

Effects of water training with betaine supplementation on vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in the cerebellum of rats with multiple sclerosis

Masoud Moradi¹ , Abdolhamid Habibi^{1*} , MohammadReza Tabande² , Saeed Shakerian¹ 

¹ Dept of Sports Physiology, College of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahwaz, Iran

² Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahwaz, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: May. 26, 2024

Received in revised form:

Oct. 13, 2024

Accepted: Oct. 28, 2024

Published Online: Apr. 16, 2025

* Correspondence to:

Abdolhamid Habibi

Dept of Sports Physiology,
College of Sport Sciences,
Shahid Chamran University of
Ahvaz, Ahwaz, Iran

Email:

h.habibi0338@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory and autoimmune diseases like multiple sclerosis are linked to immune system gene activation and oxidative stress, with betaine demonstrating anti-inflammatory effects by controlling these gene signaling pathways. The aim of the present study was to investigate the effects of water exercises with betaine supplementation on vascular endothelial growth factor and oxidative stress indices in the cerebellum of rats with multiple sclerosis.

Materials & Methods: A study involving 28 adult male rats, aged 12 weeks, was conducted to study MS. MS was induced using cuprizone for 6 weeks, and the rats were divided into 7 groups. Swimming exercises were performed daily for 6 weeks, and betaine was administered daily in drinking water for 6 weeks. Cerebellar tissue was isolated and endothelial growth factor, malondialdehyde, and superoxide dismutase were measured using ELISA kits. Data analysis was done using SPSS V.22, with one-way analysis of variance and LSD post hoc test at a $P < 0.05$ level.

Results: MS disease causes a decrease in endothelial growth factor and superoxide dismutase levels. The lesion + exercise + betaine group showed a significant increase in the endothelial growth factor, a significant decrease in the malondialdehyde and, a significant increase in the superoxide dismutase variable compared to the lesion group ($p \leq 0.001$).

Conclusion: Swimming exercises and betaine supplementation can enhance vascular growth factor indices and oxidative stress in individuals with MS by increasing endothelial growth factors and superoxide dismutase.

Keywords: Multiple Sclerosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Superoxide Dismutase, Swimming Exercises in water, Malondialdehyde

How to cite this paper: Moradi M, Habibi A, Tabande MR, Shakerian S. Effects of water training with betaine supplementation on vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in the cerebellum of rats with multiple sclerosis. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;33(1):96-110.

Introduction

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system characterized by various forms of inflammation, axonal damage, and demyelination. Most patients with MS initially present with a relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) course characterized by inflammatory demyelinating attacks, axonal damage, and varying degrees of repair (1). However, most RRMS patients eventually enter a secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) phase, in which failure of repair

mechanisms leads to progressive neuronal damage and persistent disability (2). Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a major role in the pathologic conditions associated with autoimmune diseases. There is much evidence in various autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis that the VEGF system is interconnected with these disorders. Superoxide dismutase (SOD) also provides the first line of enzymatic defense against intracellular free radicals produced by the excretion of Superoxide dismutase is an enzyme that catalyzes the conversion of



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 33, Issue 1, 2025

superoxide anion to molecular oxygen and hydrogen peroxide and, therefore, is a critical part of cellular mechanisms and antioxidant defenses (8); consequently, control of these pathways has become an essential candidate for controlling inflammation. Swimming exercise enhances anti-inflammatory function and has a neuroprotective effect. Compared with running, swimming can improve the adaptations associated with neuroprotection in MS and produce greater neuroprotective effects. Aquatic exercise is one of the new methods recommended by some texts for MS patients. Therefore, according to the explanations given, conducting a study similar to the present study seems necessary; Accordingly, considering the importance of inflammation in MS and the aforementioned anti-inflammatory roles of betaine supplementation and the role of exercise in controlling complications of diseases, it is likely that betaine, by affecting inflammatory and cellular protective pathways, can improve disorders caused by MS. The aim of the present study was to investigate the effects of water exercises with betaine supplementation on vascular endothelial growth factor and oxidative stress indices in the cerebellum of rats with multiple sclerosis.

Methods

In the present study, 28 adults 12-week-old male Wistar rats with an average weight of 250-300 grams were used. The research samples were purchased from the animal house of Shahid Chamran University of Ahvaz. The animals were kept in groups of four in transparent polycarbonate cages in an environment with a temperature of 20 to 22 degrees Celsius, under conditions of 12 hours of light and 12 hours of darkness. The training groups were familiarized with the pool for 10 minutes, 5 days a week. After familiarizing themselves with the activity in the pool, these animals were divided into 7 groups, each group containing 4 rats, which are the healthy control group, healthy + betaine group, healthy + exercise group, lesion group, lesion + exercise group, lesion + betaine group, and lesion + exercise + betaine group. After dividing the animals into specific groups, Sigma Cuprizone powder was added to the rodent food powder at a weight ratio of 0.5% to induce MS; then it was mixed well, and then, by adding water, the resulting paste was converted into a food pellet and given to the animals for 6 weeks. The

aquatic exercise program was performed in a rodent pool at a water temperature of 25–30°C. Mice in the swimming exercise group swam for 30 minutes, once a day for 6 weeks. To acclimatize the animals, the swimming exercise was performed with the duration of the exercise increasing from the first to the sixth week, with the activity time increasing from 10 minutes on the first day to 30 minutes on the sixth week. Betaine (SIGMA Aldrich) was administered in the drinking water daily (1% betaine) for the 6 weeks of training. After homogenization and centrifugation, the samples were measured using the ELISA method and an ELISA spectrophotometer. The VEGF index was measured using a measurement kit from the Stabioform company, made in the United States, with a sensitivity of 5.01 ng/L, and the SOD enzyme was measured using a special kit for measuring the SOD enzyme, Randox, made in the United Kingdom, with a sensitivity of 0.01 phosphate buffer pH 7.0; malondialdehyde was also measured by spectrophotometry. In this method, malondialdehyde is obtained based on the absorption of the MDA-TBA complex at a wavelength of 532 nm compared to the MDA standard curve. Data analysis was done using SPSS V.22, with one-way analysis of variance and LSD post hoc test at a $P < 0.05$ level.

Results

MS disease causes a decrease in endothelial growth factor and superoxide dismutase levels. The lesion + exercise + betaine group showed a significant increase in the endothelial growth factor variable compared to the lesion group ($p \leq 0.001$). The lesion + exercise + betaine group showed a significant decrease in the malondialdehyde variable compared to the lesion group ($p \leq 0.001$). The lesion + exercise + betaine group showed a significant increase in the superoxide dismutase variable compared to the lesion group ($p \leq 0.001$).

Conclusion

Considering the increase in endothelial growth factors and superoxide dismutase and the decrease in malondialdehyde factor in this study, it can be concluded that swimming exercises combined with betaine supplementation can be used to improve vascular growth factor indices and oxidative stress in people with MS.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources: MM, Formal Analysis, Software, Writing– Review & Editing, Visualization, Supervision: MM, AH, Writing–Original Draft Preparation: MM, AH, MT, SS, Data Curation, Project Administration: MM.

Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Shahid Chamran Ahvaz (EE/1401.2.24.363233/scu.ac.ir). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

Authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Acknowledgment

The authors would like to express their deepest gratitude to the Faculty of Physical Education and the Faculty of Veterinary Medicine of Shahid Chamran University of Ahvaz for their cooperation in conducting this research.

اثر تمرینات در آب همراه با مصرف مکمل بتائین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و شاخص‌های فشار اکسایشی در مخچه رت‌های مبتلا به مالتیل اسکلروزیس

مسعود مرادی^۱، عبدالحمید حبیبی^{۱*}، محمد رضا تابنده^۲، سعید شاکریان^۱

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ گروه علوم پایه، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

نویسنده مسئول:

عبدالحمید حبیبی

گروه فیزیولوژی ورزشی،

دانشکده تربیت بدنی و علوم

ورزشی، دانشگاه شهید چمران

اهواز، اهواز، ایران

Email:

h.habibi0338@gmail.com

مقدمه: ایجاد بیماری‌های التهابی و خودایمنی مانند مولتیپل اسکلروزیس با فعال‌سازی ژن‌های دخیل در عملکرد دستگاه ایمنی و فشار اکسایشی همراه است. نشان داده شده است، بتائین از راه کنترل مسیر سیگنالینگ این ژن‌ها آثار ضدالتهابی دارد؛ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات در آب همراه با مصرف مکمل بتائین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و شاخص‌های فشار اکسایشی در مخچه رت‌های مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از ۲۸ سر رت نر بالغ ۱۲ هفته‌ای نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. آزمودنی‌ها با استفاده از کوپریزون به مدت ۶ هفته به ام‌اس مبتلا گردیدند؛ سپس در ۷ گروه (گروه کنترل سالم، گروه سالم+بتائین، گروه سالم+تمرین، گروه ضایعه، گروه ضایعه+تمرین، گروه ضایعه+بتائین، گروه ضایعه+تمرین+بتائین)، تقسیم شدند. تمرینات شنا به مدت ۳۰ دقیقه، یک‌بار در روز به مدت ۶ هفته اجرا گردید. برای موش‌های تحت درمان با بتائین، بتائین در آب آشامیدنی روزانه (۱ درصد بتائین) در طول ۶ هفته تمرینات استفاده شد. در پایان ۶ هفته، بافت مخچه جدا و فاکتور رشد اندوتلیال، مالون دی‌آلدئید و سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت‌های مخصوص به روش الایزا اندازه‌گیری گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش از نرم‌افزار SPSS v01.22 و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD در سطح ($P < 0.05$) استفاده شد.

یافته‌های پژوهش: بیماری MS باعث کاهش سطوح فاکتور رشد اندوتلیال و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. گروه ضایعه +تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی‌داری را در متغیر فاکتور رشد اندوتلیال نشان داد ($P \leq 0.001$)؛ همچنین در گروه ضایعه +تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، کاهش معنی‌داری در متغیر مالون دی‌آلدئید دیده شد ($P \leq 0.001$). گروه ضایعه +تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی‌داری را در متغیر سوپراکسید دیسموتاز نشان داد ($P \leq 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش فاکتورهای رشد اندوتلیال و سوپراکسید دیسموتاز و کاهش فاکتور مالون دی‌آلدئید در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که از تمرینات شنا همراه با مصرف مکمل بتائین می‌توان برای بهبود شاخص‌های فاکتورهای رشد عروقی و فشار اکسایشی در افراد مبتلا به MS استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، سوپراکسید دیسموتاز، تمرینات شنا در آب، مالون دی‌آلدئید

استاد: مرادی مسعود، حبیبی عبدالحمید، تابنده محمد رضا، شاکریان سعید. اثر تمرینات در آب همراه با مصرف مکمل بتائین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و شاخص‌های فشار اکسایشی در مخچه رت‌های مبتلا به مالتیل اسکلروزیس. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، فروردین ۱۴۰۴؛ ۳۳(۱): ۹۶-۱۱۰.

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis) یک بیماری مزمن دمیeline کننده التهابی دستگاه عصبی مرکزی است که با اشکال مختلف التهاب، آسیب آکسونی و دمیlineسیون مشخص می‌شود. بیشتر بیماران مبتلا به MS در ابتدا یک دوره بیماری عود کننده-فروکش کننده (Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis) را نشان می‌دهند که با حملات دمیline کننده التهابی، آسیب آکسون و درجات مختلف ترمیم مشخص می‌گردد (۱). با این حال، بیشتر بیماران RRMS با گذشت زمان وارد فاز پیش‌رونده ثانویه (Secondary Progressive Multiple Sclerosis) می‌شوند که شکست سازوکارهای ترمیم به تخریب تدریجی عصبی و تجمع مداوم ناتوانی منجر می‌گردد (۲). مسئله مهم درباره بیماری MS این است که علائم و نشانه‌های آن به‌طور گسترده‌ای متفاوت است و به میزان آسیب عصبی و اعصاب تحت تأثیر بستگی دارد. برخی از افراد مبتلا به MS شدید ممکن است توانایی راه رفتن مستقل و یا به‌طور کلی این توانایی را از دست بدهند، درحالی‌که برخی دیگر ممکن است دوره‌های طولانی بهبودی را بدون بروز هیچ‌گونه علائم جدیدی تجربه کنند (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک و تحقیقات ایمونولوژی مولکولی کلیدهای تشخیصی مهمی را برای مولتیپل اسکلروز فراهم کرده‌اند؛ اما هنوز علت دقیق بیماری در پرده ابهام است و تاکنون درمان قطعی برای این بیماری ارائه نشده است.

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor) نقش فراوانی در شرایط پاتولوژیک مرتبط با بیماری‌های خودایمنی دارد. شواهد بسیاری در بیماری‌های خودایمنی مختلف مانند آرتریت روماتوئید و مولتیپل اسکلروزیس مبنی بر ارتباط متقابل میان دستگاه VEGF و این اختلالات وجود دارد (۴). سطح سرمی VEGF با فعالیت بیماری در تعداد فراوانی از بیماری‌های خودایمنی مرتبط است و با استفاده از درمان استاندارد تغییر می‌یابد. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که در بیماری‌های خودایمنی، VEGF از طریق افزایش سلول‌های

