

## Original Article

# The impact of voluntary swimming activity on the levels of certain proteins associated with the myelination of hippocampal tissue in rats with cuprizone-induced model of multiple sclerosis

Mohammad Rami \*, Samaneh Rahdar, Sayed Shafa Marashi, Abdolhamid Habibi

Assistant professor, Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

## Abstract

**Background and Purpose:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, autoimmune, and multi-factorial disease that substantially reduces patients' quality of life. Since physical activity may offer anti-inflammatory and axonal protection benefits to these patients, this study aims to explore the impact of swimming physical activity on the content of particular proteins critical for the myelination of hippocampal tissue in cuprizone-induced rat's model of MS.

**Materials and Methods:** In the current investigation, a cohort of 20 male Wistar rats with an average age of 12 weeks and the weight is 230 grams purchased and was divided into four groups: healthy control, MS control, healthy training, and MS training. The MS disease model was induced by administering food containing 0.5% cuprizone throughout the entire 12-week research protocol. Upon confirming MS induction through the rotarod test, rats underwent a six-week voluntary swimming protocol. In this way, in the first week, they did 10 minutes of voluntary swimming activity without applying loads, and in order to apply overload, the duration of voluntary swimming was added every week by 5 minutes. In order to maintain the adaptations achieved in the activity, the duration of the swimming activity in the fifth and sixth weeks was considered constant and 30 minutes. After the end of the training protocol, Memory and balance were assessed via shuttle box and rotarod tests. Subsequently, the hippocampal tissue was extracted, and PLP and MBP protein levels were measured using western blot and the amount of NGF protein was measured using the ELISA method. The data were analyzed by one-way ANOVA test and then Tukey's post hoc test at a significance level of less than 0.05.

**Results:** The findings of the shuttle box and rotarod experiments revealed that the MS group had impaired memory function and balance maintenance, but these improved significantly after a period of swimming activity ( $p < 0.001$ ). Also, no significant difference was observed in the results of the shuttle box and rotarod tests in the healthy training and healthy control groups ( $p > 0.05$ ). The results of the present study showed that the content of NGF, PLP and MBP proteins in the patient control group significantly decreased compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ). Also, the results showed that the amounts of these proteins increased significantly in the MS training group compared to the MS control group ( $p < 0.05$ ). The results showed that there is a significant difference in the content of NGF and PLP proteins between healthy training group and healthy control group ( $p < 0.05$ ). While there is no significant difference in MBP protein content between the healthy training and healthy control groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** Based on the current research findings, it can be assumed that swimming exercise activity has notable anti-inflammatory and neuroprotective effects by creating molecular adaptations, and it can probably be considered as a safe, non-pharmacological and complication-free method to improve the symptoms of MS sufferers.

**Keywords:** Voluntary Swimming, Multiple Sclerosis, Molecular adaptation, inflammatory disease, Myelination

**How to cite this article:** Rami M, Rahdar S, Marashi S, Habibi A. The impact of voluntary swimming activity on the levels of certain proteins associated with the myelination of hippocampal tissue in rats with cuprizone-induced model of multiple sclerosis. *J Sport Exerc Physiol*. 2024;17(1):?-?.

\*Corresponding Author's E-mail: M.rami@scu.ac.ir

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

۱۴۰۳، دوره ۱۷، شماره ۱

مقاله پژوهشی

## اثر فعالیت شنای اختیاری بر محتوای برخی پروتئین های مرتبط با میلین سازی بافت هیپوکمپ رت های مدل مالتیپل اسکلروزیس

محمد رمی\*، سمانه راهدار، سید شفا مرعشی، عبدالحمید حبیبی

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری مزمن التهابی، خود ایمنی و چند عللی است که کیفیت زندگی مبتلایان را تا حد قابل توجهی کاهش می دهد. از آنجا که فعالیت بدنی ممکن است دارای فواید ضد التهابی و حفاظت از آکسون در این بیماران باشد، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر فعالیت بدنی از نوع شنا بر محتوای برخی از پروتئین های مؤثر در میلین سازی بافت هیپوکمپ موش های صحرایی مبتلا به بیماری MS القاء شده با کوپریزون است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سن ۱۲ هفته و وزن ۲۳۰ گرم خریداری و به چهار گروه کنترل سالم، کنترل بیمار، سالم تمرین و تمرین بیمار تقسیم شدند. مدل بیماری MS با استفاده از غذای محتوی کوپریزون ۰/۵ درصد در تمام ۱۲ هفته طول پروتکل تحقیق ایجاد شد. پس از تایید القاء MS توسط تست روتارود، پروتکل شنای اختیاری به مدت شش هفته انجام شد. بدین صورت که در هفته اول ۱۰ دقیقه فعالیت شنا را به صورت اختیاری و بدون اعمال بار انجام دادند و به جهت اعمال اضافه بار مدت زمان شنای اختیاری در هر هفته ۵ دقیقه اضافه شد. جهت حفظ سازگاری های حاصل شده در فعالیت، مدت زمان فعالیت شنا در هفته های پنجم و ششم ثابت و ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از پایان پروتکل تمرینی و انجام آزمون های روتارود و شاتل باکس به منظور بررسی حافظه و تعادل، بافت هیپوکمپ استخراج و مقادیر پروتئین های PLP و MBP با استفاده از روش وسترن بلات و مقدار پروتئین NGF با استفاده از روش الایزا اندازه گیری شد. داده ها به وسیله آزمون آنوای یک راهه و سپس آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری کوچکتر از ۰/۰۵ بررسی شد.

