

## تأثیر پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید بر میزان کلوتو و $TNF-\alpha$ موش‌های مبتلا به بیماری ام اس

فتانه فرهمند<sup>۱</sup>، مریم نورشاهی<sup>۲</sup>، مریم سلیمانی<sup>۳</sup>، حمید رجبی<sup>۴</sup>، کوین پاور<sup>۵</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** فعالیت ورزشی نقش مهمی در افزایش بیومارکهای میلین ساز دارد. همچنین، علائم پاتولوژیک را در موش‌های مبتلا به ام اس در مدل آنفالومیلیت خود ایمنی (EAE) بهبود می‌بخشد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر ۶ هفته پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر میزان کلوتو و پروتئین پروتئولیبید (PLP) و میزان پیشرفت بیماری در موش‌های مبتلا به بیماری ام اس بود. **مواد و روشها:** حیوانات پس از آشناسازی با آزمایشگاه به دو گروه تمرین (EX=30) و کنترل (Con=20) تقسیم شدند. پس از ۴ هفته، گروه تمرین به سه گروه و کنترل به دو گروه تقسیم و EAE به نیمی از حیوانات در گروه کنترل و دو تمرین القا شد. در گروه EX-EAE1 بعد از ۴ هفته تمرین، EAE القا و پروتکل تمرین تا هفته ششم ادامه داشت. در گروه EX-EAE2 بعد از ۴ هفته تمرین، EAE القا و تمرین متوقف شد. گروه EX ۶ هفته تمرین تناوبی را اجرا کردند. برای تحلیل‌های آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد.

**یافته‌ها:** میزان کلوتو و PLP در گروه EX-EAE1 در مقایسه با EAE و EAE-EX2 ( $P \leq 0.0001$ ) و همچنین در گروه EX در مقایسه با گروه کنترل ( $P \leq 0.01$ ,  $P \leq 0.001$ ). افزایش یافت. همچنین، دمیلینه شدن در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE کاهش یافت ( $P \leq 0.007$ ). در هر دو گروه ورزش میزان  $TNF-\alpha$  نسبت به گروه EAE کاهش داشت ( $P \leq 0.0001$ ). **نتیجه‌گیری:** نتایج تحقیق حاضر نشان داد پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید میزان کلوتو و PLP را افزایش و پیشرفت بیماری را در مدل (EAE) کاهش داد.

**واژه‌های کلیدی:** ام اس، پروتئولیبید پروتئین، تمرین تناوبی شدید، مچخه

۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی و تندرستی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲ دانشیار گروه علوم زیستی در ورزش، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، نویسنده مسئول: m-nourshahi@sbu.ac.ir

۳ استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

۴ استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی خوارزمی، کرج، ایران

۵ دانشیار دانشگاه موریل، سنت جان، نیوفاندلند، کانادا

امروزه در تحقیقات بسیاری نشان داده شده است که تمرینات ورزشی منجر به سلامت و بهبود عملکرد مغز می‌شود؛ همچنین ممکن است مسیرهای عصبی و نورولوژیکی را در مغز افزایش دهند. حفظ سلامت مغز برای پیشگیری از بسیاری از بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی امری ضروری به نظر می‌رسد (۱).

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک اختلال عصبی مزمن و بیماری التهابی-خودایمنی است که در آن لیگوندروسیت‌ها و ماده سفید غلاف میلین هدف حمله لنفوسیت‌های T در سیستم عصبی مرکزی قرار می‌گیرد. غلاف میلین در انتقال تحریکات در سیستم اعصاب مرکزی نقش مهمی دارد که صدمه به آن منجر به بلاک شدن انتقال پیام‌های عصبی و آسیب می‌شود. در این بیماری افزایش در میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی منجر به آسیب‌های عصبی می‌شود (۲). با این حال، به منظور درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی درگیر در این مراحل حاد این بیماری، از مدل تجربی آنفالومیلیت خودایمنی EAE استفاده می‌کنند (۳). دمیلینه شدن یک نشانگر مهم در آسیب شناسی بیماری ام اس است که با تخریب پروتئین‌های اصلی میلین مانند پروتئین پروتولیبید (PLP) و پروتئین پایه میلین (MBP) همراه است (۴). مطالعات قبلی نقش پروتئین کلوتو را به عنوان یک تنظیم کننده ریمیلیناسیون، هدف درمانی برای ترمیم میلین در ام اس و همچنین کمک به بلوغ لیگوندروسیت‌ها به عنوان سلول‌های اصلی میلین ساز در دستگاه عصبی مرکزی نشان داده اند (۴، ۵). اگرچه کلوتو به طور عمده در کلیه بیان می‌شود با این وجود عملکردهای عصبی کلوتو نیز بسیار مهم‌اند. مطالعات نشان داده‌اند بیان کلوتو در دو ناحیه متفاوت از مغز به نام سلول‌های اپنیدیمال شبکه کروئید و نرون‌های پورکنز مخچه در بالاترین سطح است. به نظر می‌رسد، کلوتو در سلول‌های لیگوندروسیت به عنوان سلول‌های اصلی میلین ساز از طریق اتصال به گیرنده تیروزین کینازی خود که احتمالاً در لیگوندروسیت‌ها قرار دارد، منجر به فسفوریله شدن مسیرهای AKT و ERK1/2 شده و در نهایت با افزایش در بیان پروتئین‌های MBP و PLP به عنوان پروتئین‌های میلین ساز همراه خواهد بود (۴). PLP یک پروتئین مهم میلین است که در پایداری ساختار و عملکرد میلین نقش اساسی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که سطوح PLP در بیماری ام اس کاهش می‌یابد و تصور می‌شود، کاهش آن یک مکانیسم اصلی برای پیشرفت بیماری است (۶).

در ارتباط با نقش پیش التهابی کلوتو، مطالعات نشان داده‌اند کلوتو منجر به مهار بیان  $TNF\alpha$  و کاهش در فعالیت NF-KB به عنوان فاکتورهای پیش التهابی در بیماری ام اس می‌شود (۷).  $TNF-\alpha$  از سلول‌های Th17 ترشح شده و باعث آسیب به غلاف میلین در بیماران ام اس می‌شود (۸) بنابراین، به نظر می‌رسد یکی از مهمترین نقش‌های فیزیولوژیکی برای کلوتو، کنترل مهار آسیب میلین از طریق بلوغ لیگوندروسیت‌ها، افزایش غلظت MBP و PLP و همزمان سرکوب سیتوکین‌های پیش التهابی است. با این حال، مکانیسم‌هایی که از طریق آن‌ها کلوتو، باعث افزایش میلین می‌شود هنوز نامشخص است.