دوپامینرژیک ممکن است به‌طور چشمگیری سبب محافظت از سلول‌های عصبی شود. رگ‌زایی توسط تعدادی مولکول انجام می‌گردد که می‌تواند در درمان‌های نوظهور برای بیماران مبتلا به MS در نظر گرفته شود (۴)؛ همچنین مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی با نرون‌زایی و آنژیوژن (Angiogenesis) می‌تواند اثری حفاظتی بر دستگاه عصبی داشته باشد و از بروز بیماری‌های عصبی جلوگیری کند (۵). در طول پیشرفت بیماری، عوامل متعددی مانند اینترلوکین‌ها، سلول‌های پیش‌التهابی و فشارهای اکسایشی سبب آسیب سلول‌های عصبی و تخریب آکسونی می‌شود (۶). در شرایط عادی، میان تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. نبود تعادل در این فرایند سبب القای استرس اکسیداتیو و بروز تغییرات پاتولوژی در سطح ماکرومولکول‌های سلولی، آسیب به غشای لیپیدی سلول و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. پراکسیداسیون لیپیدی یک پیامد آسیب سلولی است که بر اثر حمله رادیکال‌های آزاد به غشای لیپروتئین سلول‌ها رخ می‌دهد (۷). آلدئیدها به‌ویژه مالون دی‌آلدئید (MDA) Malondialdehyde که یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی است، مکرراً به‌عنوان شاخص فشار اکسایشی ناشی از ورزش به‌کاربرده شده‌اند (۷)؛ همچنین سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase (SOD)) اولین خط دفاعی آنزیمی را در برابر رادیکال آزاد درون سلولی که بر اثر دفع تولید می‌شود، به‌وجود می‌آورد. سوپراکسید دیسموتاز آنزیمی است که تبدیل آنیون سوپراکسید را به اکسیژن مولکولی و پروکسید هیدروژن (Hydrogen peroxide) تسریع می‌کند و بنابراین، بخش حیاتی را در سازوکار سلولی و دفاع آنتی‌اکسیدانی تشکیل می‌دهد (۸)؛ در نتیجه، کنترل این مسیرها به‌عنوان کاندیدای ضروری برای کنترل التهاب تبدیل شده است. محققان دریافته‌اند که ماده‌ای به نام بتائین می‌تواند تا حدودی این فعالیت‌ها را کنترل کند (۹)؛ به‌عنوان مثال، در یک مطالعه نشان داده شد، درمان با بتائین از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی TLR-4/NF-κB برای بازگرداندن آستروگلیوز و التهاب ناشی از فروکتوز، آسیب عصبی هیپوتالاموس را بهبود می‌بخشد. این مطالعه

نشان می‌دهد که بتائین می‌تواند بیان هیستون دی‌استالیز ۳ را مهار نماید و می‌تواند NF- κ B را از طریق اتصال به I κ B α فعال کند (۱۰)؛ درنتیجه، بتائین از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی NF- κ B آثار ضدالتهابی دارد (۱۱)؛ همچنین علاوه بر درمان با داروها و مکمل‌ها، شواهد نشان می‌دهد، ورزش شنا عملکرد ضدالتهابی را افزایش می‌دهد و اثر محافظتی عصبی دارد. در مقایسه با دویدن، شنا می‌تواند سازگاری مرتبط با حفاظت نورونی در بیماری MS را بهبود بخشد و آثار محافظتی عصبی بیشتری ایجاد کند. ورزش در آب یکی از روش‌های جدیدی است که توسط برخی متون برای بیماران MS توصیه می‌شود (۱۲). آب با دمای (۳۰ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد) از سفتی عضلات می‌کاهد و به بیمار اجازه می‌دهد راحت‌تر حرکت کند. از آنجا که نیروهای وارده بر مفاصل و نخاع در آب کاهش می‌یابد، فشار کمتری به بیمار وارد می‌شود و به علت فشار هیدرواستاتیک بر قسمت‌های مختلف بدن، گردش خون بهتر می‌گردد و از افزایش دمای بدن و خستگی جلوگیری می‌کند (۱۳).

تحقیقات مختلف گذشته نشان داده‌اند، بیماری MS به‌طور کامل درمان‌شدنی نیست؛ اما کنترل عوارض آن تا حدود بسیاری دست‌یافتنی است و مانع ناتوان شدن و از کارافتادگی بیمار می‌شود. به این منظور، ورزش اهمیت بسیاری دارد و در تحقیقات گذشته نشان داده‌شده است که از عوارض مختلف بیماری MS جلوگیری می‌کند (۱۴). در میان الگوهای ورزشی گوناگون، ورزش شنا جدا از مزایای بدنی خود، عملکرد شناختی را بهبود می‌دهد و بازتوانی عصبی را پس از وقوع آسیب مغزی آسان‌تر می‌کند (۱۵)؛ همچنین در زمینه تأثیر تمرین ورزشی بر فعالیت‌های آنزیم‌های اکسایشی و ضد اکسایشی اطلاعات ضدونقیضی وجود دارد؛ اما به نظر می‌رسد، ورزش با ایجاد تعادل وضعیت اکسیداسیون و احیا در بهبود عملکرد مغزی نقش دارد، به‌طوری‌که مقاومت علیه فشار اکسایشی را افزایش می‌دهد و بهبود فشار اکسایشی را تسریع می‌کند (۱۴)؛ بنابراین، با توجه به توضیحات داده‌شده، انجام تحقیقی شبیه به تحقیق حاضر ضروری به نظر می‌رسد؛ بر اساس این، با توجه به اهمیت بروز التهاب در بیماری MS و

نقش‌های ذکرشده ضدالتهابی مکمل بتائین و نقش ورزش در کنترل عوارض بیماری‌ها، احتمال آن داده می‌شود که بتائین با اثر بر مسیرهای التهابی و محافظتی سلولی بتواند سبب بهبود اختلالات ناشی از بیماری MS گردد؛ بنابراین، از آنجا که تاکنون آثار ترکیبی ورزش و بتائین بر SOD، VEGF و MDA بررسی نشده است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظتی بتائین همراه با تمرین شنا بر SOD، VEGF و MDA در مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس در موش‌های صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تحقیقات تجربی بود که در زمستان ۱۴۰۱ با کد کمیته اخلاق (EE/1401.2.24.363233/scu.ac.ir) در دانشگاه شهید چمران اهواز تأیید و انجام شد. در تحقیق حاضر، از ۲۸ سر رت نر بالغ ۱۲ هفته‌ای نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده گردید. نمونه‌های تحقیق از خانه حیوانات دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری شدند. رت‌ها در آزمایشگاه جوندگان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به مدت دو هفته، به‌منظور سازگاری با محیط نگهداری گردیدند؛ همچنین همه حیوانات به‌صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. حیوانات به‌صورت گروه‌های چهار سر موش در قفس پلی‌کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد، در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد نگهداری شدند؛ سپس به مدت یک هفته به‌منظور آشنایی با استخر مخصوص جوندگان، گروه‌های تمرینی به مدت ۱۰ دقیقه و ۵ روز در هفته به آشناسازی با استخر پرداختند. این حیوانات پس از آشنایی با نحوه فعالیت در استخر، به ۷ گروه و در هر گروه ۴ سر رت تقسیم شدند که عبارت‌اند از: گروه کنترل سالم، گروه سالم+بتائین، گروه سالم+تمرین، گروه ضایعه، گروه ضایعه+تمرین، گروه ضایعه+بتائین، گروه ضایعه+تمرین+بتائین. آزمودنی‌ها پیش از گروه‌بندی با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن‌کشی گردیدند و سعی شد تا میانگین وزن میان گروه‌های مختلف (۲۵۰-۳۰۰ گرم) تا حد

ممکن به هم نزدیک باشد.