**نتایج:** نتایج آزمون‌های شاتل باکس و روتارود نشان داد که عملکرد حافظه و حفظ تعادل در گروه بیمار دچار اختلال شده و متعاقب یک دوره فعالیت شنا بهبود قابل توجهی یافت ( $p < 0.001$ ). همچنین تفاوت معنی داری در نتایج آزمون‌های شاتل باکس و روتارود در گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محتوای پروتئین‌های NGF، PLP و MBP در گروه کنترل بیمار به صورت معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان داد که مقادیر این پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به صورت قابل توجهی افزایش نشان داد ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد که در محتوای پروتئین‌های NGF و PLP تفاوت معنی داری بین گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم وجود دارد ( $p < 0.05$ ). در حالی که در محتوای پروتئین MBP تفاوت معنی داری بین گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم وجود ندارد ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج تحقیق حاضر احتمالاً می‌توان گفت که فعالیت ورزشی از نوع شنا با ایجاد سازگاری‌های مولکولی، اثرات ضد التهابی و محافظت‌کننده عصبی قابل توجهی داشته باشد و احتمالاً می‌تواند به عنوان یک روش ایمن، غیر دارویی و بدون عارضه برای بهبود علائم مبتلایان به MS در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** شنای اختیاری، بیماری MS، سازگاری مولکولی، بیماری التهابی، میلین سازی

**نحوه استناد به این مقاله:** رمی م، راهدار س، مرعی س، حبیبی ع. اثر فعالیت شنای اختیاری بر محتوای برخی پروتئین‌های مرتبط با میلین سازی بافت هیپوکمپ رت‌های مدل مالتیپل اسکلروزیس. نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی. ۱۴۰۳؛ ۱۷(۱): ۱-۴.

\*رایانامه نویسنده مسئول: M.rami@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

## مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری مزمن التهابی، خود ایمنی و چند عللی است. تخمین زده می‌شود ۲٫۸ میلیون نفر در سراسر جهان به MS مبتلا هستند که از بابت هزینه و زمان، بار قابل توجهی به سیستم بهداشت و درمان تحمیل می‌کند (۱). پاتولوژی این بیماری کاملاً مشخص نیست؛ اما پاسخ نامتعرف سیستم ایمنی، التهاب دستگاه عصبی مرکزی (CNS)، میلین زدایی، تخریب آکسون و همچنین تلاش الیگودندروسیت‌ها برای دوباره سازی غلاف میلین از ویژگی‌های بارز این بیماری است (۲). با توجه به اینکه هر بخشی از CNS ممکن است درگیر این بیماری شود، احتمال ایجاد علائم و شکایات بالینی گسترده و متفاوتی وجود دارد (۳) که کیفیت زندگی مبتلایان را تا حد قابل توجهی کاهش می‌دهد و آن را دشوار می‌سازد. در زمان حمله‌های ناگهانی بیماری، سطوح فاکتور

1. Multiple Sclerosis

رشد عصب (NGF) در مایع مغزی نخاعی بیماران (نسبت به افراد سالم) افزایش پیدا می‌کند که نشانگر تلاش تقریباً همه‌ی سلول‌های عصبی ساکن در محل (۴)، برای حفاظت از CNS در برابر التهاب و میلین‌زدایی می‌باشد (۵). NGF زیرگروه خانواده‌ی نوروتروفین‌هاست (۶) که با تحریک ساخت اینترلوکین ۱۰ (IL-10) توسط سلول‌های گلیا و T، و کاهش ساخت اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) اثرات ضد التهابی ایجاد می‌کند (۷). از دیگر اثرات مهم و مثبت NGF می‌توان به کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی (BBB)، تغییر فنوتیپ لنفوسیت‌ها به حالت ضد التهابی با تولید سایتوکاین‌های سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی (IL-10 و TGF- $\beta$ )، تعدیل سیستم ایمنی با تاثیر غیر مستقیم بر کاهش تکثیر سلول‌های ایمنی CD4+ و CD8+، کاهش در ارائه‌ی آنتی‌ژن توسط ماکروفاژها و میکروگلیاها با کاهش بیان مولکول‌های مجموعه‌ی سازگاری بافتی اصلی (MHC)، تبدیل فنوتیپ ماکروفاژهای التهابی M1 به ماکروفاژهای ضد التهابی M2، کاهش آستروگلیوسیز و تغییر فنوتیپ آستروسیت‌ها از نوع التهابی A1 به نوع ضد التهابی A2، افزایش تکثیر و بلوغ و بقای سلول‌های نیای الیگودندروسیت (OPC) و افزایش بازسازی، بقا و محافظت از آکسون‌ها اشاره کرد (۶). به علاوه NGF می‌تواند باعث تحریک ساخت فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) شود (۸) که تاثیر آن در بازسازی غلاف میلین در ام اس ثابت شده است (۹). همچنین نشان داده شده است که NGF می‌تواند بیان پروتئین‌های ساختاری میلین از جمله MBP، PLP و MAG را در الیگودندروسیت‌ها تنظیم کند (۸). نقش ساختاری پروتئین پایه‌ای میلین (MBP)، نزدیک کردن دو برگ میلین روبروی هم و تشکیل یک غلاف مترام (۱۰) و نقش عملکردی آن ارتباط با بیان بعضی پروتئین‌های مرتبط با میلین و تنظیم میلین‌سازی است (۱۱). از MBP می‌توان به عنوان نشانگر مناسبی برای تأیید دوباره سازی میلین استفاده کرد (۱). به طور مشابه سطوح بالای از پروتئین پروتئولپیدی (PLP) برای حفظ یکپارچگی غلاف میلین مورد نیاز است و حتی تغییرات کوچک در اندازه، تعادل و نسبت بین پروتئین‌های غلاف میلین می‌تواند منجر به تخریب ساختار میلین شود (۱۰). بیماران مبتلا به ام اس سطوح بالایی از پاسخ آنتی‌بادی در برابر MBP و PLP را نشان می‌دهند (۶، ۱۲). تاثیر فعالیت ورزشی بر افزایش سطوح نوروتروفین‌ها، افزایش تعداد الیگودندروسیت‌ها، افزایش پروتئین‌های ساختاری میلین، دوباره سازی میلین، کاهش التهاب و حفاظت از آکسون در مطالعات متعدد نشان داده شده است (۱۳). هرچند پژوهش‌هایی وجود دارند که این موارد را گزارش نکرده اند؛ عدم رخداد این فواید معمولاً به کم بودن حجم یا شدت تمرین استفاده شده در این مطالعه‌ها نسبت داده می‌شود (۱۳). فواید مثبت فعالیت‌هایی مثل تمرینات تناوبی پر شدت (HIIT)، مقاومتی و هوازی بر بهبود شکایات و علائم بالینی بیماری ام اس به شکل گسترده نشان داده شده است (۱۴-۱۷)؛ اما نتایج یک پژوهش متاآنالیز نشان می‌دهد که انجام توامان تمرینات مقاومتی و هوازی (به صورت جلسات مجزا) در طول یک دوره‌ی تمرینی می‌تواند در بهبود علائم مبتلایان موثرتر عمل کند (۱۸). از طرفی طبق شواهد علمی، ورزش شنا در مقایسه با دیگر فعالیت‌ها می‌تواند با ایجاد سازگاری‌های مولکولی، اثرات ضد التهابی و محافظت‌کننده از عصب بیشتری داشته باشد؛ که احتمالاً به دلیل ماهیت ترکیبی هوازی-مقاومتی و به کارگیری واحدهای حرکتی بزرگتر و درگیر کردن همزمان همه‌ی گروه عضلات اصلی در این نوع ورزش است (۱۹، ۲۰). این ویژگی‌ها می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان و بی‌نیاز کردن مبتلایان از انجام دو یا چندین ورزش جداگانه شود. شنا در مقابل انواع دیگری از فعالیت ورزشی، مانند دویدن، فشار حداقلی را به مفاصل وارد کرده و به افرادی که از درد مفاصل، آسیب‌دیدگی یا پوکی استخوان رنج می‌برند اجازه می‌دهد تا به طور ایمن و مؤثر ورزش کنند. شنا، همچنین با افزایش جریان خون

