلیناسیون و تعداد سلول های الیگودندروسیت در مغز پسین افزایش یافته است، هم چنین نشان دادند که بازسازی مجدد میلین در ضایعات عصبی در مدل های حیوانی و در انسان به واسطه تمرین منظم در سیستم عصبی مرکزی انجام می شود (۲۸). هم چنین آن و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که چهار هفته تمرین بر روی ترمیل، سلول های الیگودندروسیت در هیپوکامپ را بعد از سخته مغزی افزایش می دهد که نشان دهنده اثر مفید ورزش در کمک به بهبود پلاستیسه عصبی است (۲۹).

برناردز و همکاران (۲۰۱۶) به مطالعه اثر ورزش شنای منظم بر روی میلیناسیون در موش مدل MS پرداختند، نتایج تحقیق نشان داد که ۶ هفته شنای منظم باعث کاهش دمیالیناسیون و عدم تغییر در میزان سلول های الیگودندروسیت در نخاع موش مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) شد. در تحقیق برناردز میزان پروتئین MBP بین دو گروه تمرین و EAE در مقایسه با گروه بدون تمرین EAE تفاوت وجود نداشت. با این حال، PLP در گروه تمرین و EAE به طور قابل توجهی افزایش یافت، که نشان

دهنده حمایت تمرین از الیگودندروسیت و جلوگیری از کاهش غلاف میلین است (۱۲).

یافته های پژوهش حاضر در رابطه با بیان ژن MBP با نتایج لی و همکاران (۲۰۱۷)، کیم و همکاران (۲۰۱۷) و هانونی کیم و همکاران (۲۰۱۷) هم خوان می باشد؛ لی و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیقی نتیجه گرفتند که تمرین بر روی تردمیل متعاقب هیپوپرفیوژن ایسکمی مزمن مغز از کاهش بیان MBP در جسم پینه ای جلوگیری به عمل می آورد (۳۰). هم چنین کیم و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ورزش منظم باعث افزایش سطح MBP می شود. آن ها نشان دادند که MBP برای حفظ ثبات ساختاری میلین مهم است و عامل ضروری برای هدایت عصب کارآمد است، آن ها نشان دادند که تمرین منظم با بهبود نواقص سلولی مولکولی هیپوکامپ در بیماران MS باعث تقویت عملکرد شناختی می شود (۳۱). هانونی کیم و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ای بیان MBP را برای تعیین ضخامت و اجزای میلین در جسم پینه ای اندازه گیری کردند. ضخامت و چگالی میلین به طور قابل توجهی در موش های صحرایی که تحت تمرین بودند، افزایش یافت. این یافته ها نشان می دهد که تمرین ورزشی ممکن است باعث بهبود عملکرد از طریق ارتقا بلوغ اجزای میلین مغز شود (۳۲).

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات اخیر نشان دهنده تاثیر مثبت تمرین منظم بر حفظ، تمایز و بلوغ سلول های پیش ساز الیگودندروسیت، حمایت تمرینات ورزشی از الیگودندروسیت های بالغ در برابر آسیب های عضلانی، هم چنین حفظ و افزایش سطح MBP و PLP در سیستم عصبی می باشد، هم چنین تحقیقات نشان داده اند فعالیت بدنی از طریق افزایش فعالیت نورونی باعث الیگودندروژنز و میلیناسیون می شود (۳۳) و با فعال سازی سلول های الیگودندروسیت موجب بهبود علائم MS می شوند. علاوه بر این، نشان داده شده است که حفاظت در برابر دمیلیناسیون ممکن است از طریق افزایش تکثیر سلول های پیش ساز الیگودندروسیت ها و بلوغ آن ها رخ دهد (۳۴).