روش القای ام‌اس: پس از تقسیم‌بندی حیوانات در گروه‌های مشخص، برای القای بیماری MS پودر کوپریزون شرکت سیگما با نسبت وزنی ۰/۵ درصد به پودر غذای جوندگان اضافه گردید؛ سپس به‌خوبی مخلوط شد و پس از آن، با اضافه کردن آب خمیر حاصله به پلت غذایی تبدیل گردید و به مدت ۶ هفته در اختیار حیوانات قرار گرفت (۱۶).
روش بررسی القای بیماری: برای بررسی رفتاری القای بیماری از آزمون روتارود استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت تعادلی توسط این دستگاه، ابتدا به هر حیوان دوبار فرصت برای عادت کردن و تطابق با دستگاه داده شد. حیوان روی میله افقی چرخنده که سرعت حرکت آن متغیر است، به قطر ۳ سانتی‌متر با سرعت اولیه ۵ دور در دقیقه قرار گرفت و سپس سرعت چرخش میله طی مدت ۳۰۰ ثانیه (۵ دقیقه) به تدریج تا ۲۵ دور در دقیقه افزایش یافت. ملاک اصلی برای تعادل در همه گروه‌ها سرعت ۲۵ دور در دقیقه بود. زمان حفظ تعادل و باقی ماندن روی میله برای هر حیوان ثبت گردید. مدت‌زمانی را که حیوان بتواند تعادل خود را حفظ و در مقابل حرکت گردونه مقاومت کند، به‌عنوان زمان مقاومت حیوان ثبت شد. حداکثر زمان بررسی‌شده برای هر حیوان در این آزمون ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. این آزمایش سه بار تکرار گردید و فاصله میان تکرارها ۳۰ دقیقه بود و میانگین آن‌ها گرفته شد (۱۷).

برنامه تمرین در آب: برنامه تمرین در آب در استخر مخصوص جوندگان در دمای آب ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. دستورالعمل تمرینی برگرفته از تحقیق کیم و همکاران ۲۰۲۰ با اندکی اصلاح بود که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. موش‌های گروه ورزش شنا به مدت ۳۰ دقیقه، یک‌بار در روز به مدت ۶ هفته شنا کردند (۱۲). برای سازگاری حیوانات، تمرین شنا به این صورت بود که مدت تمرین در هفته اول تا ششم به‌صورتی افزایش می‌یابد که در

آن، زمان فعالیت از ۱۰ دقیقه در روز اول به ۳۰ دقیقه در هفته ششم رسید (جدول شماره ۱).

مکمل بتائین: برای موش‌های تحت درمان با بتائین، بتائین (Betaine SIGMA aldrich) در آب آشامیدنی روزانه (۱ درصد بتائین) در طول ۶ هفته تمرینات تجویز شد (۱۸).
روش بافت‌برداری: ابتدا نمونه‌ها با ترکیب کتامین و زایلازین با دوز ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم بیهوش گردیدند و سپس با خارج کردن مغز از کاسه جمجمه، مخچه از سایر قسمت‌های مغز جدا شد و بلافاصله در ازلت مایع قرار گرفت؛ سپس بعد از منجمد شدن، بافت مخچه خارج شده در فریزر مخصوص در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید؛ همچنین بافت با استفاده از بافر رپا (RIPA) هموژن شد. پس از هموژنایز و سانتریفیوژ، نمونه‌ها به روش الایزا و با دستگاه الایزایدر اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردیدند که شاخص VEGF با استفاده از کیت اندازه‌گیری شرکت استایوفورم ساخت کشور آمریکا با حساسیت ۰۱/۵ ng/L و آنزیم SOD با استفاده از کیت مخصوص اندازه‌گیری آنزیم SOD، شرکت رندوکس ساخت کشور انگلستان با حساسیت ۰۱/۷۰۰ Phosphate buffer pH 7.0 اندازه‌گیری شدند؛ همچنین مالون دی‌آلدئید بر اساس تکنیک اسپکتروفوتتری اندازه‌گیری گردید. در این روش، مالون دی‌آلدئید بر اساس جذب کمپلکس MDA-TBA در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد MDA به‌دست می‌آید (۱۴).

برای محاسبه و تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات خام از نرم‌افزار SPSS vol.22 و برای ترسیم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد؛ همچنین سطح معنی‌داری برای همه روش‌های آماری در سطح $P < 0.05$ بود و دوم، برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده گردید؛ همچنین برای تجزیه و تحلیل آماری از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون‌های تعقیبی LSD استفاده شد.

جدول شماره ۱. برنامه تمرین شای گروه‌های پژوهش

مدت تمرین (دقیقه در روز)	هفته
۱۰	اول

دوم	۱۵
سوم	۲۰
چهارم	۲۵
پنجم	۳۰
ششم	۳۰

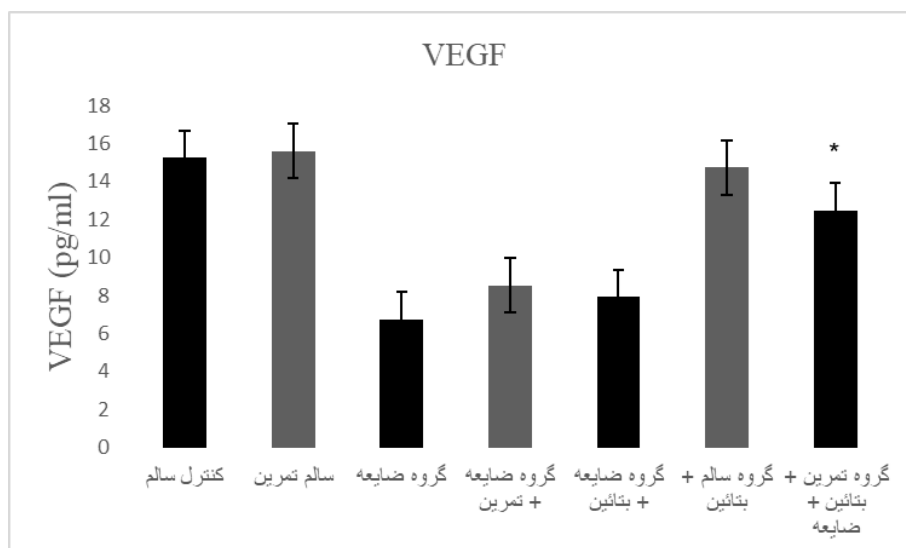
($P \leq 0.001$)؛ اما گروه ضایعه+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، کاهش معنی داری نشان نداد ($P=0.62$)؛ همچنین گروه ضایعه+تمرین در مقایسه با گروه ضایعه، کاهش معنی داری نشان نداد ($P=0.15$). گروه ضایعه+تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه ($P \leq 0.001$)، گروه ضایعه+بتائین ($P \leq 0.001$) و گروه ضایعه+تمرین ($P \leq 0.001$) کاهش معنی داری را در متغیر MDA نشان داد ($P \leq 0.001$).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان داد، در متغیر SOD میان گروه های پژوهش اختلاف معنی داری وجود دارد ($P \leq 0.001$ ، $F=19.025$ ، $df=6$). نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد (نمودار شماره ۳)، گروه ضایعه کاهش معنی داری در متغیر SOD نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد ($P \leq 0.001$)؛ اما گروه ضایعه+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی داری نشان نداد ($P=0.25$)؛ همچنین گروه ضایعه+تمرین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی داری نشان نداد ($P=0.45$). گروه ضایعه+تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه ($P \leq 0.001$)، گروه ضایعه+بتائین ($P \leq 0.001$) و گروه ضایعه+تمرین ($P \leq 0.001$) افزایش معنی داری را در متغیر SOD نشان داد ($P \leq 0.001$).