1. Nerve growth factor

2. Interleukin 10

3. Interferon gamma

4. Blood-brain barrier

5. Transforming growth factor beta

6. Major histocompatibility complex

7. Oligodendrocyte progenitor cells

8. Brain-derived neurotrophic factor

9. Myelin basic protein

10. proteolipid protein

11. High-intensity interval training<sup>1</sup>

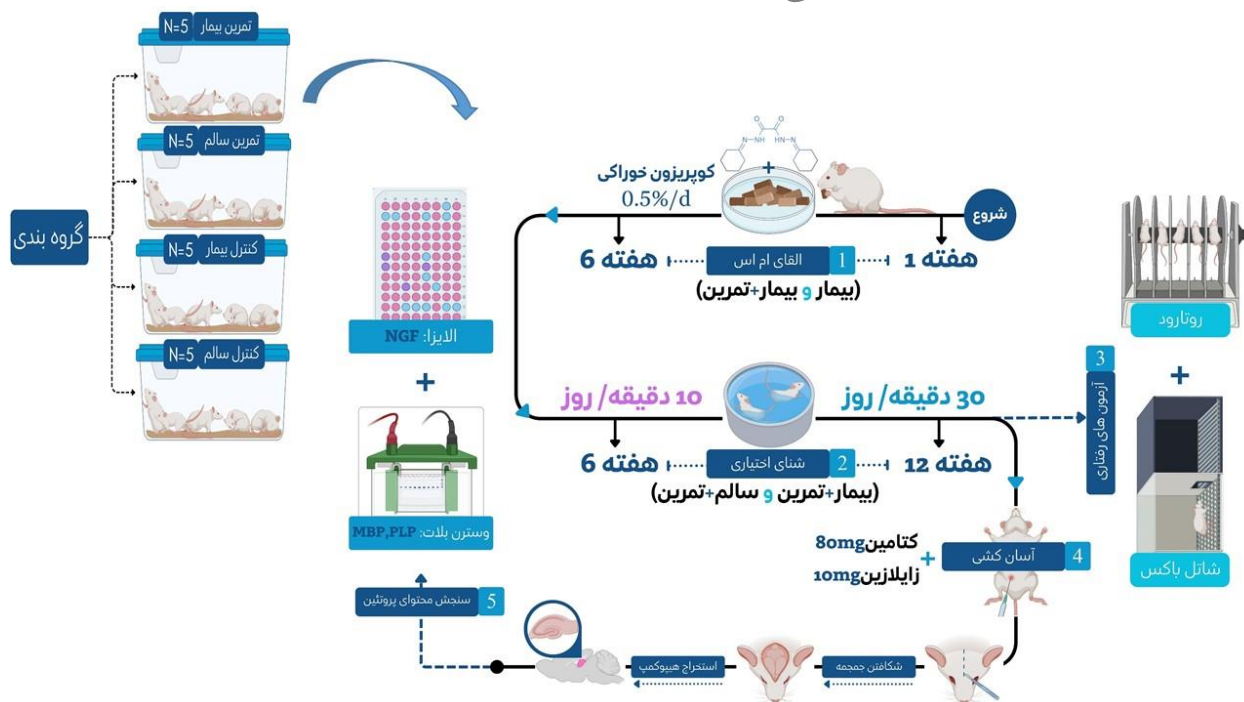
بدن به توزیع گرما کمک، از افزایش دمای مرکزی بدن و خستگی جلوگیری کرده، سفتی عضلات را کاهش و به بیمار اجازه می‌دهد که راحت‌تر از خشکی و برای مدت طولانی تری به فعالیت بپردازد. پژوهش‌ها در سال‌های اخیر به این مسئله اشاره دارند که میلیون‌زدایی نه تنها در بخش سفید، بلکه در بخش خاکستری دستگاه عصبی از جمله قشر مخ، هیپوکمپ و مخچه نیز رخ می‌دهد (۲۱). از میان این نواحی، هیپوکمپ نقش بارزی در فرآیند یادگیری، حافظه فضایی و تثبیت حافظه کوتاه‌مدت به حافظه بلندمدت ایفا می‌کند (۲۳، ۲۴). به دلیل اینکه بیماران مبتلا به MS به طور معمول با مشکلات شناختی، اغلب به شکل اختلالات حافظه اپیزودیک و افسردگی مواجه هستند که ممکن است ناشی از تغییرات پاتوفیزیولوژیک در هیپوکمپ باشد (۲۵-۲۷). این ناحیه به عنوان هدف اصلی مطالعه حاضر انتخاب شد. ما در این مطالعه در پی پاسخ به این پرسش هستیم که آیا فعالیت شنای اختیاری به عنوان یک روش غیر دارویی می‌تواند موجب تعدیل تغییرات ناشی از بیماری MS در CNS، به خصوص هیپوکمپ شود؟ لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته فعالیت شنای اختیاری بر میزان پروتئین‌های NGF، MBP، و PLP در بافت هیپوکمپ رت‌های مدل ام اس القا شده با کوپریزون می‌باشد.