مطالعات همواره به دنبال راهکارهایی برای افزایش کلوتو بوده‌اند. نشان داده شده کمپلکس‌های پروتئین در محیط آزمایشگاهی، بیان کلوتو را در داخل بدن افزایش می‌دهند (۹، ۱۰). در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر افزایش کلوتو مطالعات افزایش سطوح کلوتو را در هردو مدل‌های انسانی و حیوانی پس از فعالیت ورزشی هوازی نشان داده‌اند که به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی از طریق افزایش در فعالیت مسیر AMPK و  $PGC1-\alpha$  منجر به افزایش کلوتو می‌شود (۱۱، ۱۲). از آنجایی که هر دو مسیر در تمرینات تناوبی نسبت به تمرینات تداومی بیشتر فعال می‌شوند

توجه به تمرینات تناوبی شدید در افزایش کلوتو مهم به نظر می‌رسد. از طرفی کاهش غلظت کلوتو در مابغ مغزی نخاعی بیماران ام اس (۱۳) و همچنین در مغز موش‌های مبتلا به ام اس در مدل EAE گزارش شده است (۱۴). همان‌طور که مطرح شد، ام اس به عنوان بیماری سیستم اعصاب مرکزی عواقب شدیدی در این بیماران دارد، از طرفی به دلیل اثرات این بیماری بر شیوه زندگی افراد و عدم یک روش درمانی قطعی، مطالعات همواره به دنبال راهکارهایی برای بهبود کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به ام اس بودند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که انجام برنامه تمرینی منظم، میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی در این بیماران کاهش و کیفیت زندگی بیماران را بهبود می‌دهد (۱۵، ۱۶).

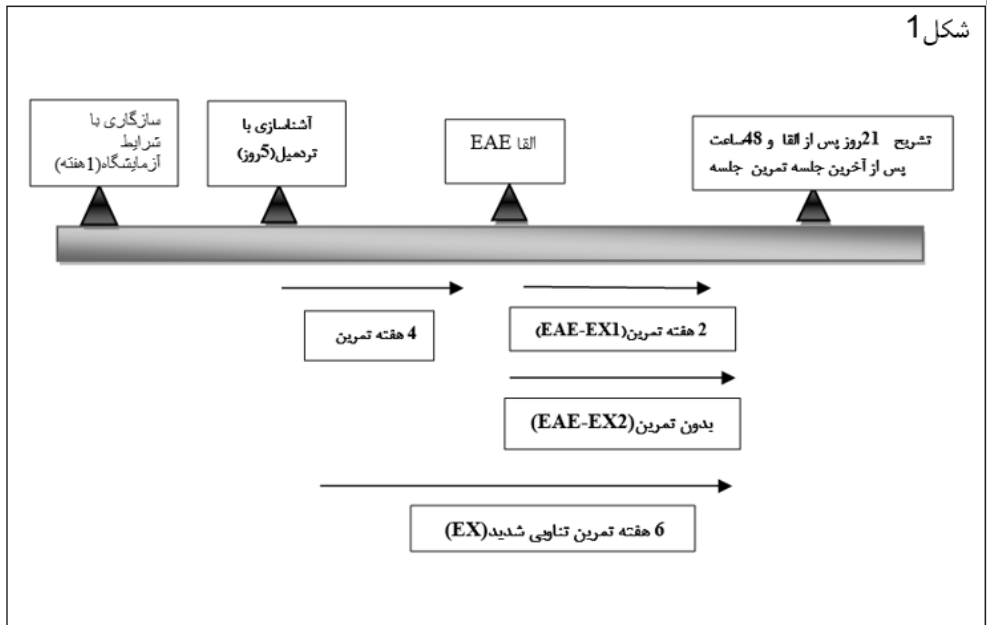
پیش آماده سازی به عنوان روش مقاوم سازی و ایجاد سازگاری در فرد به منظور کاهش آسیب در شرایط استرس در نظر گرفته می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که پیش آماده سازی می‌تواند در مغز و سایر بافت‌های دیگر اتفاق بیفتد. مطالعات روی حیوانات نشان داده است مغز می‌تواند با روش پیش آماده سازی در برابر برخی بیماری‌های عصبی مقاوم شود. به عنوان مثال، در تحقیقی که توسط برناردز و همکاران ۲۰۱۳ و ۲۰۱۶ انجام شد نشان دادند که ۶ هفته تمرین شنا در موش‌ها قبل از القا بیماری ام اس منجر به کاهش علائم بیماری از مرحله شروع تا اوج بیماری، کاهش  $TNF-\alpha$ ، افزایش در BDNF و افزایش در PLP و MBP به عنوان پروتئین‌های درگیر در میلین سازی شده است (۲، ۱۷).

همان‌طور که مطرح شد، کلوتو به عنوان فاکتور موثر در میلین سازی در بیماران مبتلا به ام اس شناخته شده است و تحقیقات از آن به عنوان یک داروی درمان این بیماری یاد می‌کنند. از طرفی مطالعات پاتولوژی و MRI، اختلالات مخچه در بیماران مبتلا به ام اس را نشان داده‌اند. به دلیل آنکه مخچه نقش بسیار مهمی در عملکرد حرکتی، هماهنگی و شناختی دارد آسیب مخچه منجر به بروز علائمی مانند لرزش عضلانی، عدم هماهنگی و اشکال در تکلم می‌شود که این علائم معمولاً به دلیل دمیئیناسیون مخچه و اعصاب آوران و وایران آن است پس به نظر می‌رسد اهمیت بحث میلین سازی در بافت مخچه در این بیماران حائز اهمیت است. همچنین از آنجایی که به نظر می‌رسد کلوتو تحت تاثیر فعالیت ورزشی قرار دارد، نقش ورزش به عنوان عامل پیشگیرانه در این زمینه بسیار مهم است. بنابراین این سوال مطرح است که آیا تمرین ورزشی، یک رویکرد درمانی مؤثر در کاهش تخریب میلین و عوارض بالینی و پاتولوژیک مدل EAE و احتمالاً بیماری ام اس است؟