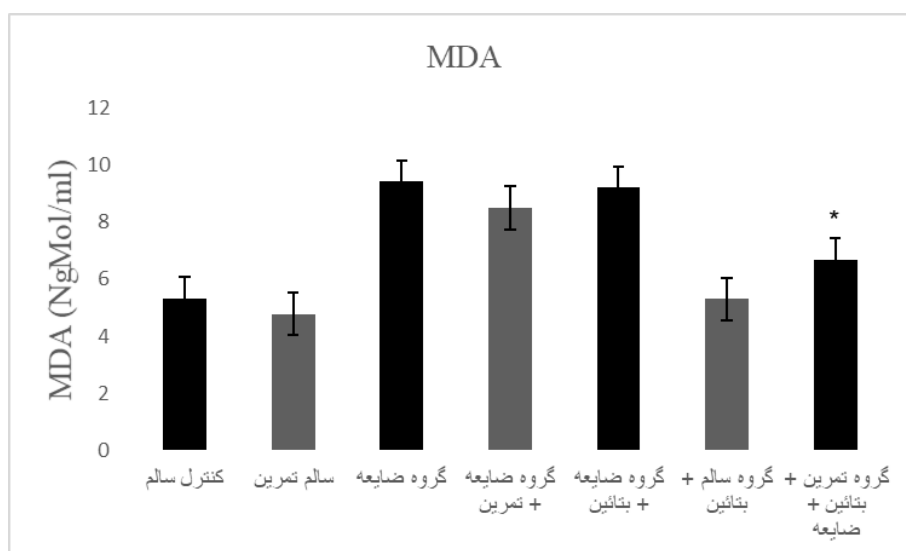
یافته های پژوهش

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد، در متغیر VEGF میان گروه های پژوهش اختلاف معنی داری وجود دارد ($P \leq 0.001$ ، $F=25.553$ ، $df=6$). نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد (نمودار شماره ۱)، در گروه ضایعه کاهش معنی داری در متغیر VEGF نسبت به گروه کنترل سالم دیده می شود ($P \leq 0.001$)؛ اما گروه ضایعه+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی داری نشان نداد ($P=0.18$)؛ همچنین گروه ضایعه+تمرین در مقایسه با گروه ضایعه، افزایش معنی داری نشان نداد ($P=0.22$). گروه ضایعه+تمرین+بتائین در مقایسه با گروه ضایعه ($P \leq 0.001$)، گروه ضایعه+بتائین ($P \leq 0.001$) و گروه ضایعه+تمرین ($P \leq 0.001$) افزایش معنی داری را در متغیر VEGF نشان داد ($P \leq 0.001$).

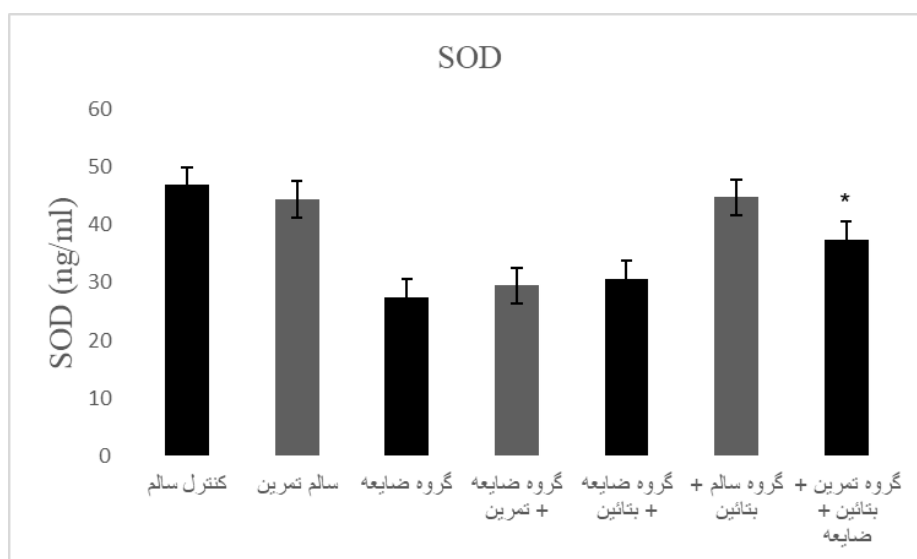
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد، در متغیر MDA میان گروه های پژوهش اختلاف معنی داری وجود دارد ($P \leq 0.001$ ، $F=40.121$ ، $df=6$). نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد (نمودار شماره ۲)، گروه ضایعه افزایش معنی داری در متغیر MDA نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد



نمودار شماره ۱. مقایسه مقادیر VEGF در گروه‌های پژوهش



نمودار شماره ۲. مقایسه مقادیر MDA در گروه‌های پژوهش



نمودار شماره ۳. مقایسه مقادیر SOD در گروه‌های پژوهش

بحث و نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات در آب همراه با مصرف مکمل بتائین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و شاخص‌های فشار اکسایشی در مخچه رت‌های مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بود. به‌طور خلاصه، نتایج این تحقیق نشان داد که بیماری ام‌اس باعث کاهش سطوح VEGF و SOD در گروه‌های مبتلا به بیماری می‌شود که نشان داده شد، تمرین ورزشی همراه با مصرف مکمل بتائین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش این شاخص‌ها می‌گردد؛ همچنین نشان داده شد که بیماری ام‌اس باعث افزایش سطوح MDA در گروه‌های مبتلا به بیماری می‌شود و نیز نشان داده شد، تمرین ورزشی همراه با مصرف مکمل بتائین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش این شاخص می‌گردد.

در میان روش‌های القای بیماری MS در موش با استفاده از سم‌ها، روش کوپریزون یک روش شناخته‌شده است. در این روش، پس از مصرف کوپریزون، آپوپتوز الیگودندروسیتی القا و سپس سلول‌های دستگاه ایمنی ذاتی در مغز فعال می‌شوند. درنهایت، این فعالیت آستروسیت‌ها به دمی‌لینه شدن ماده خاکستری و سفید نقاط مغزی منجر می‌گردد. مزیت مهم روش کوپریزون این است که روش القایی کوپریزون یک روش ساده و تکرارپذیر برای القای بیماری دمی‌لینه‌کننده و بازسازی میلین است؛ زیرا نسبت به سایر روش‌های القایی با سم نیاز به جراحی‌های پیچیده ندارد. تیمار کوپریزون به ایجاد یک مدل دمی‌لینه کامل منجر می‌شود و طی فرایند بازسازی مجدد میلین، این روند تخریبی متوقف می‌گردد، درحالی‌که در روش‌های ویروسی و خودایمنی فرایند تخریب همچنان ادامه می‌یابد. درنهایت، این روش به‌عنوان یک پلتفرم عالی برای انجام غربالگری پربازده و شناسایی ترکیبات جدید با آثار مفید بر نجات الیگودندروسیت‌ها و میلین‌سازی آکسونی شناخته می‌شود (۱۶). در متغیر VEGF نتایج تحقیق حاضر با پژوهش لاید و همکاران (۲۰۱۳) (۱۹)، دانگ و همکاران (۲۰۱۴) (۲۰) و گاستافسون و همکاران (۲۰۱۲) (۲۱)، هاشم ورزی و همکاران (۱۳۹۵) (۲۲) همسو است و همچنین نتایج پژوهش