مطالعات انجام شده بیشتر به بررسی اثرات ورزش منظم بدون توجه به شدت آن بر ویژگی های عضلانی و متابولیکی، آمادگی هوازی، نوروتروفین ها و عملکرد شناختی در بیماران MS تمرکز داشته اند، که نتایج آن ها حاکی از تعدیل ویژگی های فیزیولوژیکی و شناختی ناشی از تمرینات ورزشی بود. به نظر می رسد که افزایش میزان نوروتروفین ها ناشی از فعالیت ورزشی، به دلیل افزایش فعالیت نورونی به دنبال فعالیت ورزشی است. فعالیت ورزشی موجب افزایش فعالیت نورونی و ترشح بیشتر نوروتروفین ها می شود که پیامد آن ایجاد اثر نوروپروتکتیو بیشتر خواهد بود (۳۵).

مطالعات متعددی اثر تمرینات ورزشی بر حفاظت عصبی را بررسی کرده اند. برناردز و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که پیش آماده سازی با ورزش شنا می تواند موجب افزایش تحمل مغز نسبت به دمیلیناسیون شود. علاوه بر این، افزایش بیان NGF و میزان آن در فعالیت های ورزشی در آزمودنی های انسانی و حیوانی در پژوهش های مختلف گزارش شده است (۳۶). حسینی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند که احتمالاً پیش درمان با استفاده از تمرین شنا از طریق افزایش NGF در حفاظت عصبی موثر است. از این رو به نظر می رسد که تمرینات شنا رویکردی مناسب جهت افزایش حفاظت سلول های عصبی بافت مغز در برابر عوامل مستعدکننده بیماری MS و ارتقای سطح سلامت مغز است (۳۷). پاتل و وایت (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان NGF در گروه تمرین نسبت به بقیه گروه ها افزایش معنادار داشت، NGF اثر تعدیل کننده بر سیستم ایمنی دارد که ممکن است باعث تعادل بین سلول های کمک کننده T1 و T2 شود (۱۵). هم چنین چایی و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی اثر تمرین اجباری تردمیل بر NGF و آبشار سیگنالینگ PI3-K/Akt در موش های مسن پرداخت. نتایج نشان داد که تمرین تردمیل با شدت متوسط سطح NGF را افزایش می دهد و مرگ سلولی آپوپتوزی در هیپوکامپ موش های سالم را کاهش دهد (۱۶). نتایج تحقیق حاضر در رابطه با اثر مثبت تمرین تناوبی در افزایش NGF، پیشنهاد می کند

این مطالعه نشان داد که تمرین تناوبی هنگامی که به عنوان یک محرک پیش آماده سازی استفاده شود، از طریق تنظیم افزایشی فاکتور رشد عصب، توانایی ساختار مغزی را برای خودترمیمی پس از آسیب بهبود می بخشد و می تواند در برابر آسیب های بافتی و اختلالات نورولوژیکی ناشی از دمیالیناسیون، اثرات محافظتی داشته باشد و موجب کاهش میزان آسیب شود. علاوه بر این، همزمان با افزایش بیان ژن های بیوسنتز میلین و فاکتور رشد عصب در هیپوکامپ متعاقب تمرین تناوبی، افزایش تعداد سلول های لیگودندروسیت نیز مشاهده شد که نشان دهنده اثرات دوگانه تمرین تناوبی بر بسط و گسترش سلول های لیگودندروسیت و افزایش بیان ژن های بیوسنتز میلین و فاکتور رشد عصب است. در آخر پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری جهت بررسی نقش دقیق شدت تمرین ورزشی در ساز و کارهای ملکولی درگیر در حفاظت عصبی (در شرایط بیماری های عصبی) در آینده انجام شود.

کد/خلاق: (EE/97.24.3.69981/SCU.AC.IR)

احتمالاً تمرین تناوبی در مقابل عارضه دمیلینه کننده که مرگ سلول های عصبی میلین ساز را به دنبال دارد اثر نوروپروتکتیو بیشتری دارد. به طور کلی، تنظیم افزایشی NGF پس از پیش آماده سازی با تمرین تناوبی، افزایش بقای نورونی بعد از دمیالیناسیون را در پی دارد.

