پژوهش‌نامهٔ فیزیولوژی ورزشی کاربردی **مقاله پژوهشی**

سال شانزدهم/ شماره سی و دوم/پاییز و زمستان ۱۳۹۹

دریافت: ۹۹/۵/۵ پذیرش: ۹۹/۶/۲۳ ص ص: ۱۰۱-۸۷

تاثیر یک دوره تمرینات ورزشی اجباری و اختیاری قبل از القاء EAE بر یکپارچگی سد خونی-مغزی و بیان ژن برخی پروتئین های اتصالات محکم

مرضیه یعقوبی[۱]، محمدرضا کردی[۲]، عباسعلی گایینی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس (MS) شایع ترین بیماری دِمیلینه شدن در سیستم عصب مرکزی (CNS) است. یکی از شبیه ترین مدلهای حیوانی MS، اینسفالومیت خود ایمن تجربی (EAE) است، که بیشتر در مطالعات مورد استفاده و بررسی قرار می گیرد. در این مقاله به بررسی تاثیر تمرینات ورزشی شنای اجباری و ویل رانینگ اختیاری قبل از القای EAE بر یکپارچگی سد خونی –مغزی و بیان ژن پروتئین های اتصالات محکم آکلودین و کلودین۵ در بافت مغز می پردازد. **مواد و روشها**: تعداد ۴۸ موش ماده C57BL/6 را به طور تصادفی در چهار گروه: شنای اجباری (تعداد=۱۲سر)، ویل رانینگ اختیاری (تعداد=۱۲سر)، گروه کنترل EAE (تعداد= ۱۲سر)، و کنترل سالم (تعداد=۱۲ سر) تقسیم شد. حیوانات گروه شنا ۳۰ دقیقه در روز و حیوانات گروه ویل رانینگ ۱ ساعت در روز، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته فعالیت نمودند. بعد از پایان دوره تمرین بیان ژن پروتئین های آکلودین و کلودین۵ به روش RT-PCR اندازه گیری و داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی؛ با نرم افزار SPSS16 و P<۰/۰۵ بررسی شد. **یافته‌ها**: رنگ آمیزی ایوانز بلو نشان داد که میزان نفوذپذیری سد خونی مغزی در گروه های ورزشی به طور معنا داری کمتر از EAE بدون ورزش است. نمرات بالینی در هر دوگروه تمرینی + EAE نسبت به گروه کنترل EAE کاهش، و تمرینات ورزشی از کاهش وزن بدن جلوگیری و بیان ژن پروتئین های آکلودین و کلودین ۵ در هر دو گروه تمرینی+EAE نسبت به گروه کنترل EAE افزایش نشان داده است. **نتیجه گیری**: به نظر می‌رسد که تمرینات شنای اجباری و ویل رانینگ داوطلبانه باعث افزایش بیان ژن دو پروتئین آکلودین و کلودین۵ می شود و درنتیجه یکپارچگی سد خونی مغزی در بافت مغز موش ها بهبود می یابد.

واژه‌های کلیدی: بیماری MS، اینسفالومیلیت خود ایمن تجربی، تمرینات ورزشی اختیاری و اجباری، سد خونی-مغزی، پروتئین های اتصالات محکم

۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران نویسنده مسئول: mrkordi@ut.ac.ir

۳ استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس[1](MS) شایع ترین بیماری دِمیلینه شدن در سیستم عصب مرکزی است که زندگی حدود ۲ میلیون نفر در جهان را تحت تاثیر خود قرارداده است، بطور معمول MS باعث ناتوانی عصبی در بزرگسالان، بخصوص در زنان، در طی دهه سوم و چهارم زندگی می شود (۱). نشانه‌های MS شامل: از دست دادن نورن، آسیب آکسونی و آتروفی CNS[2] است (۲). علائم MS در افراد شامل خستگی (۷۵–۹۰ درصد)، ضعف (۳۰/۸ درصد)، علائم نوریت بینایی (۲۰/۱ درصد)، صدمات عصبی (۱۹/۶ درصد) و آتاکسی (۱۴/۳ درصد) می باشد (۳). خستگی، مفاصل دردناک، افسردگی و از دست دادن خاطرات در ۸۰ درصد از بیماران MS دیده شده است (۴).

یکی از شبیه ترین مدل های حیوانی بیماری MS، اینسفالومیت خود ایمن تجربی[3] (EAE) است که علت و علائم آن شبیه به نمونه انسانی آن می باشد (۵). یکی از پیش نشانه های ایجاد MS اختلال در یکپارچگی و عملکرد سد خونی مغزی[4] (BBB) است (۶). سد خونی مغزی یک واحد عصبی–عروقی از سلول های اندوتلیال میکرو وسکولار است که با دیگر سلول های مغز مثل آستروسیت ها، پری سایت ها، نورون ها و میکروگلیاها ارتباط دارد و رابط بین پارنشیمای مغز و گردش خون سیستمی است که ورود مواد مغذی، ویتامین ها، یون ها و مولکول های دیگر به مغز را تنظیم می‌کند و مغز را از آسیب های ناشی از سموم و پاتوژن ها محافظت می‌کند و برای عملکرد طبیعی مغز حیاتی است (۶). شکاف سلول های اندوتلیال در BBB بوسیله پروتئین های اتصالات محکم[5] (TJ) به سختی چسبانده می شوند و حرکت مولکول ها بین خون و مغز را محدود می کنند و مسئول محدودیت شدید انتشار می باشند (۶، ۷). اتصالات محکم (TJ) با خود تجمعی به صورت ساختار کیسه زیپ شده تشکیل یک مانع فیزیکی در شکاف سلول های اندوتلیال می دهند و این باعث افزایش یکپارچگی BBB می شود (۸). پروتئین های TJ شامل: آکلودین و کلودین ۱ و ۳ و ۴ و ۵ و ۱۲ و ...می باشد (۹) که در میان آنها کلودین ۵، کلودین سازنده اصلی در BBB است. بنابراین در میکرووسکولار های مغز سطوح mRNA کلودین۵ حدود ۱۰۰۰ برابر بیشتر از سایر کلودین ها است (۱۰). مطالعات نشان داده است نفوذ پذیری تغییر یافته BBB با کاهش در بیان کلودین۵ همراه است (۱۱). کلودین۵ در تعدیل نفوذ پذیری یون ها نیز مانند ماکرومولکول ها شرکت می کند (۳)، آکلودین نیز نقش بسیار مهمی در برقراری یکپارچگی BBB بازی می‌کند. تغییرات در نفوذ پذیری BBB با تغییر در بیان آکلودین (۱۲) و عملکرد سد آندوتلیال مرتبط است (۱۳). قبل از توسعه علائم بیماری در EAE دفسفوریلاسیون آکلودین اتفاق می افتد که نشان می دهد آکلودین می‌تواند یک هدف برای رویدادهای سیگنالینگ در EAE باشد (۱۴). با این حال تغییرات پروتئین های TJ در بیماری التهاب عصبی خود ایمن به طور کامل درک نمی شود. در EAE کلودین ۵ و ۳ دراندوتلیوم کاهش می یابند. TNF-α باعث افزایش نفوذ پذیری BBB و با کاهش بیان آکلودین و کلودین۵ همراه است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی بر روی یکپارچگی BBB با تنظیم منفی کلودین ۵ تاثیر می گذارد (۹).