حاضر با نتایج زاگروفسکا و همکاران (۲۰۱۱) مغایر است. نتایج آنان نشان داد که سطح VEGF در افراد مبتلا به بیماری MS پس از یک دوره تمرین هوازی نسبت به پیش از تمرین تغییری نمی‌یابد (۲۳). احتمالاً ناهمسو بودن نتایج زاگروفسکا پازک به علت زمان سنجش این عامل رشد اندوتلیال است که این پژوهشگران VEGF را پیش، بلافاصله و سه ساعت پس از انجام یک آزمون وامانده‌ساز سنجیدند؛ همچنین از دیگر علل مغایر بودن این نتایج می‌توان به مدت و نوع تمرینات اجرا شده اشاره کرد؛ و نیز نتایج پژوهش حاضر با نتایج یانگ مینگ و همکاران (۲۰۲۰) (۲۴) ناهمسو است. این محققان پژوهشی با عنوان آثار مکمل دوهفته‌ای بتائین بر VEGF، استرس اکسیداتیو و ظرفیت هوازی پس از تمرین استقامتی در مردان مبتلا به MS انجام دادند. نتایج نشان داد که مکمل بتائین تأثیری بر VEGF، استرس اکسیداتیو یا ظرفیت هوازی ندارد. احتمالاً علت ناهمسو بودن نتایج این تحقیق با تحقیق ما تفاوت در نوع آزمودنی‌ها و شرایط آزمایشگاهی تحت کنترل تحقیقات حیوانی در مقایسه با تحقیقات انسانی است. هاشم‌ورزی و همکاران (۱۳۹۵) همسو با تحقیق حاضر، تحقیقی با عنوان اثر تمرین هوازی به همراه مصرف ویتامین D3 بر سطوح VEGF موش‌های مبتلا به بیماری خودایمنی (پارکینسون) انجام دادند (۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی همراه با مصرف ویتامین D3 توانسته است به شکل معناداری، سطوح VEGF در بافت مغز را افزایش دهد. درواقع، فعالیت بدنی منظم به‌عنوان یک راهبرد درمانی برای مبارزه با بیماری زوال نورونی توصیه می‌شود. فعالیت بدنی منظم عصب‌زایی هیپوکامپی را افزایش و فشار اکسایشی را کاهش و عروق‌زایی مغز را افزایش می‌دهد (۲۵). از سویی، فعالیت ورزشی افزایش سرعت جریان خون را به دنبال دارد؛ درنتیجه افزایش در سرعت جریان خون، استرس برشی افزایش می‌یابد و عروق در اثر این افزایش به‌سرعت باز می‌شوند (۲۵). فشارهای برشی در سطح سلول‌های اندوتلیال سبب فعال شدن کانال‌های کلسیم و درنتیجه، هایپرپلاریزاسیون می‌گردد. این امر باعث شروع سیگنال‌های داخل سلولی، افزایش نیتریک‌اکساید و آزاد شدن VEGF

می‌شود (۲۵). در متغیر SOD همسو با تحقیق حاضر، لوشاب و همکاران (۲۰۱۸) (۲۶) در بیماران مبتلا به MS پس از انجام یک دوره ۶ هفته‌ای تمرینات هوازی، در شاخص سوپر اکساید دیسموتاز افزایش معنی‌داری را نشان دادند؛ همچنین نتایج تحقیق حاضر ناهمسو با چنگ و همکاران (۲۰۰۷) (۲۷) و مرادی و همکاران (۱۳۹۸) (۲۸) است. مرادی و همکاران در تحقیق خود نشان دادند، ۶ هفته تمرین هوازی تداومی و تناوبی تأثیر معنی‌داری در افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در رت‌های مبتلا به پارکینسون ندارد. در مرور مطالعات انجام‌شده در زمینه فشار اکسایشی و دفاع ضد اکسایشی باید به چند نکته توجه داشت که شاید اختلاف اصلی میان پژوهش‌های مختلف را توجیه کند: ابتدا دستورالعمل‌های ورزشی در حیوانات به‌طور کلی به دو صورت اختیاری (مانند تمرین چرخ دوار) و اجباری (تمرین نوار گردان و شنای اجباری) انجام می‌پذیرد که این خود ممکن است در روند نتایج مطالعات تأثیرگذار باشد؛ همچنین مدت، شدت و نوع تمرینات بر این شاخص باید مورد توجه قرار گیرد. نتایج تمرین بدنی بر بافت مغز بسیار بحث‌انگیز است، به‌طوری‌که میزان و مقدار تمرینات برای اثربخشی مثبت در مغز نامشخص است (۲۸). نتایج این پژوهش درباره اثر تمرینات ورزشی بر کاهش سطوح مالون دی‌آلدئید با پژوهش‌هایی که دوی و همکاران (۲۰۱۴) (۲۹)، ریکاردو (۲۰۰۶) (۳۰) و مرادی و همکاران (۲۰۲۰) همسو است که روی موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری‌های خودایمنی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای بر افراد مبتلا به MS، دوی و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که تمرینات هوازی و ویتامین E محتوای MDA را در هر دو ناحیه هیپوکامپ و کورتکس مغز موش‌های بیمار را کاهش می‌دهد، هرچند این یافته‌ها با تحقیقات آکیگوز (۲۰۱۶)، کچتی و همکاران (۲۰۱۴) و لیخی و همکاران (۲۰۱۲) درباره تأثیر فعالیت ورزشی بر مالون دی‌آلدئید مغایر است (۳۲-۳۴). علت احتمالی مغایر بودن نتایج تحقیق حاضر با تحقیق آکیگوز و لیخی، در دستورالعمل تمرینی استفاده‌شده است که در تحقیق آکیگوز دستورالعمل تمرینی حاد تا حد و اماندگی و در تحقیق لیخی دستورالعمل