### روش پژوهش

در این پژوهش ۵۰ سر موش ماده ۶ هفته‌ای C57BL/6 با میانگین وزنی  $15 \pm 2$  گرم از انستیتو رازی خریداری و در محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 1/4$  درجه و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای مخصوص موش دسترسی آزاد داشتند. تمامی مراحل نگهداری و تشریح موش‌ها بر اساس کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. حیوانات پس از آشناسازی با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی به دو گروه تمرین (EX, n=30) و گروه کنترل (Con, n=20) تقسیم شدند. پس از ۴ هفته، گروه EX به سه گروه و کنترل به دو گروه تقسیم و EAE به نیمی از حیوانات در گروه کنترل و دو گروه حیوانات EX القا شد. در گروه EX-EAE1 بعد از ۴ هفته تمرین EAE القا و پروتکل تمرین تا هفته ششم ادامه داشت و در گروه EX-EAE2 بعد از ۴ هفته تمرین EAE القا و تمرین متوقف شد.

روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه تا ۲۱ روز پس از القا مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در نهایت گروه‌های تمرینی به شرح زیر بودند:  
گروه تمرین، گروه تمرین -ام اس ۱/۲ (EX-EAE)، گروه کنترل بیمار (EAE)، گروه کنترل سالم (Cont).



شکل ۱. طرح شماتیک پروتکل پژوهش

### پروتکل تمرین

در ابتدا در مرحله آشناسازی موش‌ها دوبار در روز و به مدت ۵ روز و هر روز ۱۰ دقیقه با شیب صفر و سرعت ۸ متر بر دقیقه روی تردمیل راه رفتند. بعد از پایان دوره آشناسازی، موش‌ها آزمون فزاینده پلکانی را اجرا کردند که این کار به منظور بدست آوردن حداکثر سرعت موش‌ها در نظر گرفته شد. ابتدا به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۶ متر بر دقیقه خواهند دوید و هر ۳ دقیقه یکبار ۳ متر بر دقیقه به سرعت تردمیل اضافه می‌شود تا زمانی که قادر به حفظ این شدت نباشند. آخرین تلاش هر موش به عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته خواهد شد. در نهایت پروتکل تمرینی به مدت ۶ هفته ۵ جلسه در هفته اجرا شد. در ابتدا به مدت ۵ دقیقه با شدت ۴۰-۵۰ درصد سرعت بیشینه برای گرم کردن و پس از آن با شدت ۴۰-۵۰ درصد حداکثر سرعت برای سردکردن روی نوار گردان دویدند (۱۸، ۱۹) (جدول ۱).

## جدول ۱: پروتکل تمرین تناوبی شدید

روز	سرعت ریکاوری	حداکثر سرعت دویدن	زمان دقیقه	هفته	HIIT
۱-۵	۹ متر بر دقیقه	۲۲ متر بر دقیقه	۱۶	۱	۲ اینتروال ۲ دقیقه با ۸۰ درصد سرعت پیشینه ۴۰ درصد سرعت پیشینه (استراحت)
۱-۵	۱۰ متر بر دقیقه	۲۴ متر بر دقیقه	۲۴	۲	۴ اینتروال ۲ دقیقه با ۹۰ درصد سرعت پیشینه ۴۰ درصد سرعت پیشینه (استراحت)
۱-۵	۱۱ متر بر دقیقه	۲۶ متر بر دقیقه	۳۲	۳	۶ اینتروال ۲ دقیقه با ۱۰۰ درصد سرعت پیشینه ۴۰ درصد سرعت پیشینه (استراحت)
۱-۵	۹ متر بر دقیقه	۲۹ متر بر دقیقه	۳۸	۴-۶	۸ اینتروال ۲ دقیقه با ۱۱۰ درصد سرعت پیشینه ۳۰ درصد سرعت پیشینه (استراحت)

برای القا EAE، از کیت EK-2110 MOG 35-55/CFA Emulsion PTX (Hook) با توجه به دستور العمل استفاده از این کیت- استفاده شد. در ابتدا ۰/۱ میلی گرم از MOG 35-55/CFA به صورت تزریق زیرجلدی در دو طرف ناحیه فلانک موش‌ها انجام شد. سپس ۲۴ ساعت پس از اولین تزریق، سم پرتوسیز توکسین (۱/۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن هر موش) به صورت درون صفاقی تزریق شد. روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه تا ۲۱ روز پس از القا مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به بیماری)، یک (اختلال در حرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (اختلال در راه رفتن)، چهار (فلج یک پا)، پنج (فلج هر دو پا)، شش (فلج کامل دست و پا) و هفت (مرگ) درجه بندی شد (۲).

## تهیه مقاطع بافتی جهت رنگ آمیزی (رنگ آمیزی Luxal Fast Blue)

پس از پرفیوژن موش‌ها با پارافمالدئید ۴٪ در پایان هفته ششم، جهت تثبیت فیکساسیون نمونه‌های بافت مخچه مدت ۴۸ ساعت در فرمالین قرار داده شد و سپس برش‌های ۵ میکرونی تهیه شد. جهت بررسی میزان دمیلیناسیون بافت مخچه، نمونه‌ها بوسیله لوکسال فاست بلو رنگ آمیزی شدند. برش‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و جهت سنجش دمیلیناسیون از قطعات بافتی عکس تهیه نمود و با استفاده از نرم افزار Infinity میزان دمیلیناسیون نسبت به کل ماده سفید گزارش شد.