## روش پژوهش

**نمونه‌های پژوهش:** پژوهش حاضر با استفاده از ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با میانگین سن ۱۲ هفته و وزن ۲۳۰ گرم که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری شدند، انجام شد. در ابتدا به منظور سازگاری با محیط انجام آزمایش، رت‌ها به مدت دو هفته در خانه حیوانات دانشکده دام‌پزشکی با دمای ۲۰ الی ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد، تهویه مناسب و ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذا (پلت مخصوص جوندگان - پارس، تهران) دسترسی داشتند. پس از آشنایی با نحوه فعالیت در استخر مخصوص جوندگان، رت‌ها به شکل تصادفی به چهار گروه پنج تایی، در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف تقسیم شدند. شرح گروه بندی بدین شکل بود: کنترل سالم، کنترل بیمار، بیمار تمرین، سالم تمرین. در مرحله آشنا سازی تمرین پذیری رت‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت که تمامی رت‌ها قادر به انجام فعالیت شنای اختیاری بودند. تمامی مراحل تحقیق حاضر به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید و با شناسه IR.SCU.REC.1402.066 به ثبت رسید. طرح شماتیک پروتکل تحقیق در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است.

**روش اجرای پژوهش:** برای القای بیماری ام‌اس، کوپریزون با نسبت وزنی ۰/۵ درصد به پودر غذای مخصوص جوندگان اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس با اضافه کردن آب، خمیر بدست آمده به پلت غذایی تبدیل شد و به مدت ۶ هفته در اختیار آزمودنی‌ها قرار گرفت (۲۸). بر اساس مطالعات پیشین و با استفاده از آزمون روتارود، زمانی در محدوده ۹۱ ثانیه به عنوان نمونه مبتلا به MS در نظر گرفته می‌شود (۲۹). آزمون‌های بررسی حافظه و حفظ تعادل: پس از پایان دوره پروتکل تمرینی به منظور ارزیابی هماهنگی و تعادل و حافظه احترازی از آزمون‌های روتارود و شاتل باکس استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در دوره‌ی روشنایی فعالیت رت‌ها و میان ساعات ۹ صبح الی ۱۲ ظهر انجام شدند (۳۰). در آزمون روتارود که به منظور سنجش تعادل و هماهنگی بین اندام‌های حرکتی در جوندگانی مانند رت استفاده می‌شود، یک گردانه (روی میله افقی چرخنده) با حدود ۲۰ سانتی‌متر فاصله از زمین که با صفحات کروی به ۴ بخش جدا از هم تقسیم می‌شود، بخش متحرک دستگاه را تشکیل می‌دهد. در این آزمون سرعت چرخیدن گردانه 7 rpm در نظر گرفته شده که تقریباً ۱۱-۱۰ دور در دقیقه است. برای ارزیابی تعادل، رت بر روی گردانه در حال چرخش که سرعت آن در مدت ۳۰۰ ثانیه، از ۵ به ۴۵ دور در دقیقه افزایش داده می‌شود، قرار گرفت و مدت زمان حفظ تعادل و باقی ماندن بر روی میله، به طور جداگانه برای هر آزمودنی ثبت گردید. برای آموزش و یادگیری مهارت حرکت، ابتدا هر کدام از رت‌ها دو بار بر روی گردانه قرار گرفتند و فرصت سازگاری با دستگاه به آن‌ها داده شد و سپس سه مرتبه‌ی دیگر روی گردانه قرار گرفته (هر بار ۵ دقیقه بافاصله‌ی ۱۵ دقیقه) و میانگین آن‌ها بر حسب ثانیه ثبت شد (۳۱). مطالعات متعدد همزمانی اثرگذاری کوپریزون در ایجاد آپوپتوز، میلین زدایی و اختلال حرکتی را با کاهش زمان تاخیر افتادن آزمودنی از روی گردانه‌ی دستگاه روتارود و روایی این آزمون را تأیید می‌کنند (۳۲). بنابراین

می‌توان از آزمون روتارود به عنوان نشانه‌ی تأیید القاء ام‌اس استفاده کرد. در آزمون شاتل باکس که شامل یک دستگاه با دو بخش تاریک و روشن، و یک درب که دو بخش را از هم جدا می‌کند است، آزمودنی در بخش تاریک، شوک دریافت می‌کند. مراحل این آزمون شامل یک بخش آشناسازی (به منظور آشنایی حیوان با دستگاه و بدون دریافت شوک) و ۳ بخش آموزش، آزمون و یادآوری است. در مرحله آموزش، ۲۴ ساعت بعد از بخش آشناسازی، پس از ۱۰ ثانیه سپری شدن از قرار دادن آزمودنی در درون دستگاه، درب بین دو محفظه باز شده و به حیوان اجازه ورود به بخش تاریک داده می‌شود. به محض ورود آزمودنی به بخش تاریک درب بسته شده و شوک با فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی آمپر و برای ۲ ثانیه به پای آزمودنی اعمال شده و پس از سپری شدن ۲۰ ثانیه به قفس بازگردانده می‌شود. در مرحله آزمون، ۲ دقیقه پس از مرحله آموزش، آزمودنی مجدداً در بخش روشن قرار داده شده و اگر دوباره به بخش تاریک وارد شود شوک دریافت خواهد کرد. حداکثر مدت زمان باقی ماندن موش در ناحیه تاریک ۳۰۰ ثانیه می‌باشد. در صورتی که آزمودنی وارد بخش تاریک نشود تعداد دفعات دریافت شوک ثبت خواهد شد و در صورت عدم ورود به بخش تاریک، آزمودنی از آمایش حذف می‌شود. در مرحله یادآوری، ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش، به منظور تست به یادآوری و حافظه بلند مدت، آزمودنی در محفظه‌ی روشن قرار گرفته و مانند مراحل گذشته، درب ۱۰ ثانیه بعد از قرارگیری در ناحیه روشن، باز شده با این تفاوت که به آزمودنی شوکی وارد نخواهد شد. مدت زمان تاخیر در ورود به بخش تاریک و زمان سپری شده در بخش تاریک به عنوان شاخص‌های حافظه بلندمدت اندازه‌گیری می‌شوند. زمان باقی ماندن در هر بخش تاریک و روشن نهایتاً ۳۰۰ ثانیه می‌باشند (۳۳).