اگر چه MS یک بیماری برگشت ناپذیر همراه با اختلال حرکتی مزمن است، اما مداخلات درمانی می‌تواند علایم بیماری را کاهش و کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشد. در این راستا تحقیقات انجام شده نشان می دهد که فعالیت های ورزشی قبل از شروع بیماری از علائم کلینیکی جلوگیری می کند و موجب بهبود عملکرد جسمانی

[1] Multiple Sclerosis(MS)
[2] Axonal and atrophy damage
[3] Experimental autoimmune encephalomyelitis
[4] Blood Brain Barrier (BBB)
[5] Tight junction

و شناختی بیماران در حین درمان می شود (۱۵). اخیرا کالرن و همکاران[1] (۲۰۱۵) نشان دادند که برنامه توانبخشی فیزیکی با بهبود راه رفتن در بیماران MS ارتباط مستقیم دارد (۱۶). بر اساس مطالعه مختارزاده و همکاران (۲۰۱۸) ۸ هفته فعالیت ورزشی غلظت نشانگرهای نفوذ پذیری خاص BBB در بیماران مبتلا به MS را نرمال کرد (۱۷). علاوه بر این وایت و همکاران[2](۲۰۰۸) نشان دادند که ورزش به طور بالقوه قادر به مقابله با عدم تعادل بین سایتوکین های th1 پیش التهابی و سایتوکین های ضدالتهابی (برای مثال IL10) با افزایش مکانیسمهای ضدالتهابی در بیماران MS است (۱۸). این مطالعات موجب تحقیقات بیشتری از تمرین ورزشی بر روی MS شد و به طور خاص اثرات مفید و مکانیسم های عمل تمرین ورزشی بر EAE مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). بطور مشابه بنسون[3] و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که موش های EAE شده ای که در روز به مدت یک ساعت فعالیت اختیاری انجام دادند، علائم کلینیکی بیماری در آنها به تعویق افتاد و درد ناشی از بیماری بهبود زودرس یافت (۲۰). برناردز و همکاران[4] (۲۰۱۶) گزارش کردند که برنامه ورزشی اجباری طولانی مدت بطور معناداری نفوذ لکوسیت ها به CNS را کاهش می دهد (۱۶). مطالعات پیشین اثرات تمرین ورزشی بر EAE را با نتایج متضادی بررسی کردند (۱۹). در مقایسه با فعالیت ورزشی داوطلبانه ویل رانینگ، شنای اجباری سطوح استرس بالاتری را در حیوانات ایجاد می کند (۲۱) در مطالعه ای که توسط سوزا و همکاران[5](۲۰۱۷) انجام شد، نشان داده شد که تمرینات ورزشی قدرتی و استقامتی بیان پروتئین های اتصالات محکم در CNS را بعد از القای EAE تا سطوح پایه تثبیت می کند. این یافته ها نشان می دهد که تمرینات جسمانی یکپارچگی BBB را با محافظت از اتصالات محکم حفظ می کند. با این حال هنوز مشخص نیست که آیا تمرینات ورزشی در تعدیل پاسخ ایمنی محیطی/مرکزی و نفوذپذیری سد خونی مغزی در EAE موثر است؟ (۸).

از یافته های فوق استنباط می گردد که بررسی اثر برنامه ورزشی خاص روی متغیرهای یکپارچه کننده BBB خصوصا دو پروتئین (آکلودین و کلودین۵) می تواند روی پیشگیری و بهبود بیماری MS موثر باشد. با توجه به اثر مهم یکپارچگی BBB و پروتئین های TJ در شروع و پیشرفت بیماری MS و مدل موشی آن یعنی EAE این مسئله وجود دارد که آیا تمرینات ورزشی اجباری و اختیاری قبل از القاء EAE بر یکپارچگی BBB و برخی پروتئین های اتصالات محکم اثر دارد؟ بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر دو پروتکل تمرینی اجباری و اختیاری قبل از القاء EAE بر نفوذپذیری سد خونی–مغزی و بیان ژن پروتئین های آکلودین و کلودین ۵ در موش های ماده C57BL/6 می باشد.

روش پژوهش

حیوانات آزمایشگاهی

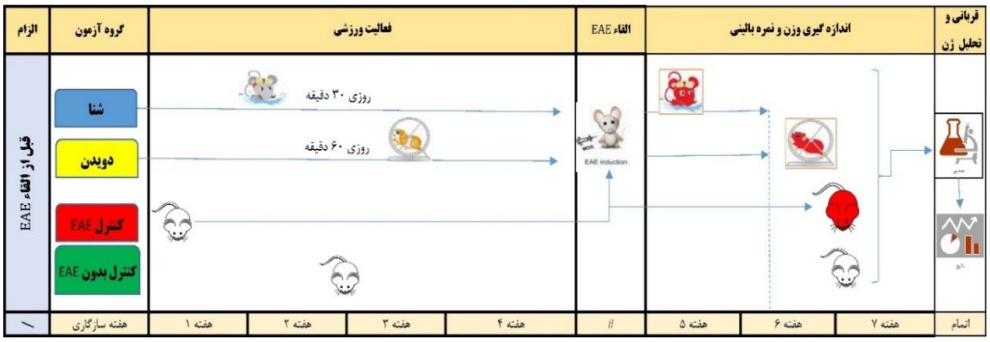
تعداد ۴۸ موش ماده C57BL/6 (۶ تا ۸ هفته و وزن ۱۶ الی ۲۰ گرم) از انستیتو پاستور ایران(IPI) خریداری و به آزمایشگاه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری (واقع در کرج، SICBD) منتقل شدند. حیوانات در قفس های عمومی در شرایط نور کنترل شده با چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی ۷ صبح)، در دمای۱±۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت حدود ۴۵٪ قرار گرفتند. آنها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام پرتکل های

[1] Kalron et al.
[2] White et al.
[3] Benson et al.
[4] Bernardes et al.
[5] Souza et al.