## وسترن بلات

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و ۲۱ روز پس از القا حیوانات با ترکیبی از کتامین و زایلوزین بیهوش و بافت مخچه جهت اندازه‌گیری پروتئین‌های مربوطه خارج شد. پس از آماده شدن نمونه‌ها، پروتئین‌های موجود در بافت

مخچه، توسط SDS-PAGE جداسازی شد و به غشا انتقال داده شدند. غشا با آنتی بادی اختصاصی (Cat NO. sc-22220, Santa Cruz, USA) و PLP (Cat NO. sc-58571, Santa Cruz, USA) ، کلوتو (Cat NO. sc-130349, Santa Cruz, USA) TNF- $\alpha$  مجاورت داده شد و پس از مجاورت غشا با آنتی بادی‌های ثانویه (Cat NO. sc-516102 and sc-2020, Santa Cruz, USA) نشاندار شد. پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل در شدت جریان ۵/۰ آمپر به مدت ۹۰ دقیقه به کاغذ نیتروسولوز، به صورت پیوسته و مرطوب انتقال داده شد. در نهایت، غشا در محلول آنتی بادی ثانویه در بافر به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد و دو بار با TBST و یک بار با PBS شست و شو انجام گرفت. غشا در مقدار کافی محلول سوبسترای TMB قرار داده شد تا زمانی که باندها ظاهر شد. واکنش با اضافه کردن آب مقطر متوقف شد و پس از ظاهر شدن باندها، با استفاده از نرم افزار Image J ارزیابی انجام شد.

### روش بررسی بافتی

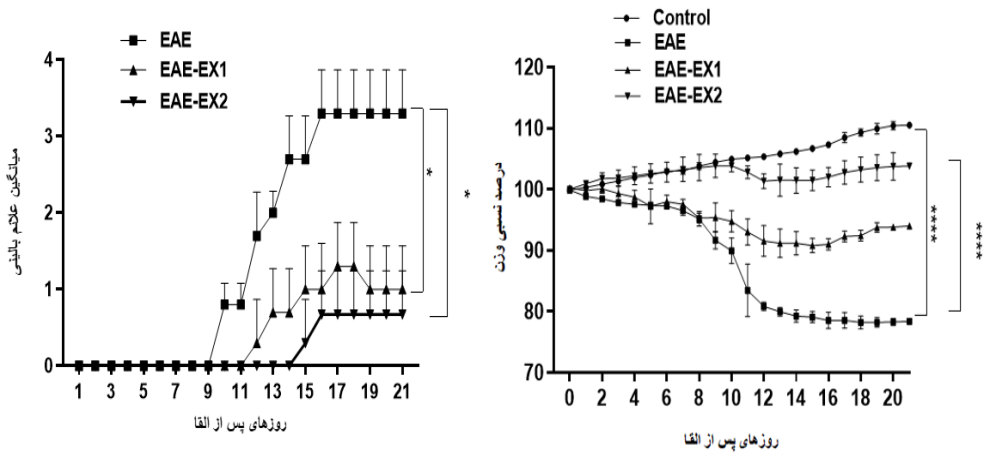
تمامی بررسی‌های مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد. درصد دمیلینه شدن در مقطع مخچه به وسیله نرم افزار Infinity ورژن ۳/۴ با فواصل ۲۰۰ میکرون وضخامت ۵ میکرون محاسبه شد.

### روش تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری Prism با VER=8 انجام شد. طبیعی بودن داده‌ها به وسیله کولموگروف-اسمیرنوف مشخص شد. برای بررسی اختلاف معناداری سطوح کلوتو، TNF $\alpha$  PLP و میزان دمیلینه شدن در گروه‌های تحقیق دمیلینه شدن از آزمون One way ANOVA با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. به منظور مقایسه علائم بالینی بین گروه‌ها از آمار ناپارامتریک کروسکال وایس استفاده شد. سطوح معناداری  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

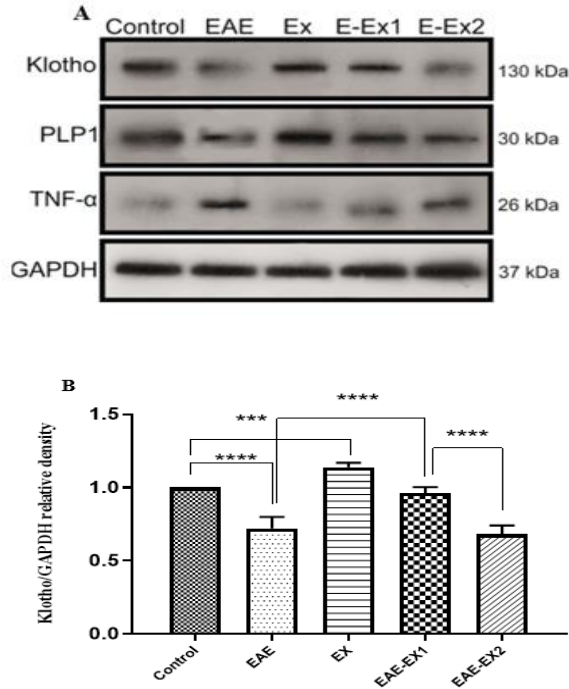
به منظور ارزیابی اثرات ۶ هفته پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید بر علائم کلینیکی بیماری، حیوانات هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. تمرین تناوبی ۴ شدید هفته قبل از القا آغاز شد و تا ۱۴ روز پس القا ادامه یافت. ۱۰ روز پس از القا در گروه EAE اولین علامت بیماری یعنی فلج دم مشاهده شد و تا روز ۱۶ افزایش داشت. در حالیکه در گروه EAE-EX2 شروع علائم در روز ۱۲ پس از القا دیده شد و در روز ۱۷ به اوج خود رسید (اسکور ۲) و سپس در روز ۱۸ از شدت علائم بیماری کاسته شد (نمره بالینی ۱). (شکل ۲-۱). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حیوانات در گروه EAE نسبت به گروه کنترل شدت علائم بیشتری را به نمایش گذاشتند ( $P \leq 0.001$ ). میانگین علائم بالینی در گروه‌های EAE-EX نسبت به گروه EAE به طور معناداری کمتر بود (شکل ۴-۱؛  $P = 0.019$ ). در ارتباط با تغییرات وزن پس از EAE، نشان داد تغییرات وزن در گروه EAE در مقایسه با هر دو گروه کنترل و EAE-EX به طور معناداری کمتر بود ( $p \leq 0.001$ ) (شکل ۲-۲).