شکل ۱. طرح شماتیک از گروه‌بندی، نحوه‌ی القاء ام‌اس با کوپریزون، آزمون‌های رفتاری، پروتکل تمرین شنای اختیاری، آسان‌کشی، استخراج بافت و سنجش پروتئین‌ها با روش وسترن بلات و الایزا.

پروتکل تمرینی: پس از تأیید القاء ام‌اس و وجود بیماری، پروتکل تمرین شنای اختیاری در استخر مخصوص جواندگان، به مدت ۶ هفته انجام شد. پروتکل تمرینی برگرفته از مطالعه‌ی کیم و همکاران در سال ۲۰۲۰ با اندکی تغییر (رعایت اصل اضافه‌بار تمرینی) است. رت‌های گروه‌های تمرین، یک‌بار در روز به مدت ۶ هفته شنا کردند (۳۴). به این صورت که در هفته اول ۱۰ دقیقه فعالیت شنا

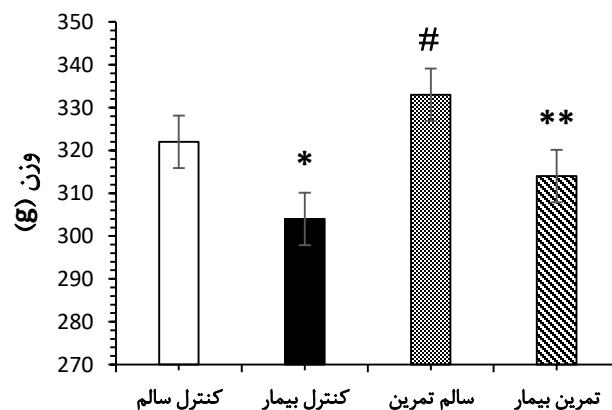
را انجام دادند و در هفته های دوم و سوم و چهارم به ترتیب ۱۵ و ۲۰ و ۲۵ دقیقه شنا کردند. جهت حفظ سازگاری های حاصل شده در فعالیت، مدت زمان فعالیت شنا در هفته های پنجم و ششم ثابت و ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

**روش های آزمایشگاهی:** به منظور سنجش محتوای پروتئین های MBP و PLP از روش وسترن بلات و برای سنجش مقدار پروتئین NGF، از روش الایزا استفاده شد. در روش وسترن بلات از ژل 10% SDS-PAGE استفاده شد و پس از انجام روش های متداول الکتروفوروز و انتقال و بلاکینگ، نمونه ها با آنتی بادی های اولیه MBP (Myelin Basic Protein (D8X4Q) XP RabbitmAb) #78896، Cell Signaling Technology) و PLP (abcam، Anti-Myelin PLP antibody ab105784) با رقت ۱/۲۰۰۰ الی ۱/۵۰۰۰ در بافر PBS مورد سنجش قرار گرفتند. از آنتی بادی ثانویه (mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357) نیز با رقت ۱/۲۰۰۰ در بافر PBS برای اتصال به آنتی بادی اولیه استفاده شد. در این تحقیق از GAPDH به عنوان پروتئین معیار استفاده شد. سپس در اتاق تاریک و در زیر نور قرمز با استفاده از کیت ECL (abcam، ۱۳۳۴۰۸، آمریکا) ظهور باندها در دستگاه پردازشگر X-RAY (LD-14، چین) صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (BonninTech، چین) کاغذهای حساس به نور اسکن شده و دانسیته باندها با استفاده نرم افزار دستگاه JS 2000، مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش مقدار پروتئین NGF از کیت الایزا Nerve Growth Factor (NGF) ELISA Kit، SunLong Biotech، SL0515Ra، استفاده شد.

**تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد میانگین گزارش شد. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده ها، از آزمون آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) برای مقایسه ی میانگین گروه ها استفاده شد. از آزمون تعقیبی توکی نیز برای بررسی تفاوت گروه های کنترل و آزمایش استفاده گردید. سطح معنی داری آزمون  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

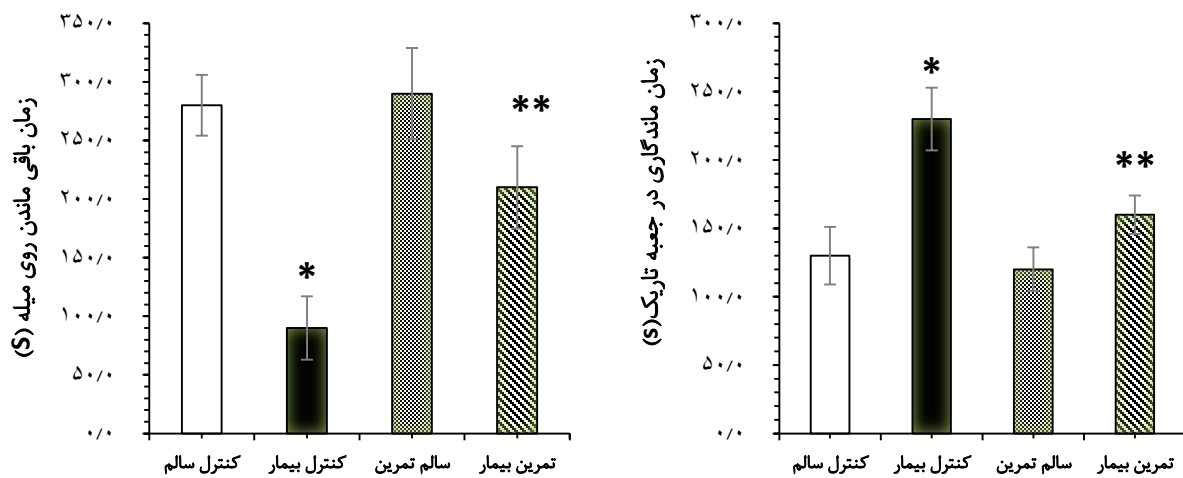
## نتایج

بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس یکراهه و آزمون تعقیبی توکی، در تحقیق حاضر وزن گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری یافت و پس از یک دوره فعالیت شنا افزایش قابل توجهی یافت ( $F(4,24)=163/738$ ،  $p < 0.05$ ) که بیانگر اثرات احتمالی فعالیت ورزشی شنا بر جلوگیری از کاهش وزن ناشی از بیماری MS است.