آزمایشگاهی توسط کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره شناسه IR.UT.SPORT.REC.1397.028 تصویب شد.

پروتکل تمرینات ورزشی

قبل از شروع پروتکل تمرینی حیوانات یک هفته تحت سازگاری با استخر و ویل رانینگ قرار گرفتند. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- ویل رانینگ اختیاری+EAE (۱۲ سر)، ۲- شنای اجباری+EAE (۱۲ سر)، ۳- EAE (۱۲سر)، ۴- کنترل سالم (۱۲ سر)، تمرینات شنای اجباری: ۳۰ دقیقه در روز،۵ روز متوالی در هفته و به مدت ۴ هفته (در درجه حرارت آب ۱±۳۱ درجه سانتیگراد) موش ها در مخزن بزرگ ۶۰ * ۱۰۰ سانتی متر شنا کردند (۲۲, ۲۳)(شکل۱).



شکل ۱: طراحی مطالعه. القاء EAE در سه روز پی در پی صورت گرفت. گروه‌های شنا، ویل رانینگ و کنترل EAE دریافت کننده میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین MOG_{35-55} / ادجوانت کامل فروند و پرتوسیس تاکسین بودند. گروه کنترل سالم سالین دریافت کرد.

تمرین ویل رانینگ اختیاری: حیوانات ۱ ساعت در روز، ۵ روز متوالی در هفته و به مدت چهار هفته در قفس هایی که ویل رانینگ متصل شده به کامپیوتر داشت قرار گرفتند و مسافت پیموده شده آنها ثبت شد. تمرینات ورزشی ۴ هفته قبل از القای EAE آغاز شد و تا ۱۰ روز پس از القاء[1](dpi) ادامه داشت، که زمان شروع علائم بالینی بود. نمره کلینیکی و وزن بدن برای ۲۰dpi ارزیابی و ثبت شد. و در پایان، ۵۰ روز پس از شروع پروتکل حیوانات قربانی شدند تا بافت مغز آنها استخراج شود.

القای EAE و نمره دهی بالینی

پس از برنامه تمرینی چهار هفته ای موش ها با تزریق داخل صفاقی ۲۰۰ میکروگرم الیگودندروسیت میلین MOG_{35-55} [2] که در بافر فسفات سالین (PBS)[3]حل شده با حجم مساوی از ادجوانت فروند کامل (CFA)[4]و ۴۰۰ میکروگرم باکتری مایوباکتریوم توبرکلوزیس[5] H37Ra ایمن سازی شدند. تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۲ (در

[1] Day post-immunization(dpi)
[2] Myelin oligodendrocytes glycoprotein
[3] Phosphate-buffered saline
[4] Complete freunds adjuvant
[5] Mycobacterium tuberculosis

روز تزریق و ۲ روز پس از آن) با ۳۰۰ نانوگرم پروتوسیس تاکسین[1] تزریق داخل صفاقی شدند. گروه های کنترل فقط سالین دریافت کردند این مدل در موسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری تولید شد (۲۴). برای ارزیابی وزن بدن، حیوانات روزانه وزن کشی شدند و علائم بالینی EAE توسط دو ناظر مستقل مورد ارزیابی قرار گرفت که به شرح زیر است:

نمره صفر= بدون بیماری، نمره ۱= کاهش وزن و ضعف دم، نمره ۲= ضعف اندام عقبی، نمره ۳= فلج کامل اندام عقبی، نمره ۴= فلج اندام عقبی و ضعف یا فلج اندام جلویی، نمره ۵=مرگ (۵و۸).

آماده سازی بافت

پس از کامل شدن پروتکل تمرین تمام حیوانات با کتامین/زیلازین[2]به مقدار ۱۰ به ۱ بیهوش شدند و بعد از آن با ترکیب ۰/۹ درصد Nacl + ۶ درصد پارافرمالیدهید (PFA)[3] تزریق وریدی شدند و در ادامه حیوانات قربانی، بافت مغز آنها برداشته و در PFA ۴٪ ثابت شدند و برای رنگ آمیزی ایوانزبلو[4] (۸) و ارزیابی کمی واکنش زنجیره ای پلیمراز زمان واقعی (qRT-PCR) پردازش شدند، براتی و همکاران[5] (۲۵). از روش Real Time PCR برای بررسی بیان ژن های کلودین۵ و آکلودین در سد خونی و مغزی استفاده شد.

مراحل استخراج RNA: در ابتدا بافت را با استفاده از ازت مایع؛ داخل ظرف (ترجیحاً هاون چینی) هموژن می شود. سپس RNA X PLUS ۳۰۰µL به ازای ۵۰ mg–۱۰۰ بافت اضافه می شود. بعد از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و اضافه کردن ۲۰۰ µL کلروفرم سرد، میکروتیوب به مدت رویی صورت گرفته و به میکروتیوب RNase free انتقال می یابد. سپس ۵۰۰ µL ایزوپروپانول به فاز آبی اضافه شده و بعد از انکوباسیون به مدت ۳۰ ثانیه شدیدا تکان داده شده و میکروتیوب حاوی نمونه در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می شود. در ادامه فاز آبی ۱ ساعت در فریزر ۲۰– ، در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می شود. محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاوی RNA نگه می شود و رسوب با ۷۰۰ µL اتانول ۸۰٪ شستشو می شود. نمونه ها به آرامی ورتکس شده و در ۷۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می شود. در نهایت الکل دور ریخته شده و نمونه در دمای اتاق قرار گرفته تا رسوب نسبتا خشک شود. رسوب RNA در DEPC water۳۰ µL حل می گردد و در فریزر ۸۰– نگهداری می شود.