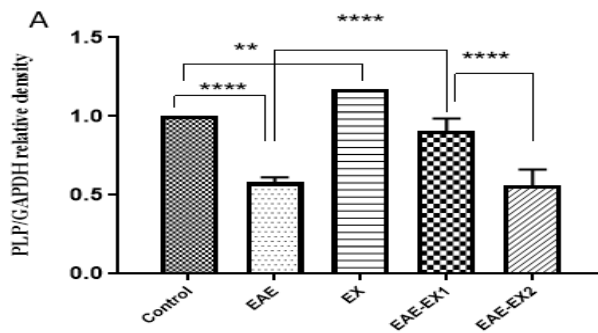
شکل ۲: ارزیابی علائم بالینی پس از القا در گروه‌های تحقیق (A). علائم بالینی روزانه به مدت ۲۱ روز پس از القاء EAE مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت کلینیکی روز به روز بیان شده است. میانگین علائم بالینی در گروه EAE-EX1 و EAE-EX2 در مقایسه با گروه EAE پایین تر بود ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*) (A). وزن بدن با استفاده از وزن اولیه در روز اول تزریق به وزن نهایی در روز ۲۱ مشخص شد (B). وزن در گروه EAE نسبت به دو گروه کنترل و EAE-EX2 به طور قابل توجهی کمتر بود. مقدار به عنوان میانگین  $\pm$  SD گزارش شد ( $p \leq 0.001$  (\*\*\*)).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد ۶ هفته پیش آماده‌سازی با تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش مقادیر کلوتو بافت مخچه در ۲۱ روز پس از ایمینوزاسیون در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE ( $p \leq 0.0001$ ) و در گروه EX در مقایسه با گروه کنترل شد ( $p \leq 0.001$ ). میزان کلوتو در گروه EAE به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ( $p \leq 0.001$ ). همچنین میزان آن در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE-EX2 بالاتر بود ( $p \leq 0.001$ ) (شکل 3-A, 3-B).

در ارتباط با میزان PLP، نتایج تحقیق حاضر نشان داد ۶ هفته پیش آماده‌سازی با تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش مقادیر PLP بافت مخچه در ۲۱ روز پس از ایمینوزاسیون در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE ( $p \leq 0.0001$ ) و در گروه EX در مقایسه با کنترل شد ( $p \leq 0.01$ ). همچنین میزان آن در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE-EX2 بالاتر بود ( $p \leq 0.001$ ) (شکل 3-A, 4-A).



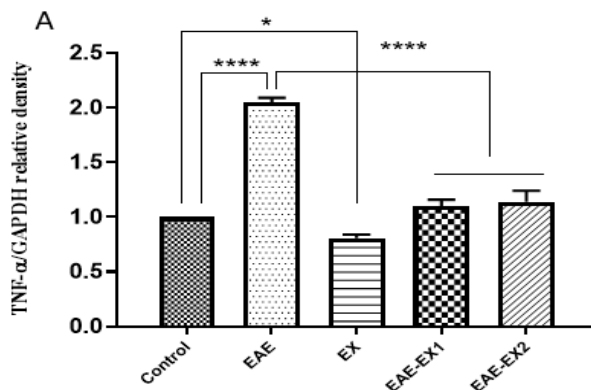
شکل ۳: میزان کلوئوتو (B) در بافت مخچه در ۲۱ روز بعد از ایمونوآسیون توسط وسترن بلات (A) انجام شد. میزان کلوئوتو به طور قابل توجهی در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. همچنین در گروه EAE-EX1 در مقایسه با EAE و گروه EAE-EX2 و در گروه EX در مقایسه با کنترل بالاتر بود. مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شد. ( $P \leq 0.0001$  \*\*\*\*,  $P \leq 0.001$  \*\*\*).



شکل ۴: میزان PLP (A) در بافت مخچه در ۲۱ روز بعد از ایمونوآسیون توسط وسترن بلات (A-3) انجام شد. میزان PLP به طور قابل توجهی در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. همچنین در گروه EAE-EX1 در مقایسه با EAE و گروه EAE-EX2 و در گروه EX در مقایسه با کنترل بالاتر بود. مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شد.



نتایج تحقیق حاضر نشان داد ۶ هفته پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش میزان TNF- $\alpha$  بافت مخچه در ۲۱ روز پس از ایمونیزاسیون در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل شد ( $p \leq 0.001$ ). در ارتباط با تغییرات TNF- $\alpha$  پس از القا مدل EAE، ۶ هفته HIIT به طور معنی داری میزان TNF- $\alpha$  را در هر دو گروه EAE-EX1/2 در مقایسه با گروه EAE ( $p \leq 0.001$ ) در هر دو گروه EX در مقایسه با کنترل کاهش داد ( $p \leq 0.05$ ) (شکل A-۵).

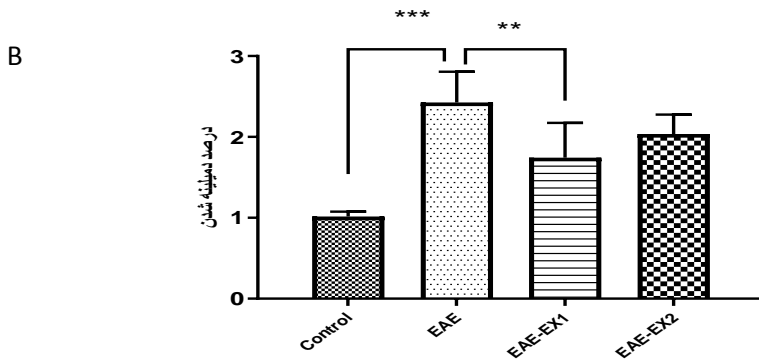
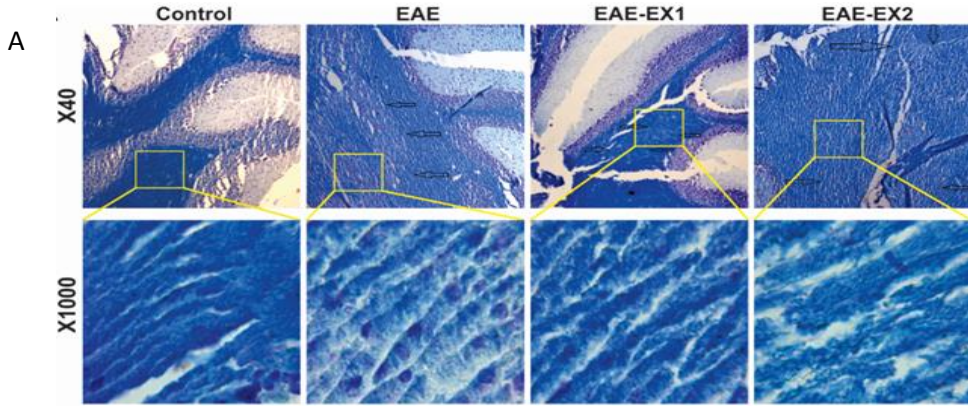