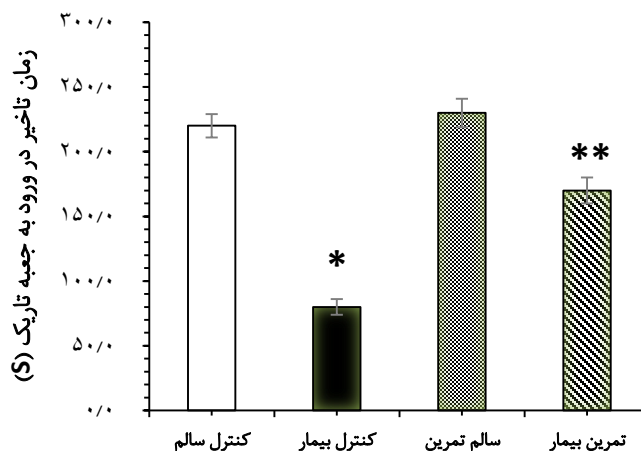
شکل ۲. نتایج وزن کشتی رت ها در گروه های مختلف. \* نشانه تفاوت معنادار گروه کنترل بیمار با گروه کنترل سالم و سایر گروه ها؛ \*\* نشانه تفاوت معنادار گروه تمرین بیمار با گروه کنترل بیمار و سایر گروه ها؛ # نشانه تفاوت معنادار با گروه کنترل سالم ( $p < 0.05$ ).

نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس یکراهه و آزمون تعقیبی توکی در آزمون های روتارود و شاتل باکس در شکل ۳ نشان داده شده است ( $p < 0.05$ )، به ترتیب  $F(4,24)=237/409$  و  $F(4,24)=206/113$ . نتایج نشان داد که در آزمون رفتاری روتارود مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله در گروه کنترل بیمار در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی داری یافت ( $p < 0.001$ ) و پس از دوره فعالیت شنای اختیاری در گروه تمرین بیمار افزایش معناداری را در مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله نسبت به گروه کنترل بیمار نشان داد ( $p < 0.001$ ). نتایج حاصل از آزمون شاتل باکس نشان داد که زمان ماندگاری در جعبه تاریک در رت های گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معناداری یافته است ( $p < 0.001$ ). در حالی که این متغیر در گروه تمرین بیمار کاهش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان می دهد ( $p < 0.001$ ). همچنین نتایج آزمون شاتل باکس در گروه کنترل بیمار نشان داد که زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در رت های گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری یافته است ( $p < 0.001$ ). در حالی که این متغیر در گروه تمرین بیمار افزایش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان می دهد ( $p < 0.001$ ).