Real time_PCR: از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض (DNase I Fermentas) قرار گرفت. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با دستگاه اسپکتوفتومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر (MWG-Biotech, Germany) Oligo dt و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Focter City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

[1] Pertussis toxins
[2] Ketamine/Xylazine
[3] Paraformaldehyde
[4] Evans Blue(EB)
[5] Barati et al.

نمونه ها تا زمان انتقال به دستگاه بر روی یخ نگه داشته شدند. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دما های هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰–۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت سنجش بیان ژن را نمایش می دهد.

نسبت بیان ژن های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده ها در فرمول

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ X} - (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ 0}$$

جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت سنجش بیان ژنهای آکلودین، کلودین۵ و بتا اکتین

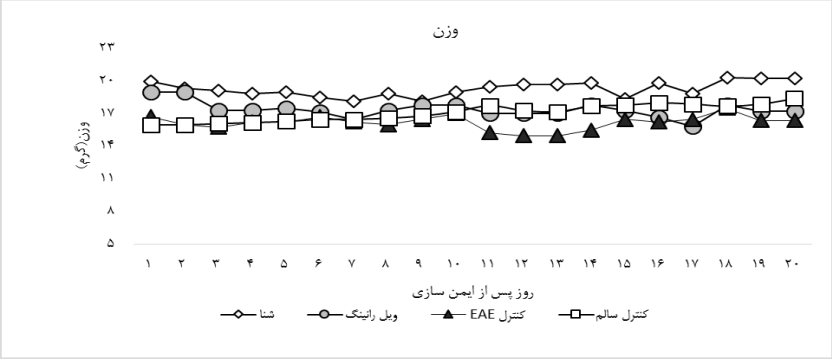
ژن	توالی پرایمر
Occludin	m-occludin-F: AGTTGTGGGAGAAGGGAGAGG
	m-occludin-R: ACTGGAGATAGGAAAGTGATGGA
Claudin5	m-claudin 5-F: TGTGTCTGGTAGGATGGGTGG
	m-claudin 5-R: ACGATGTTGTGGTCAAGGAAGG
m-bactin5	m-bactin-F: TCAGAGCAAGAGAGGCATCC
	m-bactin-R: GGTCATCTTCTCACGGTTGG

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک و همچنین برای بررسی همسان بودن واریانس ها از آزمون لون استفاده شد. برای تعیین اختلاف داده‌ها در بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

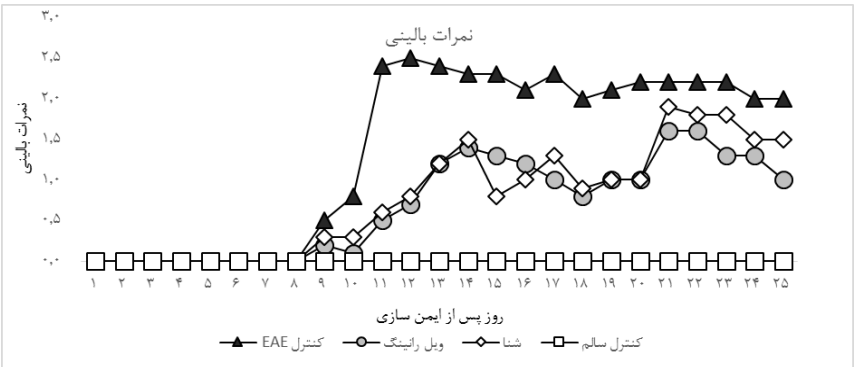
یافته‌ها

در بررسی تغییرات وزن بدن در دوره تمرینی نتایج نشان داد که هر دو گروه تمرین+EAE از روز هشتم بعد از القاء نسبت به گروه کنترل EAE از کاهش قابل توجه وزن بدن محافظت و به لحاظ ظاهری شبیه به گروه کنترل سالم شدند (P=./۰۰۰۱) (شکل ۲).



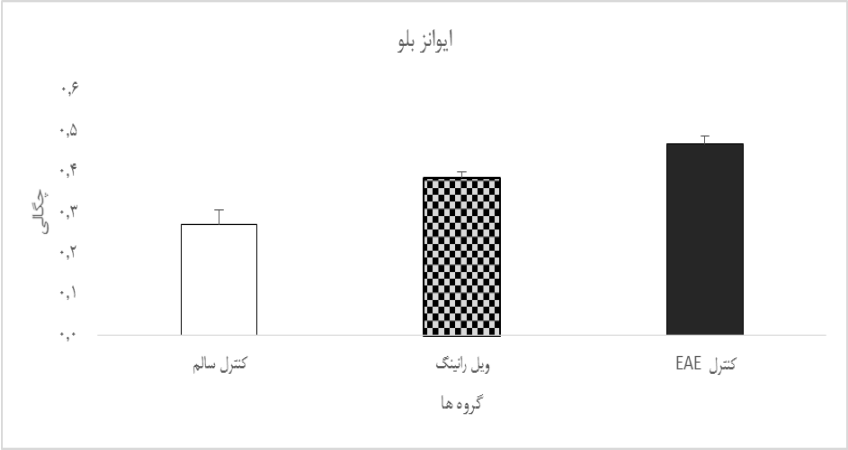
شکل ۲: تغییرات وزن بدن در دوره تمرینی

نمره بالینی تمام موش ها بعد از القاء EAE به مدت ۲۵ روز ثبت شد. بعد از گذشت ۱۰ روز از القاء EAE علائم بالینی شروع به ظاهر شدن نمود. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود روز شروع بیماری هر دو گروه فعالیت اختیاری و اجباری در مقایسه با گروه کنترل EAE به تعویق افتاده و همچنین شدت علائم از ابتدا تا اوج بیماری در گروه های تمرینی کاهش داشته است. این داده ها حاکی از آن است که ۶ هفته فعالیت ورزشی پیشگیرانه می تواند پیشرفت بیماری را به تعویق انداخته و سبب بهبود بیماری شود (P=./۰۰۰۳) (شکل ۳).