شکل ۵: میزان TNF- $\alpha$  (A) در بافت مخچه در ۲۱ روز بعد از ایمونیزاسیون توسط وسترن بلات (A۳) انجام شد در گروه EAE نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت و در هر دو گروه تمرینی EAE در مقایسه با گروه EAE و در گروه EX در مقایسه با کنترل بطور قابل توجهی کاهش یافت. مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شد. ( $p \leq 0.01$ ,  $*** p \leq 0.001$ )

در ارتباط با اثر تمرین تناوبی شدید بر میزان آسیب بافت مخچه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد ۶ هفته پیش آماده سازی با تمرین تناوبی شدید منجر به کاهش حجم دمیلینه شدن بافت مخچه در گروه های تمرین نسبت به گروه EAE شد. درصد دمیلینه شدن در گروه EAE نسبت به گروه کنترل به طور معناداری بالاتر بود ( $p \leq 0.001$ ). همچنین میزان دمیلینه شدن در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE به طور معناداری کمتر بود ( $P=0.007$ ) (شکل B-6).

### بحث و بررسی

در این مطالعه، به بررسی اثرات تمرین ورزشی به عنوان پیش آماده سازی در سنتز پروتئین های میلین ساز و بهبود علائم مربوط به بیماری ام اس در مدل EAE پرداخته شد. نتایج نشان داد که پیش آماده سازی با تمرین تناوبی منجر به افزایش سطوح کلوتو و PLP و کاهش سطوح TNF- $\alpha$  و همچنین منجر به کاهش دمیلیناسیون و شدت علائم EAE در بافت مخچه می شود.



شکل ۶: رنگ‌آمیزی LFB به منظور نمایش نواحی دمیلبه شده در بافت مخچه. مقایسه میزان دمیلبه شدن بافت مخچه در ۲۱ روز بعد از ایمونیزاسیون با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰۰ در گروه‌های تحقیق (A). میزان دمیلبه‌سایون کمتری در گروه EAE-EX1 نسبت به گروه EAE مشاهده شد. همچنین در گروه EAE نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بیشتر بود. مقدار به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شد (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

#### تاثیر فعالیت ورزشی بر پروتئین‌های میلین ساز

در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر پروتئین‌های درگیر در بیماران ام اس مطالعات نشان دادند که فعالیت ورزشی منجر به افزایش نوروتروفیک‌های مانند BDNF و NGF می‌شود که به نظر می‌رسد، در ترمیم عصبی و پلاستیستی در بیماران ام اس نقش دارند (۲۰، ۲۱). همچنین در ارتباط با تاثیرات مثبت فعالیت ورزشی بر بیماری ام اس مطالعات مختلف نشان داده‌اند که انجام برنامه تمرینی منظم میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی در بیماران مبتلا به ام اس را کاهش و کیفیت زندگی بیماران را بهبود می‌دهد (۲۲، ۲۳) به عنوان مثال لویت و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادند ۳ ماه تمرین هوازی، سه جلسه در هفته در بیماران مبتلا به ام اس منجر به افزایش در حجم هیپوکامپ و بهبود حافظه و عملکردهای شناختی در این بیماران شد (۲۴). همچنین ونزا و همکاران ۲۰۱۶ نشان دادند سطوح BDNF سرم در بیماران مبتلا به ام اس در مقایسه با افراد سالم کمتر است و به دنبال ۲۴ هفته تمرین هوازی زیر

بیشنه بر دوچرخه، سطوح BDNF سیزده درصد افزایش داشته است (۲۵). با این حال، تاکنون هیچ مدرکی وجود ندارد که نشان دهد فعالیت ورزشی از طریق افزایش کلوتو منجر به افزایش در فرآیند میلین سازی و کاهش میزان دمیالیناسیون می شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد ۶ هفته تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش میزان کلوتو و PLP در گروه EX در مقایسه با گروه کنترل و در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه های EAE- و EAE-EX2 شد.

در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر کلوتو برخی مطالعات مکانیسم های فیزیولوژیکی را به عنوان توضیحی در مورد چگونگی اثر ورزش بر افزایش کلوتو نشان دادند. طبق تحقیقات انجام شده می توان گفت، تمرین ورزشی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و فعالیت گیرنده آنژیوتانسین نوع I، افزایش AMPK و PGC1- $\alpha$  منجر به افزایش در سطوح کلوتو می شود (۲۶، ۲۷). بنابراین، می توان گفت تمرین تناوبی شدید با افزایش در مسیر AMPK- PGC1- $\alpha$  منجر به افزایش کلوتو می شود. همچنین نتایج تحقیق حاضر افزایش میزان PLP را در گروه EAE-EX1 در مقایسه با گروه EAE و EAE-EX2 و در گروه EX در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. PLP یک پروتئین کلیدی است که مسئول میلیناسیون در سیستم اعصاب مرکزی است. می توان گفت یکی از مکانیسم های افزایش PLP ناشی از فعالیت ورزشی، افزایش کلوتو است. کلوتو در سلول های الیگودندروسیت به عنوان سلول های اصلی میلین ساز از طریق اتصال به گیرنده تیروزین کینازی خود که احتمالاً در الیگودندروسیت ها قرار دارد منجر به فسفوریله شدن مسیره های AKT و ERK1/2 شده و در نهایت با افزایش در بیان پروتئین های MBP, MOG و PLP به عنوان پروتئین های میلین ساز، همراه خواهد بود.

مکانیزم های ناشی از اثر کلوتو بر فرآیند میلینه شدن

با توجه به آسیب های عصبی ایجاد شده در بیماری ام اس، مطالعات مختلف به دنبال کشف برخی از فاکتورهایی هستند که بتوانند روند تخریب سیستم عصبی در این بیماران را در مسیرهای پاتولوژیک کاهش دهند. در مطالعات انجام شده در ارتباط با سطوح کلوتو در بیماران مبتلا به ام اس، کانرت و همکاران ۲۰۱۶ نشان دادند که سطوح اولیه کلوتو و FGF23 در مایع مغزی نخاعی کودکان مبتلا به بیماری های التهابی سیستم عصبی مرکزی به طور معناداری نسبت هماتایان خود کمتر است که این کاهش در پسران نسبت به دختران کمتر بود (۲۸).