A

B

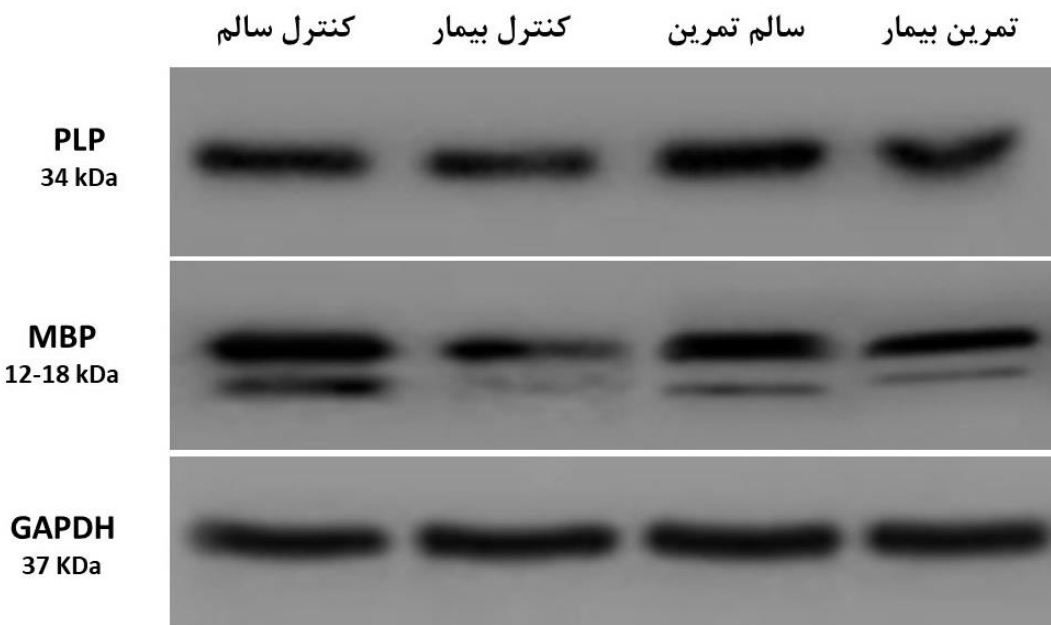


C

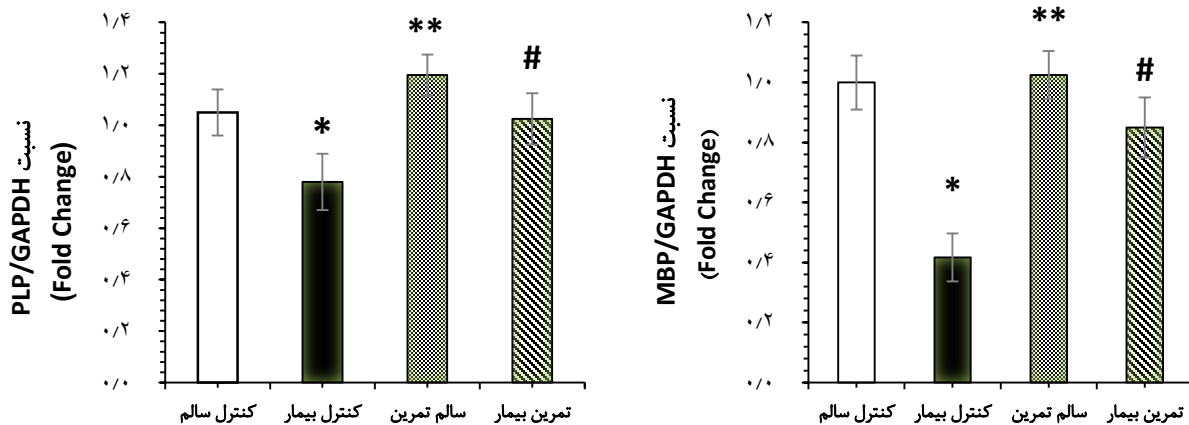


شکل ۳. نتایج آزمون‌های روتارود و شاتل باکس در گروه‌های مختلف. A) نتایج آزمون روتارود (زمان باقی ماندن روی میله)، B و C) نتایج شاتل باکس (زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک و زمان ماندگاری در جعبه تاریک). \* نشانه تفاوت معنادار گروه کنترل بیمار با گروه کنترل سالم و سایر گروه‌ها؛ \*\* نشانه تفاوت معنادار گروه تمرین بیمار با گروه کنترل بیمار و سایر گروه‌ها؛ ( $p < 0.01$ ).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه در مورد مقایسه میانگین مقادیر پروتئین‌های NGF، MBP و PLP بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در مقادیر این پروتئین‌ها در گروه‌های مختلف است ( $p < 0.05$ )، به ترتیب  $F(4,24)=184/204$ ،  $F(4,24)=179/504$  و  $F(4,24)=86/309$ . نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که محتوای پروتئین‌های MBP و PLP در گروه کنترل بیمار به صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت ( $p < 0.05$ )، همچنین مقادیر این پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به صورت قابل توجهی افزایش پیدا کرد ( $p < 0.05$ )، علاوه بر این، مقادیر پروتئین NGF در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافت ( $p < 0.05$ ). همچنین مقادیر این پروتئین در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به صورت قابل توجهی افزایش پیدا کرد ( $p < 0.05$ ). در شکل ۴ باندهای وسترن بلات و نمودارهای کمی مقادیر پروتئین‌های MBP و PLP و نیز میزان پروتئین NGF که به روش الایزا اندازه‌گیری شده، نشان داده شده است.

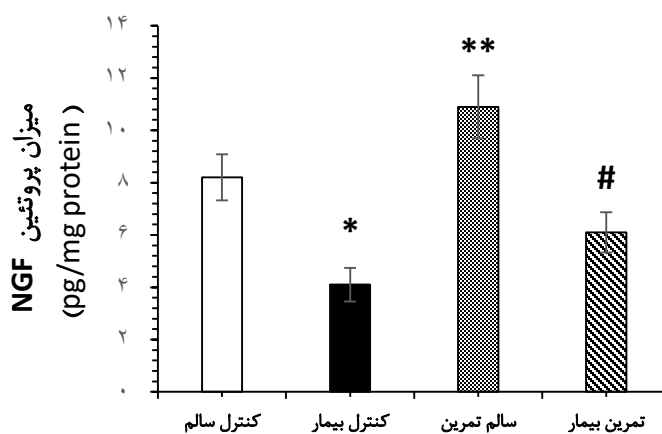


A



B

C



D

شکل ۴. (A) محتوای پروتئین‌های MBP و PLP در چهار گروه‌های مختلف با استفاده از روش وسترن بلات. (B) تجزیه و تحلیل باندهای وسترن بلات پروتئین‌های MBP و PLP در گروه‌های مختلف. (C) تجزیه و تحلیل باندهای وسترن بلات پروتئین‌های MBP و PLP در گروه‌های مختلف. (D) محتوای پروتئین NGF در چهار گروه‌های مختلف با استفاده از روش الایزا. \* نشانه تفاوت معنادار گروه کنترل بیمار با گروه کنترل سالم و سایر گروه‌ها در پروتئین‌های MBP و PLP ( $p < 0.001$ ); \*\* نشانه تفاوت معنادار گروه سالم تمرین با گروه کنترل سالم و سایر گروه‌ها در پروتئین‌های MBP و PLP ( $p < 0.001$ ); # نشانه تفاوت معنادار گروه تمرین بیمار با گروه کنترل بیمار در هر سه پروتئین و تفاوت با سایر گروه‌ها در پروتئین‌های MBP و NGF ( $p < 0.001$ ).

## بحث و نتیجه گیری

MS یک بیماری خودایمنی و التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با ویژگی‌های پاتولوژیک مانند میلین زدایی، گلیوسیز و آسیب آکسونی شناخته می‌شود و با وجود مطالعات وسیع هنوز دلایل و مکانیسم‌های دقیق این بیماری کاملاً مشخص نیست (۳۵). با توجه به اثرات مثبت برخی انواع فعالیت‌های ورزشی بر کیفیت پروتئین‌های ساختاری و دوباره سازی میلین در سیستم عصبی مرکزی این بیماران، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر فعالیت‌شنای اختیاری بر محتوای پروتئین NGF، MBP و PLP در بافت هیپوکمپ رت‌های مدل MS القا شده با کوپریزون بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که وزن آزمودنی‌های گروه کنترل بیمار با مصرف کوپریزون به شکل معناداری نسبت به گروه کنترل سالم کاهش و بعد از اجرای پروتکل تمرینی به شکل قابل توجهی در گروه تمرین بیمار افزایش یافت، اما این مقدار همچنان از وزن گروه‌های سالم کمتر بود. این نتایج با پژوهش مندولسی و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۳۶) همسو است، با این تفاوت که در پژوهش ذکر شده، وزن آزمودنی‌های گروه بیمار تمرین، بعد از اجرای یک دوره تمرین تقریباً