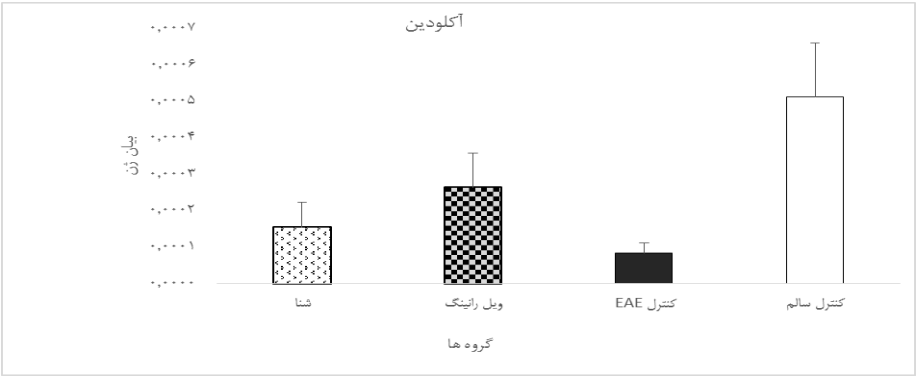
شکل ۳: تغییرات نمره بالینی در ۲۵ روز بعد از القاء EAE. منحنی فعالیت اختیاری و اجباری با منحنی گروه کنترل EAE تفاوت معنا دار دارد.

با بررسی هایی که در رنگ آمیزی ایوانز بلو صورت گرفت و در شکل ۴ قابل مشاهده است، نشان داده شد که نفوذ پذیری کمتری در گروه ویل رانینگ نسبت به گروه بدون تمرین+EAE اتفاق می افتد (P<۰/۰۵)، که این بیانگر اثر تمرین ورزشی اختیاری بر افزایش یکپارچگی سد خونی مغزی می باشد.

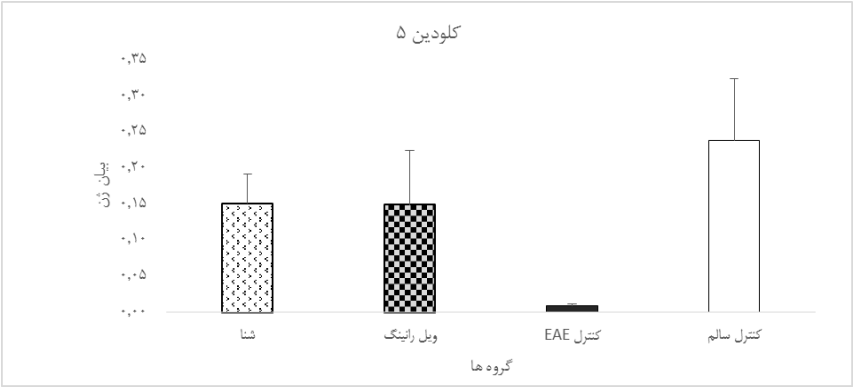


شکل ۴: اثر تمرین ورزشی ویل رانینگ اختیاری بر میزان نفوذپذیری عملکرد سد خونی مغزی

در بررسی های بیان ژن پروتئین اتصالات محکم آکلودین در گروه ویل رانینگ+EAE نسبت به گروه کنترل EAE افزایش معنادار داشت (P<۰/۰۵) و گروه شنا+EAE هم نسبت به گروه کنترل EAE افزایش داشت ولی این افزایش معنا دار نبود و پروتئین کلودین۵ در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل EAE افزایش معنا دار داشت (P<۰/۰۵) (شکل۵ و ۶). افزایش کلودین۵ در هر دو مدل تمرینی شنا و ویل رانینگ به اندازه ای بود که تفاوت آنها با گروه کنترل سالم معنا دار نشد و این نشان می دهد که تمرین توانسته یکپارچگی سد خونی – مغزی را تا حد نمونه های سالم افزایش دهد.



شکل ۵: اثر تمرینات ورزشی بر میزان بیان ژن پروتئین آکلودین



شکل ۶: اثر تمرینات ورزشی بر میزان بیان ژن پروتئین کلودین۵

بحث و بررسی

تحقیق حاضر با هدف تاثیر یک دوره تمرینات ورزشی اجباری و اختیاری قبل از القای EAE بر یکپارچگی سد خونی مغزی و بیان ژن برخی پروتئین های اتصالات محکم اجراشد. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که چهار هفته تمرینات ورزشی شنا و ویل رانینگ شدت علائم EAE را در گروه های تمرینی +EAE کاهش، نفوذ پذیری BBB در گروه تمرین ورزشی ویل رانینگ را نسبت به گروه کنترل EAE کاهش، بیان ژن پروتئین های آکلودین وکلودین۵ در گروه های تمرینی نسبت به گروه کنترل EAE را افزایش و از کاهش وزن موش ها جلوگیری نموده است.

فعالیت ورزشی باعث بهبود عروق مغزی، عملکرد متابولیک و اندوتلیال می شود، که در نتیجه استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی را کاهش، و عملکرد نورونی را بهبود می بخشد (۲۶). بعلاوه فعالیت ورزشی با افزایش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور رشد شبه انسولین ۱ همراه است (۲۶, ۲۷)، که منجر به افزایش غلظت سایتوکین های ضد التهابی IL-10 و کاهش سایتوکین های پیش التهابی IL-1β و TNF-α می شود (۲۸). طبق گفته لین و همکاران[1] (۲۰۱۸) IL-10 خاصیت BBB را بهبود می دهد و باعث کاهش تنظیم منفی بیان کلودین۵ و اختلال اتصالات محکم با اثر ضد آپوپتوز روی سلول های اندوتلیال میکرو وسکولار مغز می شود (۲۹). اگر چه هر دو نمونه ورزشی اجباری و اختیاری ابزار پیش از القای مفیدی برای CNS است، اما برخی از شواهد حاکی از این است که ورزش اجباری بسیار مفیدتر از ورزش اختیاری در محافظت عصبی با تغییر متابولیسم مغز است (۳۰, ۳۱). علاوه بر این، پروتکل های ورزش اجباری امکان دستکاری شدت، مدت زمان و تعداد تکرار برنامه را فراهم می کند و برنامه تمرینات بدنسازی یک انسان را شبیه سازی می کند (۳۲). با این وجود گزارش های متناقضی در مورد اثرات ورزش اجباری در بهبود نتیجه عملکردی وجود دارد. مثلا در گزارشی بیان شده دوره کوتاه مدت تمرینات ورزشی تردمیل اجباری تاثیری بر نمرات بالینی ندارد (۳۳). تفاوت اصلی بین تمرین ورزشی اجباری و اختیاری به میزان استرس ورزش اجباری که به حیوان وارد می کند و متغییر بودن میزان ورزش اختیاری متکی