تمرین استقامتی درمانده‌ساز بود. در تحقیق کچتی دستورالعمل تمرینی به مدت ۲ هفته بود که کمتر از تحقیق حاضر است. برخی پژوهش‌ها نیز نشان دادند که افزایش فشار اکسایشی به مغز آسیب می‌رساند و ورزش در شرایط خاص می‌تواند افزایش تخریب اکسایشی را کم کند (۳۲). ورزش به‌عنوان عاملی معرفی شده است که گردش سلول‌های ایمنی را بالا می‌برد و باعث سیگنال‌دهی فیزیولوژیکی و مشارکت در محافظت عصبی و انعطاف‌پذیری دستگاه عصبی می‌شود (۳۵)؛ همچنین بتائین سطح هموسیستین را در هموسیستینوری کاهش می‌دهد، از سطح هموسیستین سرم می‌کاهد و متیونون مغز و اس-آدنوزیل متیونین را افزایش می‌دهد، عملکردهایی که ممکن است پیشرفت بیماری‌های نرونی مانند ام‌اس را به تأخیر بیندازند (۳۶). تمرینات ورزشی نیز می‌توانند با افزایش بیان عوامل رگ‌زایی مانند VEGF و همچنین کاهش بیان عوامل آنژیواستاتیک مانند اندوستاتین، بر روند رگ‌زایی تأثیر بگذارند (۳۷). گزارش شده است که سطح رونویسی VEGF در عضله اسکلتی ضروری‌ترین عامل در تنظیم غلظت سرمی VEGF است، در مراحل مزمن ام‌اس، VEGF نقش محافظت‌کننده عصبی دارد و باعث تکثیر و بقای سلول‌های عصبی می‌شود. سطح VEGF در بیماران مبتلا به ام‌اس و حیوانات مبتلا به انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (EAE) کاهش می‌یابد (۳۸). چندین مطالعه افزایش چشمگیری در محصولات پراکسیداسیون لیپیدی در مغز، پلاسما و مایع مغزی نخاعی در بیماران مبتلا به ام‌اس نشان داده‌اند (۳۹). مشخص شده است که استرس اکسیداتیو که با تولید بیش‌ازحد ROS و کاهش سازوکارهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی مشخص می‌گردد، در پاتوژنز MS نقش دارد (۴۰). اختلال در دستگاه‌های آنتی‌اکسیدانی یا افزایش تولید ROS می‌تواند به پراکسیداسیون لیپوپروتئین در MS کمک کند. محصولات پراکسیداسیون لیپیدی لیپوپروتئین نورو توکسیک هستند که خواص پیش‌التهابی دارند و می‌توانند در دمیالیناسیون و آسیب آکسونی در MS نقش داشته باشند (۴۱). یکی از شاخص‌های بیشتر مطالعه‌شده در آسیب بافتی در ورزش پراکسیداسیون لیپیدی به‌ویژه شاخص

کد اخلاق

این پژوهش با کد اخلاق EE/1401.2.24.363233/scu.ac.ir از کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

حمایت مالی

معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی، روش شناسی، اعتبار سنجی، تحقیق، منابع: مسعود مرادی

تحلیل رسمی، نگارش - بررسی و ویرایش، تصویر سازی، نظارت: مسعود مرادی، عبدالحمید حبیبی

نگارش - تهیه پیش نویس اصلی: مسعود مرادی، عبدالحمید حبیبی، محمد رضا تابنده، سعید شاکریان

گردآوری داده ها، مدیریت پروژه: مسعود مرادی.

همه نویسندگان به طور مساوی در مفهوم سازی مقاله و نگارش پیش نویس های اصلی و بعدی مشارکت داشته اند.

مالون دی آلدنید به شمار می آید و نیز موجب ارتباطات اکسیداتیو با پروتئین ها و اسید نوکلئیک می شود (۴۲). مطالعات بسیاری نشان داده اند که فعالیت ورزشی استرس اکسیداتیو را تحریک می کند و باعث ایجاد سازگاری هایی در دستگاه دفاع آنتی اکسیدانی می گردد. تمرین ورزشی بسته به بار تمرینی، مشخصات و سطح پایه تمرین می تواند آثار مثبت یا منفی بر استرس اکسیداتیو داشته باشد (۴۳). در حقیقت، فعالیت های ورزشی شدید ممکن است موجب بروز پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش فشار اکسیداتیو شود؛ اما در مقابل، فعالیت های ورزشی منظم و با شدت پایین تا متوسط می تواند باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش فشار اکسیداتیو گردد (۴۴). علاوه بر این، شواهد موجود نشان می دهد که کاربرد ورزش شنا بدون در نظر گرفتن مدت و شدت تمرینات، مزایای بی شماری برای همه بیماران به ویژه بیماران MS دارد. یافته های به دست آمده از کار روی حیوانات نشان می دهد که شنای منظم تأثیرات سودمندی بر سلامت و عملکرد نرونی و احتمالاً محافظت از نورون ها (۴۵) دارد. اگرچه سازوکارهای این تغییرات هنوز ناشناخته است؛ گزارش شده است که ورزش شنا می تواند آسیب پذیری نرونی را تعدیل کند و نیز باعث بهبود بیماری های خود ایمنی مانند بیماری MS و پارکینسون گردد (۴۵)؛ بنابراین، اجرای برنامه تمرینات شنا که در این مطالعه به کار گرفته شد، می تواند به عنوان یک راهبرد برای بهبود و مقابله با آثار تخریبی فشار اکسایشی و بهبود عملکرد نرونی در مغز بیماران مبتلا به MS پیشنهاد و به کار گرفته شود.

سپاس گذاری

بدین وسیله از همه همکاری های دانشکده تربیت بدنی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

References

1. Mehta BK. New hypotheses on sunlight and the geographic variability of multiple sclerosis prevalence. *J Neurol Sci.* 2010; 292: 5-10. doi: 10.1016/j.jns.2010.02.004.
2. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26:27-40. doi: 10.1111/ene.13819.
3. Calabrese M, Pitteri M. Cognition and fatigue in multiple sclerosis. In: Deluca, J, Sandroff, BM (eds) *Cognition and Behavior in Multiple Sclerosis.* Washington, DC: American Psychological Association, 2018, pp. 127-48.
4. Iacobaeus E, Amoudruz P, Strom M, Khademi M, Brundin L, Hillert J, et al. The expression of VEGF-A is down regulated in peripheral blood mononuclear cells of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *PLoS One.* 2011;6: e19138. doi: 10.1371/journal.pone.0019138.
5. Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2003;18:2803-12. doi: 10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x.
6. Schulz KH, Gold SM, Witte J, Bartsch K, Lang UE, Hellweg R, et al. Impact of aerobic training on immune-endocrine parameters, neurotrophic factors, quality of life and coordinative function in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2004;225:11-8. doi: 10.1016/j.jns.2004.06.009.
7. Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pierzchala K, Polaniak R, Labuz-Roszak B. Antioxidative enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63: 683-690.
8. Heesen C, Gold SM, Hartmann S, Mladek M, Reer R, Braumann KM, et al. Endocrine and cytokine responses to standardized physical stress in multiple sclerosis. *Brain Behav Immun.* 2003;17:473-81. doi: 10.1016/s0889-1591(03)00077-1.
9. Yang MT, Lee XX, Huang BH, Chien LH, Wang CC, Chan KH. Effects of Two-Week Betaine Supplementation on Apoptosis, Oxidative Stress, and Aerobic Capacity after Exhaustive Endurance Exercise. *Antioxidants (Basel).* 2020;9:1189. doi: 10.3390/antiox9121189.
10. Lee EK, Jang EJ, Jung KJ, Kim DH, Yu BP, Chung HY. Betaine attenuates lysophosphatidylcholine-mediated adhesion molecules in aged rat aorta: modulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Exp Gerontol.* 2013; 48:517. doi:10.1016/j.exger.2013.02.024.
11. Yan J, Greer JM. NF-kappa B, a potential therapeutic target for the treatment of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7:536-57. doi: 10.2174/187152708787122941.
12. Kim JY, Yi ES, Lee H, et al. Swimming Exercise Ameliorates Symptoms of MOG-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Inflammation and Demyelination in Rats. *Int Neurol J.* 2020;24(Suppl 1):S39-S47. doi:10.5213/inj.2040156.078.
13. Xie Y, Li Z, Wang Y, Xue X, Ma W, Zhang Y, et al. Effects of moderate- versus high-intensity swimming training on inflammatory and CD4+T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunol.* 2019;328:60-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.12.005.
14. Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, et al. Effects of Vitamin E on Oxidative Stress and Membrane Fluidity in Brain of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Clin Chim Acta.* 2014; 340: 107-15. doi: 10.1016/j.cccn.2003.10.003.
15. Juri MC, Rodriguez O, Obese JA. The Pathophysiological Basis of Sensory Disturbances in Parkinson's Disease. *J Neurol Sci.* 2010; 289: 60-5. doi: 10.1016/j.jns.2009.08.018.
16. Zimmermann J, Emrich M, Krauthausen M, Saxe S, Nitsch L, Heneka MT, et al. IL-17A Promotes Granulocyte Infiltration, Myelin Loss, Microglia Activation, and Behavioral Deficits During Cuprizone-Induced Demyelination. *Mol Neurobiol.* 2017;55 :946-57. doi: 10.1007/s12035-016- 0368-3.
17. Razavinasab M, Shamsizadeh A, Shabani M, Nazeri M, Allahtavakoli M, Asadi-Shekaari M, et al. Pharmacological blockade of TRPV1 receptors modulates the effects of 6-OHDA on motor and cognitive functions in a rat model of Parkinson's disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27:632-40. doi: 10.1111/fcp.12015.
18. Singhal NK, Sternbach S, Fleming S, Alkhayer K, Shelestak J, Popescu D, et al. Betaine restores epigenetic control and supports neuronal mitochondria in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Epigenetics.* 2020;15:871-86. doi: 10.1080/15592294.2020.1735075.
19. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic Growth Factor Expression In Rat Skeletal Muscle In Response To Exercise Training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 284: H1668-78. doi: 10.1152/ajpheart.00743.2002.
20. Ding YH, Luan XD, Li J, Rafols JA, Guthinkonda M, Diaz FG, et al. Exercise-Induced Overexpression Of Angiogenic Factors And Reduction Of Ischemia/Reperfusion Injury In Stroke. *Curr*