مکانیسم های اساسی اثر نوروپروتکتیو فعالیت ورزشی هنوز به طور کامل مشخص نشده است، از جمله مکانیسم احتمالی درگیر می تواند افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش تشکیل رادیکال های آزاد باشد. استرس اکسیداتیو در آپوپتوز سلول های لیگودندروسیت، تخریب میلین و در نهایت آسیب عصب در مدل کوپریزون MS نقش مهمی دارد (۳۸). تمرین تناوبی شدید منجر به بهبود فعالیت های آنزیمی، تقویت ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیونژن میتوکندری می شود (۲۰). از این رو تمرین تناوبی به مدت طولانی می تواند با اثر محافظتی بر میتوکندری، به واسطه کاهش آسیب های استرس اکسیداتیو در سلول های عصبی باعث حفظ لیگودندروسیت ها و سلول های مغزی شود.

#### References

- Ettle B, Schlachetzki JC, Winkler J. Oligodendroglia and myelin in neurodegenerative diseases more than just bystanders? *Mol Neurobiol* 2016; 53: 3046-62. doi: 10.1007/s12035-015-9205-3.
- Bankston AN, Mandler MD, Feng Y. Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration. *Neurosci Bull* 2013; 29: 216-28. doi: 10.1007/s12264-013-1321-3.
- Streber R, Peters S, Pfeifer K. Systematic review of correlates and determinants of physical activity in persons with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil* 2016; 97(4): 633-45. e29. doi: 10.1016/j.apmr.2015.11.020.
- Etemadifar M, Izadi S, Nikseresht A, Sharifian M, Sahraian MA, Nasr Z. Estimated prevalence and incidence of multiple sclerosis in Iran. *Eur Neurol* 2014; 72: 370-4. doi: 10.1159/000365846.
- Bansi J, Bloch W, Gamper U, Kesselring J. Training in MS influence of two different endurance training protocols aquatic versus overland on cytokine and neurotrophin

- concentrations during three week randomized controlled trial. *Mult Scler J* 2013; 19: 613-21. doi: 10.1177/1352458512458605.
- Quarles RH, Macklin WB, Morell P. Myelin formation structure and biochemistry. *Basic Neurochem Mole Cell Med Aspects* 2006; 7: 51-71.
- Sachs HH, Bercury KK, Popescu DC, Narayanan SP, Macklin WB. A new model of cuprizone mediated demyelination/remyelination. *ASN Neuro* 2014; 6: 1-16. doi: 10.1177/1759091414551955.
- Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good the bad and the bottom line. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1074-7. doi: 10.1038/nn.3168.
- Lublin FD. Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurologic Clin* 2005; 23: 1-15. doi: 10.1016/j.ncl.2004.09.003.
- Sung C, Chiu CY, Lee EJ, Bezyak J, Chan F, Muller V. Exercise diet and stress