[1] Lin R et al

است، زیرا در این حال فعالیت مبتنی بر تمایل حیوان برای اجرا است. علاوه بر این مدت زمان روزانه و کل ورزش و همچنین برنامه تمرینی، چه پیشگیری یا درمانی می تواند بر نتایج تاثیر بگذارد و هنگام مقایسه پروتکل های مختلف باید در نظر گرفته شود (۱۵, ۳۴). در این پژوهش همانطور که نمودارهای بیان ژن نشان می دهد (شکل ۵ و ۶) ورزش داوطلبانه تاثیر بیشتری بر بیان ژن آکلودین و کلودین۵ داشت است که احتمالا میزان استرسی که ورزش اجباری می تواند به حیوان وارد کند بر این نتایج تاثیرگذار بوده است.

برای بررسی اینکه آیا یکپارچگی اتصالات اندوتلیال با فعالیت ورزشی پیش از القای EAE می تواند تعدیل شود از رنگ آمیزی ایوانزبلو استفاده شده است. رنگ مربوطه بصورت یکپارچه در ۲۰امین روز بعد از ایمن سازی تزریق شد و برای تمیز کردن رنگ از عروق موش ها به آنها PBS تزریق شد. رنگی که به داخل بافت مغزی نفوذ کرده بود استخراج و اندازه گیری شد (۸). همانطور که در شکل مربوط به رنگ آمیزی ایوانزبلو نشان داده شد نفوذ پذیری BBB در گروه ویل رانینگ نسبت به گروه کنترل EAE کمتر بود.

با توجه به ارتباط بیماری MS با مهاجرت لکوسیت ها به CNS که با تغییرات یکپارچگی BBB همراه است و کاهش حضور سلول های التهابی در بافت مغز موش های EAE تحت تاثیر فعالیت ورزشی، به احتمال زیاد یکی از علل آن کاهش توانایی سلول های التهابی برای مهاجرت از سد خونی–مغزی باشد. این افزایش یکپارچگی سد خونی مغزی می تواند ناشی از افزایش بیان ژن پروتئین های اتصالات محکم باشد. همانطور که در این مطالعه نشان داده شد هر دو ژن آکلودین و کلودین۵ در گروه ویل رانینگ+EAE نسبت به گروه بی تمرین+EAE افزایش معنا دار داشت. از طرفی در گروه تمرینی شنا+EAE نیز هر دو پروتئین آلکودین و کلودین۵ نسبت به گروه بی تمرین+EAE افزایش داشته ولی این افزایش در پروتئین آلکودین در گروه شنا+EAE معنا دار نبود (۸). در پژوهش سوزا و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده شد تمرینات ورزشی قدرتی و استقامتی بیان پروتئین های اتصالات محکم در CNS را تا سطوح پایه دوباره تثبیت می کند (۸).

در برنامه ورزشی اجباری طولانی مدت که توسط برنارلدز و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد نفوذپذیری لکوسیت ها به CNS بطور معناداری کاهش یافت ونمرات بالینی در گروه تمرینی (۳۰ دقیقه شنا، ۵ روز در هفته به مدت ۶ هفته با وزنه ۷٪ وزن بدن که به دم موش آویزان بود) نسبت به گروه بدون تمرین کاهش داشت. همچنین کاهش معنا داری در دمیلینه شدن و آسیب آکسون در گروه تمرینی مشاهده شد (۵). اینستاین و همکاران (۲۰۱۸) بررسی کردند که آیا تمرین ورزشی تردمیل توسعه EAE را با تعدیل سیستماتیک سیستم ایمنی بهبود می بخشد یا اثرات محافظت نورونی مستقیم بر روی CNS اعمال می کند و به این نتیجه رسیدند که تمرین ورزشی پاسخ سیستم ایمنی به یک آنتی ژن خودی را مهار می کند که باعث کاهش EAE می شود، اما اثر مستقیم محافظت نورونی ایجاد نمی کند (۹). در مطالعه روسی و همکاران[1] (۲۰۰۹) گفته شد که ویل رانینگ داوطلبانه نقص های بالینی، دندریتی و سیناپسی در EAE را کاهش می دهد (۳۵). در مطالعه مختارزاده و همکاران اثر نشانگر نفوذپذیری BBB (S100B) و اینترکولین ۱۰ (IL10) و فاکتور نکروز تومور آلفا در تمرینات دوچرخه سواری با ۶۰–۷۰ درصد اوج قدرت بر بیماری MS با وزن طبیعی یا دارای اضافه وزن مورد بررسی قرار گرفت. بطور کلی به این نتیجه رسیدند که تمرینات ورزشی بر نشانگرهای نفوذپذیری BBB و وضعیت فاکتور نروتروفیک در افراد با وزن طبیعی تاثیر دارد اما شرکت کنندگان دارای اضافه وزن نسبت به این اثرات ورزش مقاوم ترند (۱۷).