- Neurovasc Res. 2014; 1: 411-20. doi: 10.2174/1567202043361875.
21. Gustafsson T, Knutsson A, Puntschart A, Kaijser L, Nordqvist SA-C, Sundberg C, et al. Increased expression of vascular endothelial. Pflugers Arch. 2012; 444:752-9. doi: 10.1007/s00424-002-0845-6.
 22. Hashemvarzi SA, Heidarian Poor A. Preconditioning Effect of Aerobic Exercise with D3 Vitamin Consumption on VEGF levels in the 6-OHDA Lesioned Parkinson's Disease Rat Model. Sport Physiol. 2016; 8: 129-42. doi: 10.22089/spj.2016.774.
 23. Czarkowska-Paczek B, Zendzian- Piotrowska M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The Influence Of Physical Exercise On The Generation Of TGF-B1, PDGF-AA, And VEGF-A In Adipose Tissue. Eur j J Appl Physiol. 2011; 111: 875-81. doi: 10.1007/s00421-010-1693-2.
 24. Yang MT, Lee XX, Huang BH, Chien LH, Wang CC, Chan KH. Effects of Two-Week Betaine Supplementation on Apoptosis, Oxidative Stress, and Aerobic Capacity after Exhaustive Endurance Exercise. Antioxidants (Basel). 2020;9:1189. doi: 10.3390/antiox9121189.
 25. Ebrahimi L, Haghighi S, Hosseini Kakhki A, Nikkhah A. the effect of eight weeks of combined exercise (aerobic-resistance) on the activity of antioxidant enzymes in women with multiple sclerosis with a regular sexual cycle. Basic Clin Res J. 2018; 26. (persian)
 26. Chang CK, Huang HY, Tseng HF, Hsuuw YD, Tso TK. Interaction Of Vitamine And Exercise Training On Oxidative Stress And Antioxidant Enzyme Activities In Rat Skeletal Muscles. J Nutr Biochem. 2007; 18: 39-45. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.02.007.
 27. Moradi S, Habibi A, Tabande M, shakerian S. Comparing the effect of 6 weeks of continuous and interval aerobic training on vascular endothelial growth factor and superoxide dismutase enzyme in hippocampus of male rats of Parkinson's model. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2019; 27: 1302-12. doi: 10.18502/ssu.v27i3.1185.
 28. Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. Neurobiol Aging. 2014; 25: 501-8. doi: 10.1016/S0197-4580(03)00112-X.
 29. Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biol Int. 2006;30:848-53. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.03.011.
 30. Moradi S, Habibi AH, Shakerian S, Tabande MR. Comparison of the Effect of Continuous and Interval Aerobic Exercises on the Levels of Malondialdehyde, Dopamine and Glutathione Peroxidase in the Hippocampus of Rats with Pseudoparkinsonism. Jundishapur Sci Med J. 2020; 19:187-201.
 31. Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, Kayatekin B. MAcute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus,prefrontal cortex and striatum. Neurosci Lett. 2006; 406: 148-51. doi: 10.1016/j.neulet.2006.07.034.
 32. Lekhi C, Gupta PH, Singh B. Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. Br J Sports Med. 2007;41: 691-3. doi: 10.1136/bjism.2007.037663.
 33. Radak Z, Told A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. Neurochem Int. 2006;49:387-92. doi: 10.1016/j.neuint.2006.02.004.
 34. Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, et al. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's diseases model of rats. Brain Res. 2010;1310:200-7. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.075.
 35. Radovanovic D, Jakovljevic V, Cvetkovic T, Ignjatovic A, Veselinovic N, Dondur S. Effects of different exercise program on blood markers of oxidative stress in young women. Fiziologia. 2008; 18: 16-20.
 36. Knopman D and Patterson M: An open-label, 24-week pilot study of the methyl donor betaine in Alzheimer disease patients. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2001;15:162-5.
 37. Schulz KH, Gold SM, Witte J, Bartsch K, Lang UE, Hellweg R, et al. Impact of aerobic training on immune-endocrine parameters, neurotrophic factors, quality of life and coordinative function in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2004;225:11-8. doi: 10.1016/j.jns.2004.06.009.
 38. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. Eur J Neurosci. 2003;18:2803-12. doi: 10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x.
 39. Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pierzchala K. Antioxidative enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients. J Physiol Pharmacol. 2012;63:683-90.
 40. Briken S, Rosenkranz SC, Keminer O, Patra S, Ketels G, Heesen C, et al. Effects of exercise on irisin, BDNF and IL-6 serum levels in patients with progressive multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2016; 299: 53-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.08.007.

41. zkul C, Guclu-Gunduz A, Irkeç C, Fidan I, Aydin Y, Ozkan T, et al. Effect of combined exercise training on serum brain-derived neurotrophic factor, suppressors of cytokine signaling 1 and 3 in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2018; 316:121-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.01.002.
42. Ghonimi NAM, Elsharkawi KA, Khyal DSM, Abdelghani AA. Serum malondialdehyde as a lipid peroxidation marker in multiple sclerosis patients and its relation to disease characteristics. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;51:102941. doi: 10.1016/j.msard.2021.102941.
43. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T, et al. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochem Int*. 2013;62:988-97. doi: 10.1016/j.neuint.2013.02.025.
44. Rohrig M. Physical Therapy in Multiple Sclerosis. *Clin Bull Natl Mult Scler Soc*. 2020; 1-16.