- management as mediators between functional disability and health related quality of life in multiple Sclerosis. *Rehabil Counse Bul* 2013; 56: 85-95. doi:10.1177/0034355212439899.
- 11.Motl RW, Sandroff BM, Kwakkel G, Dalgas U, Feinstein A, Heesen C, et al. Exercise in patients with multiple Sclerosis. *Lancet Neurol* 2017; 16: 848-56. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30281-8.
- 12.Bernardes D, Brambilla R, Bracchi V, Karmally S, Dellarole A, Carvalho J, et al. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 2016; 136: 63-73. doi:10.1111/jnc.13354.
- 13.Bonetto G, Charalampopoulos I, Gravanis A, Karagogeos D. The novel synthetic microneurotrophin BNN27 protects mature oligodendrocytes against cuprizone induced death, through the NGF receptor TrkA. *Glia* 2017; 65: 1376-94. doi: 10.1002/glia.23170.
- 14.Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 58-65. doi: 10.1038/nrn2298.
- 15.Patel DI, White LJ. Effect of 10 day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013; 38: 194-9. doi: 10.1139/apnm-2012-0303.
- 16.Chae CH, Kim HT. Forced moderate intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3 kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int* 2009; 55: 208-13. doi: 10.1016/j.neuint.2009.02.024.
- 17.Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. The effect of exercise on trkA in the contralateral hemisphere of the ischemic Rat brain. *Brain Res* 2010; 1353: 187-93. doi: 10.1016/j.brainres.2010.06.057.
- 18.Kao SC, Westfall DR, Soneson J, Gurd B, Hillman CH. Comparison of the acute effects of high intensity interval training and continuous aerobic walking on inhibitory control. *Psychophysiology* 2017; 54: 1335-45. doi: 10.1111/psyp.12889.
- 19.Wens I, Dalgas U, Vandenabeele F, Grevendonk L, Verboven K, Hansen D, et al. High intensity exercise in multiple Sclerosis effects on muscle contractile characteristics and exercise capacity a randomised controlled trial. *PLos One* 2015; 10: 133697. doi: 10.1371/journal.pone.0133697.
- 20.Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol* 2012; 590: 1077-84. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224725.
- 21.Pinbarre C, Constans A, Brisswalter J, Pellegrino C, Laurin J. Effects of high-versus moderate-intensity training on neuroplasticity and functional recovery after focal Ischemia. *Stroke* 2017; 48: 2855-64. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017962.
- 22.Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol Behav* 2015; 147: 78-83. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.012.
- 23.Zimmer P, Bloch W, Schenk A, Oberste M, Riedel S, Kool J, et al. High-intensity interval exercise improves cognitive performance and reduces matrix metalloproteinases 2 serum levels in persons with multiple Sclerosis a randomized controlled trial. *Mult Scler J* 2017; 1-10. doi: 10.1177/1352458517728342.
- 24.Pereira F, Moraes R, Tibirica E, Nobrega AC. Interval and continuous exercise training produce similar increases in skeletal muscle and left ventricle microvascular density in rats. *Biomed Res Int* 2013; 1-7. doi: 10.1155/2013/752817.
- 25.Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity controlled endurance exercise. *Proteomics* 2009; 9: 106-15. doi: 10.1002/pmic.200800268.
- 26.Sanadgol n, komijani M. [Evaluation of myelin sheath and their related proteins MAG MOG MBP and PLP during cuprizone-induced demyelination in central nervous system of male C57BL/6 Mice]. *JCT* 2017; 8: 12-22. (Persian)
- 27.Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, et al.

- Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain dependent. *Am J Pathol* 2008; 172: 1053-61. doi: 10.2353/ajpath.2008.070850.
28. Alvarez M, Repentigny Y, Yang D, Omeara RW, Yan K, Hashem LE, et al. Voluntary running triggers vgf mediated oligodendrogenesis to prolong the lifespan of snf2h-null ataxic Mice. *Cell Rep* 2016; 17: 862-75. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.030.
29. Ahn JH, Choi JH, Park JH, Kim IH, Cho JH, Lee JC, et al. Long term exercise improves memory deficits via restoration of myelin and microvessel damage, and enhancement of neurogenesis in the aged gerbil hippocampus after ischemic stroke. *Neurorehabil Neural Rep* 2016; 30: 894-905. doi: 10.1177/1545968316638444.
30. Lee JM, Park JM, Song MK, Oh YJ, Kim CJ, Kim YJ. The ameliorative effects of exercise on cognitive impairment and white matter injury from blood brain barrier disruption induced by chronic cerebral hypoperfusion in adolescent Rats. *Neurosci Lett* 2017; 638: 83-9. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.018.
31. Kim TW, Sung YH. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis Mice. *Neurosci* 2017; 346: 173-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.016.
32. Kim HN, Pak ME, Shin MJ, Kim SY, Shin YB, Yun YJ, et al. Comparative analysis of the beneficial effects of treadmill training and electroacupuncture in a Rat model of neonatal hypoxia ischemia. *Int J Mol Med* 2017; 39: 1393-402. doi: 10.3892/ijmm.2017.2970.
33. Tomlinson L, Leiton CV, Colognato H. Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology* 2016; 110: 548-62. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.016.
34. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin 3 and brain derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1998; 18: 5354-65. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-14-05354.1998.
35. Dornbos D, Ding Y. Mechanisms of neuroprotection underlying physical exercise in ischemia-reperfusion injury. 1<sup>th</sup> ed. Croatia Intech Publication. 2012; P. 299-326.
36. Ding Y, Li J, Luan X, Ding Y, Lai Q, Rafols J, et al. Exercise pre conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neurosci* 2004; 124: 583-91. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.029
37. Hosseini H, Fallahmohammadi Z, Valizadegan F. [The effect of swimming exercise with injections of vitamin D supplementation on the levels of Nerve Growth Factor in the brain tissue of female rats with experimental autoimmune encephalomyelitis]. *J Urmia Uni Med Sci* 2017; 28: 64-73. (Persian)
38. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Vanderlinden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 47: 485-505. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004.

## Effect of High Intensity Exercise Preconditioning on the Prevention of Myelin damage in Hippocampus of Male C57BL/6 Mice

Naghibzadeh M<sup>1\*</sup>, Ranjbar R<sup>2</sup>, Tabandeh M<sup>3</sup>, Habibi A<sup>2</sup>

(Received: January 7, 2018)

Accepted: April 21, 2018)

### Abstract

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a common neurodegenerative disease leading to the movement disorder and destruction of myelin. Physical exercise delays the onset of neurodegenerative processes by preventing the destruction of myelin and oligodendrocytes. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of high-intensity exercise preconditioning on gene expression associated with myelin synthesis and a nerve growth factor-induced gene (NGF) in hippocampus of an animal model of demyelination induced by cuprizone (CPZ).

**Materials & Methods:** In total, 40 male C57BL/6 mice were randomly assigned into 4 groups, namely control (C), cuprizone induced demyelination (CPZ), high-intensity interval training (HIIT), and interval training plus CPZ (ITCPZ). The training program was performed on treadmills for 4 weeks, followed by MS induction with 0.2% cuprizone feeding. Meanwhile, the training program continued for 5 weeks with MS induction. The incidence of MS was confirmed by open field test. A real time-PCR was utilized for the measurement of NGF gene expression, myelin basic protein (MBP), and myelin

proteolipid protein (PLP). The hippocampus was also stained with hematoxylin-eosin to measure the number of oligodendrocytes. *Ethics code:* EE/97.24.3.69981/SCU.AC.IR

**Findings:** The results showed that the CPZ group had poorer motor activity, lower expression of NGF, lower levels of MBP, and PLP, and fewer oligodendrocytes in hippocampus than those in control group ( $P < 0.05$ ). In addition, the mRNA levels of NGF, MBP, and PLP as well as the number of oligodendrocyte cells increased in ITCPZ group, compared to the CPZ group ( $P < 0.05$ ). Moreover, cuprizone prevented the abnormal motor activity.

**Discussion & Conclusions:** According to the results, high-intensity exercise preconditioning could enhance the remyelination process in hippocampus. Moreover, it improved neuroprotective effect against MS by increasing the expression of NGF gene in hippocampus.

**Keywords:** Cuprizone, Interval training, Multiple sclerosis, Myelin basic protein, Myelin proteolipid protein, Nerve growth factor

1. Dept of Sports Science, Faculty of Literature and Humanities, Ilam University, Ilam, Iran
  2. Dept of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
  3. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- Corresponding author Email: naghibzadehmaryam@yahoo.com