[1] Rossi S et al

از دیگر تمرینات ورزشی اجباری بر روی EAE کار پژوهشی پاتل و همکاران[1] (۲۰۱۶) بود که نشان داد ۱۰ روز تمرین ورزشی تردمیل توده عضله ای اسکلتی را در مراحل اولیه ناتوانی افزایش می دهد (۳۶). در تمرینات با شدت بالا که توسط ونز و همکاران[2] (۲۰۱۵) انجام شد ورزش قادر به جلوگیری از آتروفی تار عضلانی نبود (۳۷). در مطالعه آنها اثر ورزش تردمیل با شدت پیشرونده بر علائم EAE مثبت نبود.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که نمرات بالینی در هر دو گروه تمرینی نسبت به همتایان بدون تمرین کاهش داشت و در واقع ورزش توانست از پیشرفت علائم EAE جلوگیری کند. بطور مشابه بنسون و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که موشهای EAE که ۱ ساعت در روز دسترسی به ویل رانینگ داوطلبانه داشتند تاخیر در شروع علائم بالینی و بهبود زودرس حساسیت به درد در بیماری داشتند (۲۰). و همینطور در پژوهش برناردز وهمکاران نشان داده شد که تمرین ورزشی شنای اجباری ۶ هفته پیش از القاء باعث کاهش نمرات بالینی EAE مزمن می شود (۵). این در حالیست که در مطالعه ای که توسط میفیلین و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد به نتایج ضد و نقیضی رسیدند؛ آنها اثر ۱ ساعت در روز برای ۳۰ روز پیاپی ویل رانینگ داوطلبانه را بر موش های نر و ماده بررسی کردند. نمرات بالینی در موش های نر با EAE که می دویدند کاهش داشت در حالیکه در موش های ماده این اثر دیده نشد (۳۸). اما در مطالعه روسی و همکاران (۲۰۰۹) ویل رانینگ داوطلبانه نمرات بالینی را در مرحله حاد و مزمن بیماری کاهش داد (۳۵). در مطالعه ای که پتل و وایت انجام دادند دویدن تردمیل اجباری پیشرونده تاثیر معنا داری بر نمرات بالینی نداشت (۳۹).

در این مطالعه ما شاهد بودیم که از کاهش وزن هر دو گروه تمرینی+EAE نسبت به گروه کنترل EAE جلوگیری شد (شکل۲). درحالیکه ناهمسو با مطالعه ما پیچ و همکاران[3] (۱۹۹۴) نشان دادند که وزن بدن بین موش های گروه کنترل و تمرینی تفاوت معناداری ندارد، برنامه تمرینی آنها دویدن روی تردمیل با سرعت ۱۵–۳۰ متر در دقیقه به مدت ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه بود با وجودی که آنها اثر ورزش را بعنوان یک استرس که باعث تشدید بیماری می شود بررسی می کردند به این نتیجه رسیدند که تمرین نه تنها نشانه های EAE را تشدید نمی کند بلکه روند پیشرفت بیماری را به تاخیر می اندازد (۳۳).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما به این نتیجه رسیدیم که بیان ژن دو پروتئین آکلودین و کلودین۵ که از مهمترین پروتئین های اتصالات محکم هستند با هر دو مدل تمرینی شنای اجباری و ویل رانینگ داوطلبانه افزایش یافت و درنتیجه یکپارچگی سد خونی مغزی در بافت مغز موش ها بهبود یافت همانطور که در شکل ۶ مشخص است افزایش کلودین۵ بر اثر انجام هر دو مدل تمرینی شنا و ویل رانینگ به اندازه ای بود که تفاوت آنها با گروه کنترل سالم معنا دار نشد و این نشان می دهد که تمرین توانسته بیان ژن کلودین۵ را در حد نمونه های سالم افزایش دهد. و مطابق رنگ آمیزی ایوانزبلو میزان کمتری از نفوذ پذیری BBB رخ داد. این نتیجه علاوه بر اینکه در بیماران مبتلا به MS ایجاد انگیزه می کند که در برنامه های تمرینی ورزشی منظم شرکت کنند به سایر بیماران سیستم عصبی مانند آسیب مغزی، سکته ایسکمیک مغزی،صرع، پارکینسون، آلزایمر و افسردگی شدید، که بیماری آنها نیز مرتبط با نفوذ پذیری سد خونی مغزی است نوید بهبود با انجام فعالیت ورزشی می دهد (۴۰). با یافته های ما به نظر می

[1] Patel D et al
[2] Wens I et al
[3] Le Page et al

رسد فعالیت ویل رانینگ داوطلبانه اثر بیشتری بر بهبود علائم ام اس دارد. که شاید یکی از دلایل آن سطح استرس بالاتر در تمرینات شنای اجباری باشد (۲۵) به طور خلاصه می توان گفت ورزش می تواند درمانی مکمل برای بهبود وضعیت مبتلایان به ام اس باشد.

منابع

1. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nature immunology. 2007;8(9):913-9.
2. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nature Reviews Immunology. 2009;9(6):393-407.
3. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmunity reviews. 2010;9(5):A387-A94.
4. Bagert B, Camplair P, Bourdette D. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. CNS drugs. 2002;16(7):445-55.
5. Bernardes D, Brambilla R, Bracchi- Ricard V, Karmally S, Dellarole A, Carvalho-Tavares J, et al. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of neurochemistry. 2016;136:63-73.
6. Almutairi MM, Gong C, Xu YG, Chang Y, Shi H. Factors controlling permeability of the blood–brain barrier. Cellular and molecular life sciences. 2016;73(1):57-77.
7. Reinhold A, Rittner H. Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 2017;469(1):123-34.
8. Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, et al. Physical exercise attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting peripheral immune response and blood-brain barrier disruption. Molecular neurobiology. 2017;54(6):4723-37.
9. Kileff J, Ashburn A. A pilot study of the effect of aerobic exercise on people with moderate disability multiple sclerosis. Clinical rehabilitation. 2005;19(2):165-9.
10. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, Andjelkovic AV. Junctional proteins of the blood-brain barrier: new insights into function and dysfunction. Tissue barriers. 2016;4(1):e1154641.
11. Jia J, Meng R, Sun Y, Sun W, Ji X, Jia L. Cerebrospinal fluid tau, Aβ1–42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. Neuroscience Letters. 2005;383(1-2):12-6.
12. Raleigh DR, Boe DM, Yu D, Weber CR, Marchiando AM, Bradford EM, et al. Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. Journal of Cell Biology. 2011;193(3):565-82.
13. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. The Journal of cell biology. 1996;134(4):1031-49.
14. Greene C, Campbell M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. Tissue barriers. 2016;4(1):e1138017.
15. Klaren RE, Motl RW, Woods JA, Miller SD. Effects of exercise in experimental autoimmune encephalomyelitis (an animal model of multiple sclerosis). Journal of neuroimmunology. 2014;274(1-2):14-9.
16. Kalron A, Nitzani D, Magalashvili D, Dolev M, Menascu S, Stern Y, et al. A personalized, intense physical rehabilitation program improves walking in people with