تحقیق حاضر نشان داد سطوح کلوتو در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل، کمتر بود که یافته های قبلی را کاملاً تایید می کند. کاهش میزان کلوتو ممکن است در بیماران ام اس ناشی از کمبود ویتامین D باشد که به عنوان یک اختلال رایج در این افراد است. همچنین به نظر می رسد، کلوتو در متابولیسم ویتامین D نقش بسیار مهمی ایفا می کند که کاهش ویتامین D در تغییرات کلوتو مهم است (۲۹). از دلایل دیگری که می توان به کاهش مقادیر کلوتو در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل اشاره کرد، نقش مسیره های التهابی است که به عنوان عوامل اصلی برای پاتوژنز این بیماری اند که افزایش در فاکتورهای التهابی، منجر به کاهش بیان کلوتو می شود (۷). برای اثبات این نکته در تحقیق حاضر، ما مقادیر مربوط به تغییرات TNF- $\alpha$  را اندازه گیری کردیم که نتایج نشان داد، مقادیر TNF- $\alpha$  در گروه EAE در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. (شکل ۵-A).

در ارتباط با نقش کلوتو در میلین سازی و بلوغ الیگودندروسیت ها مطالعات نشان دادند کلوتو در سلول های الیگودندروسیت به عنوان سلول های اصلی میلین ساز از طریق اتصال به گیرنده تیروزین کینازی خود که احتمالاً

در الیگودندروسیت‌ها قرار دارد منجر به فسفوریله شدن مسیره‌های AKT و ERK1/2 شده و در نهایت با افزایش در بیان پروتئین‌های MBP و PLP به عنوان پروتئین‌های میلیون‌ساز، همراه خواهد بود (۴). برای درک نقشی که کلوتو در فرآیند میلیون‌سازی می‌کند، میزان دمیلینه شدن و سطوح PLP را در گروه‌های تحقیق مورد بررسی قرار دادیم. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، ۶ هفته تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش سطوح PLP در گروه EAE-EX1 و EX شد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که فعال شدن گیرنده‌های کلوتو در الیگودندروسیت‌ها یک مسیر سیگنالینگ را فعال می‌کنند که غلظت PLP را افزایش می‌دهد (۴). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که کلوتو بلوغ الیگودندروسیت‌ها و میلیون‌شدن را در هر دو شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانات افزایش داده است و دارای اثر محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو است (۹). بنابراین، ما پیشنهاد می‌کنیم که افزایش در غلظت کلوتو و PLP در بافت مخچه پس از HIIT ممکن است مسئول کاهش دمیلینه شدن در گروه EAE-EX1 باشد.

در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر کاهش حجم دمیلینه شدن در بافت مخچه، نتایج رنگ‌آمیزی بافتی نشان داد پیش‌آماده‌سازی با تمرین ورزشی منجر به جلوگیری از کاهش حجم دمیلینه شدن در گروه تمرین در مقایسه با گروه EAE شد. با توجه به تحقیقات انجام شده شاید بتوان گفت، تمرین ورزشی با افزایش در میزان کلوتو به عنوان فاکتور میلیون‌ساز در سیستم اعصاب مرکزی، نقش مهمی در حفاظت از دمیلینه شدن ایفا می‌کند.

کاهش علائم بالینی ناشی از اثر فعالیت ورزشی

در این مطالعه به بررسی اثرات تمرین ورزشی به عنوان پیش‌آماده‌سازی در بهبود علائم مربوط بیماری ام اس در مدل EAE پرداخته شد. نتایج نشان داد که پیش‌آماده‌سازی با تمرین تناوبی منجر به کاهش شدت علائم بالینی، تاخیر در زمان شروع علائم بالینی و جلوگیری از کاهش وزن در گروه‌های تمرین در مقایسه با گروه EAE شد. به طور کلی با توجه به تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد تغییر در شدت و شروع علائم بالینی در مدل EAE به دنبال برنامه‌های مختلف تمرینی مانند برنامه تمرینی اجباری (۳۰) و اختیاری (۳۱) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. شاید بتوان گفت یکی از دلایلی که تمرین ورزشی منجر به تاخیر در شروع علائم بالینی و کاهش شدت این علائم در گروه تمرین در مقایسه با گروه EAE شده، نقش ضد التهابی آن باشد. برای اثبات این نکته در تحقیق حاضر، ما مقادیر مربوط به تغییرات TNF- $\alpha$  را اندازه‌گیری کردیم که نتایج نشان داد پیش‌آماده‌سازی با تمرین تناوبی منجر به کاهش مقادیر TNF- $\alpha$  در گروه EAE-EX1 و EAE-EX2 در مقایسه با گروه EAE شد. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که تمرین ورزشی به عنوان پیش‌آماده‌سازی منجر به افزایش در عملکرد سیستم ایمنی از طریق افزایش در فعالیت لنفوسیت‌ها و تقویت سیستم ضد التهابی بدن و در نهایت کاهش مقادیر عوامل ضد التهابی از جمله TNF- $\alpha$  خواهد شد.

با توجه به نکات گفته شده و ارتباط بین کلوتو و ویتامین D یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم اندازه‌گیری ویتامین D در حیوانات بود که پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ۶ هفته تمرین تناوبی در موش‌ها منجر به افزایش میزان کلوتو و PLP در بافت مخچه و کاهش دی‌میلیناسیون با استفاده از مدل EAE شد. بنابراین، مطالعه ما از نقش مهم تمرین تناوبی در افزایش بیومارکرهای میلیون‌ساز در مدل ام اس پشتیبانی می‌کند.