multiple sclerosis presenting with different levels of disability: a retrospective cohort. BMC neurology. 2015;15(1):21.
17. Mokhtarzade M, Motl R, Negaresh R, Zimmer P, Khodadoost M, Baker JS, et al. Exercise-induced changes in neurotrophic factors and markers of blood-brain barrier permeability are moderated by weight status in multiple sclerosis. Neuropeptides. 2018;70:93-100.
18. White LJ, Castellano V. Exercise and brain health—implications for multiple sclerosis. Sports medicine. 2008;38(2):91-100.
19. Einstein O, Fainstein N, Touloumi O, Lagoudaki R, Hanya E, Grigoriadis N, et al. Exercise training attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunomodulation rather than direct neuroprotection. Experimental neurology. 2018;299:56-64.
20. Benson C, Paylor JW, Tenorio G, Winship I, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Experimental neurology. 2015;271:279-90.
21. Gentile A, Musella A, De Vito F, Rizzo FR, Fresegna D, Bullitta S, et al. Immunomodulatory Effects of Exercise in Experimental Multiple Sclerosis. Frontiers in immunology. 2019;10.
22. Torabimehr F, Kordi MR, Nouri R, Ai J, Shirian S. The Role of Forced and Voluntary Training on Accumulation of Neural Cell Adhesion Molecule and Polysialic Acid in Muscle of Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020;2020.
23. Shahidi SH, Kordi MR, Rajabi H, Malm C, Shah F, Quchan ASK. Exercise modulates the levels of growth inhibitor genes before and after multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology. 2020;341:577172.
24. Ayatollahi AM, Haji Molla Hoseini M, Ghanadian SM, Kosari-Nasab M, Mami F, Yazdiniapoure Z, et al. TAMEC: a new analogue of cyclomyrsinol diterpenes decreases anxiety-and depression-like behaviors in a mouse model of multiple sclerosis. Neurological research. 2017;39(12):1056-65.
25. Barati S, Ragerdi Kashani I, Moradi F, Tahmasebi F, Mehrabi S, Barati M, et al. Mesenchymal stem cell mediated effects on microglial phenotype in cuprizone- induced demyelination model. Journal of cellular biochemistry. 2019;120(8):13952-64.
26. Phillips C, Akif Baktir M, Das D, Lin B, Salehi A. The link between physical activity and cognitive dysfunction in Alzheimer disease. Physical Therapy. 2015;95(7):1046-60.
27. Jensen CS, Hasselbalch SG, Waldemar G, Simonsen AH. Biochemical markers of physical exercise on mild cognitive impairment and dementia: systematic review and perspectives. Frontiers in neurology. 2015;6:187.
28. Ziemann E, Zembroñ-Lacny A, Kasperska A, Antosiewicz J, Grzywacz T, Garsztka T, et al. Exercise training-induced changes in inflammatory mediators and heat shock proteins in young tennis players. Journal of sports science & medicine. 2013;12(2):282.
29. Lin R, Chen F, Wen S, Teng T, Pan Y, Huang H. Interleukin-10 attenuates impairment of the blood-brain barrier in a severe acute pancreatitis rat model. Journal of Inflammation. 2018;15(1):1-12.
30. Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. Acta neuropathologica. 2008;115(3):289-96.
31. Kinni H, Guo M, Ding JY, Konakondla S, Dornbos III D, Tran R, et al. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. Brain research. 2011;1388:48-55.

32. Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. Neuroscience. 2011;177:170-6.
33. Le Page C, Ferry A, Rieu M. Effect of muscular exercise on chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of applied physiology. 1994;77(5):2341-7.
34. Brown DA, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Caruso NM, Ehlers LB, et al. Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? Journal of applied physiology. 2007;103(6):1979-85.
35. 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.
36. 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.
37. Wens I, Dalgas U, Verboven K, Kosten L, Stevens A, Hens N, et al. Impact of high intensity exercise on muscle morphology in EAE rats. Physiological research. 2015;64(6):907.
38. Mifflin KA, Frieser E, Benson C, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running differentially affects disease outcomes in male and female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of neuroimmunology. 2017;305:135-44.
39. Patel DI, White LJ. Effect of 10-day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2013;38(2):194-9.
40. Małkiewicz MA, Szarmach A, Sabisz A, Cubała WJ, Szurowska E, Winklewski PJ. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. Journal of neuroinflammation. 2019;16(1):15.

The Effect of Forced and Voluntary Exercise before Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on the Integrity of the Blood-Brain Barrier and Gene Expression of Some of Tight Junction Proteins

Marziye Yaghoubi, Mohammad Reza Kordi*, Abbasali Gaeini.

Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

***Corresponding author**: mrkordi@ut.ac.ir

Abstract

Background and Purpose: Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease of the central nervous system. The animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), is commonly used for studies of human inflammatory demyelinating diseases. The present study was conducted to determine the impact of forced swimming and voluntary wheel running exercises before the induction of EAE on expression of occludin and cloudin5 genes in the brain tissue.

Methodology: 48 C57BL / 6 mice randomly divided into four groups (n=12): Forced Swimming + EAE, voluntary wheel running + EAE, NoEX-EAE, and control group. Animals performed either swimming exercise for 30 min per day or wheel running for one hour per day, five days per week for four weeks. Data were analyzed using SPSS16 software. One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test were applied. P-values of ≤0.05 were considered statistically significant.

Results: Evans Blue's staining showed that the permeability of the blood-brain barrier in wheel running was significantly lower than in EAE without exercise. Clinical scores on both EAE + exercise groups decreased compared to the EAE group, and exercise prevented body weight loss, and the expression of the Alocudine and Claudine 5 protein genes in both EAE exercise groups increased compared to the EAE group.

Conclusion: The forced and voluntary exercises appear to increase the gene expression of the two proteins occludin and cloudin5, thereby improving the integrity of the blood-brain barrier in the brain tissue of mice.

Key words: Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Forced and Voluntary Exercise, Blood-Brain Barrier, Tight Junction Proteins