1. White LJ, Castellano V. Exercise and brain health—implications for multiple sclerosis. *Sports medicine*. 2008;38(2):91-100.
2. Bernardes D, Oliveira-Lima OC, da Silva TV, Faraco CCF, Leite HR, Juliano MA, et al. Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. *Journal of neuroimmunology*. 2013;264(1-2):24-34.
3. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1079-106.
4. Chen C-D, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, et al. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(5):1927-39.
5. Zeldich E, Chen C-D, Avila R, Medicetty S, Abraham CR. The anti-aging protein Klotho enhances remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2015;57(2):185-96.
6. Greer JM, Pender MP. Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of autoimmunity*. 2008;31(3):281-7.
7. Degaspari S, Tzanno-Martins CB, Fujihara CK, Zatz R, Branco-Martins JP, Viel TA, et al. Altered KLOTHO and NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$  signaling are correlated with nephrectomy-induced cognitive impairment in rats. *PloS one*. 2015;10(5):e0125271.
8. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918-34.
9. Abraham CR, Chen C, Cuny GD, Glicksman MA, Zeldich E. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future medicinal chemistry*. 2012;4(13):1671-9.
10. King GD, Chen C, Huang MM, Zeldich E, Brazee PL, Schuman ER, et al. Identification of novel small molecules that elevate Klotho expression. *Biochemical Journal*. 2012;441(1):453-61.
11. Ji N, Luan J, Hu F, Zhao Y, Lv B, Wang W, et al. Aerobic exercise-stimulated Klotho upregulation extends life span by attenuating the excess production of reactive oxygen species in the brain and kidney. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(4):3511-7.
12. Tan S-J, Chu MM, Toussaint ND, Cai MM, Hewitson TD, Holt SG. High-intensity physical exercise increases serum  $\alpha$ -klotho levels in healthy volunteers. *Journal of circulating biomarkers*. 2018;7:1849454418794582.
13. Aleagha MSE, Siroos B, Ahmadi M, Balood M, Palangi A, Haghghi AN, et al. Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2015;281:5-8.
14. Aleagha MSE, Harirchian MH, Lavasani S, Javan M, Allameh A. Differential expression of klotho in the brain and spinal cord is associated with total antioxidant capacity in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2018;64(4):543-50.
15. Dalgas U, Stenager E. Exercise and disease progression in multiple sclerosis: can exercise slow down the progression of multiple sclerosis? *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2012;5(2):81-95.

16. Briken S, Gold S, Patra S, Vettorazzi E, Harbs D, Tallner A, et al. Effects of exercise on fitness and cognition in progressive MS: a randomized, controlled pilot trial. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014;20(3):382-90.
17. Bernardes D, Oliveira-Lima O, da Silva TV, Juliano M, dos Santos DM, Carvalho-Tavares J. Metabolic Alterations in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice: Effects of Prior Physical Exercise. *Neurophysiology*. 2016;48(2):117-21.
18. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007;34(8):760-5.
19. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiology & behavior*. 2015;147:78-83.
20. Castellano V, White LJ. Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2008;269(1):85-91.
21. Gold SM, Schulz K-H, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, et al. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *Journal of neuroimmunology*. 2003;138(1):99-105.
22. Barry A, Cronin O, Ryan AM, Sweeney B, Yap SM, O'Toole O, et al. Impact of Exercise on Innate Immunity in Multiple Sclerosis Progression and Symptomatology. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:194.
23. 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. *Journal of neuroimmunology*. 2016;299:53-8.
24. Leavitt V, Cirnigliaro C, Cohen A, Farag A, Brooks M, Wecht J, et al. Aerobic exercise increases hippocampal volume and improves memory in multiple sclerosis: preliminary findings. *Neurocase*. 2014;20(6):695-7.
25. Wens I, Broekmans T, Hendriks J, Savelberg H, Hesselink M, Eijnde B. Effects of exercise intensity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Multiple Sclerosis*. 2015;2015.
26. Kawamura T, Yoshida K, Sugawara A, Nagasaka M, Mori N, Takeuchi K, et al. Regulation of skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by exercise and angiotensin-converting enzyme inhibition in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertension Research*. 2004;27(1):61-70.
27. Muñoz A, Corrêa CL, Lopez-Lopez A, Costa-Besada MA, Diaz-Ruiz C, Labandeira-Garcia JL. Physical exercise improves aging-related changes in angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the Substantia nigra. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2018;73(12):1594-601.
28. Kunert SK, Hartmann H, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho and fibroblast growth factor 23 in cerebrospinal fluid in children. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2016:1-12.
29. Nieves J, Cosman F, Herbert J, Shen V, Lindsay R. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology*. 1994;44(9):1687-.
30. Patel D, White L, Lira V, Criswell D. Forced exercise increases muscle mass in eae despite early onset of disability. *Physiological research*. 2016;65(6):1013.
31. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Musella A, Giudice TL, Mataluni G, et al. Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiology of disease*. 2009;36(1):51-9.

## The Effect of High Intensity Interval Training Preconditioning on Klotho and TNF- $\alpha$ Female Mice with Multiple Sclerosis

Fatane Farahmand<sup>1</sup>, Maryan Nourshahi<sup>1\*</sup>, Maryam Soleimani<sup>2</sup>, Hamid Rajabi<sup>3</sup>, Kevin Power<sup>4</sup>.

1 Department of Biological Sciences in Sport and Health, Faculty of Sports Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2 Department of Medical Basic Sciences, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences Tehran, Iran,

3 Department of Exercise Physiology, Sport Science Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran,

4 School of Human Kinetics and Recreation, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL, Canada

\*Corresponding author: Email: m-nourshahi@sbu.ac.ir

### Abstract

**Background Purpose** Exercise activity plays an important role in increasing biomarkers such as Klotho and PLP and improves clinical outcome in mice with MS. In the present study, we evaluated whether 6 weeks of high-intensity interval training (HIIT) increases Klotho or PLP levels and decreased TNF- $\alpha$  in cerebellum tissue.

**Methodology:** Animals were divided into two groups of training (EX) and control (Con). After 4 weeks, the exercise and control groups were divided into two groups and EAE was induced in half of the animals in the control and EX groups. In the EX-6 weeks group after 4 weeks of training, EAE induction and training protocol continued until the sixth week. In the EX-4 weeks group after 4 weeks of training, EAE was induced and the training was stopped.

**Results:** Klotho and PLP levels increased in the EAE-EX1 group compared to the EAE and EAE-EX2 groups ( $P \leq 0.0001$ ). Also, demyelination levels decreased in the EAE-EX1 group compared to the EAE group ( $P \leq 0.007$ ). TNF- $\alpha$  concentration decreased in both EAE-exercise groups ( $P \leq 0.0001$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed that HIIT increased Klotho and PLP levels and improved clinical outcomes in the mice with MS.

**Key words** Multiple sclerosis, PLP, High intensity interval training, Cerebellum.