به اندازه گروه کنترل سالم افزایش یافت که ممکن است به دلیل استفاده از دوز کمتری از کوپریزون باشد (۰/۲ درصد). در یافته‌های آزمون‌های رفتاری، کاهش قابل توجه زمان باقی ماندن آزمودنی‌های گروه کنترل بیمار بر روی گردانه‌ی دستگاه روتارود نشان از تاثیرگذاری کوپریزون بر القاء MS است که منطبق با پژوهش‌های پیشین می باشد (۳۲). این زمان در گروه تمرین بیمار، پس یک دوره فعالیت شنا به شکل قابل توجهی افزایش پیدا کرد اما باز هم از گروه‌های کنترل سالم و سالم تمرین کمتر بود که ممکن است با افزایش طول دوره‌ی تمرین این تفاوت کم‌رنگ‌تر شود. در آزمون شاتل باکس، افزایش قابل توجه زمان ماندگاری در بخش تاریک در گروه کنترل بیمار نیز نشان از اثرگذاری کوپریزون بر ایجاد اختلال در حافظه است که با یک دوره تمرین شنا به طور قابل توجهی کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر کاهش معنی دار سطوح NGF در گروه بیمار کنترل نسبت به گروه سالم کنترل را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که سطوح NGF بافت هیپوکمپ رت‌ها در گروه تمرین مبتلا به MS در مقایسه با گروه‌های کنترل و بیمار افزایش معنی داری یافته است. این یافته‌ها همسو با نتایج پژوهش نقیب‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۳۷) است. با این تفاوت که آنها بجای فعالیت شنا، به مدت ۹ هفته از فعالیت بر روی تردمیل استفاده کردند و به این دلیل که قبل از القاء MS با کوپریزون ۴ هفته از زمان شروع پروتکل تمرینی سپری شده بود؛ امکان اینکه به دلیل اثر مثبت ورزش، کاهش سطوح NGF ناشی از مصرف کوپریزون در گروه‌های تمرین کمتر رخ داده باشد وجود دارد. همچنین افزایش سطوح NGF در گروه‌های تمرینی در مطالعه‌ی حاضر با نتایج مطالعه‌ی کیم و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۳۴) مشابهت دارد. با وجود تفاوت در روش القاء MS (MOG<sub>33-55</sub>) و بافت مورد بررسی متفاوت (نخاع) در پژوهش کیم، نتایج این پژوهش با مطالعه‌ی حاضر متفاوت نبود. از دیگر تفاوت‌های این مطالعه و پژوهش کیم و همکاران، می‌توان به رعایت اصل اضافه بار تمرینی در پژوهش حاضر بر خلاف مطالعه ذکر شده اشاره کرد؛ اما با این وجود عدم رعایت اصل اضافه بار در مطالعه‌ی کیم، نتایج آنها به عدم افزایش NGF و پروتئین‌های ساختاری میلین منجر نشد. در پژوهش پاتل و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۳۸) که از تمرین تردمیل استفاده کرده بودند، سطوح NGF در گروه کنترل بیمار به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل سالم افزایش پیدا کرده بود که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر است. در زمان حمله‌های ناگهانی، سطوح NGF در محل درگیر، نسبت به افراد سالم افزایش پیدا می‌کند (که در مایع مغزی نخاعی بیماران نیز قابل مشاهده است) و بعد از تحریک میلین سازی به سطوح پایه باز می‌گردد (۵). بنابراین ممکن است زمان اندازه‌گیری (تنها ۱۰ روز پس از القاء MS) بر سطوح NGF تاثیرگذار بوده باشد. به علاوه احتمالاً به دلیل کم بودن حجم تمرین (فقط ۱۰ روز)، سطوح NGF در گروه تمرین بیمار و بیمار کنترل تفاوت معنی داری نداشت. حجم تمرین کافی نکنه ای بود که در مطالعه ما به دقت رعایت شد. به علاوه افزایش سطوح MBP و PLP در پژوهش حاضر همسو با مطالعه‌ی کیم و همکاران بود (۳۴). همچنین مطالعه‌ی کیم و سونگ در سال ۲۰۱۷ (۳۹) و مطالعه‌ی ماندولسی و همکاران در سال ۲۰۱۹ (۳۶) نیز افزایش سطح معنی دار پروتئین MBP را در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه بیمار نشان دادند که مشابه مطالعه‌ی حاضر است. نکته‌ی قابل توجه در مطالعه‌ی کیم و همکاران (۳۴) این است که افزایش MBP، NGF، MBP و PLP در گروه تمرین با گروه درمان با داروی IFN-B، تفاوت قابل توجهی نداشت که نشانگر قدرت اثرگذاری تمرین شنا می‌باشد. به علاوه در مطالعه‌ی حاضر، کاهش سطوح MBP و PLP در گروه کنترل بیمار نشانگر تاثیر القاء MS بر میلین‌زدایی است که همسو با نتایج پژوهش‌های کیم و همکاران (۳۴)، کیم و سونگ (۴۰) و ماندولسی و همکاران (۳۶) می‌باشد. برخی مطالعات انسانی در مبتلایان به MS نیز افزایش سطوح NGF در پاسخ به ورزش را نشان داده‌اند. نتیجه مطالعه‌ی گلد و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۴۱) افزایش حاد و گذرا، اما معنی دار، NGF در پاسخ به ۳۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت متوسط را نشان داد که ۳۰ دقیقه بعد از تمرین به حالت پایه بازگشت. اما پژوهش انسانی دیگری در مبتلایان به MS در سال ۲۰۰۴ (۴۲) در پاسخ هشت هفته تمرین کم شدت، افزایشی در سطح NGF گزارش نکرد که می‌تواند به دلیل شدت کم تمرین باشد. از مزایای ورزش شنا می‌توان به قابلیت تنظیم میکروبیوم روده و افزایش سطح سروتونین اشاره کرد که می‌تواند منجر به کاهش علائم افسردگی شود (۴۳، ۴۴). افزایش سطوح سروتونین با کاهش کالری دریافتی ارتباط مستقیم داشته (۴۵) و احتمال ابتلا به چاقی که یکی از عوامل مهم ابتلا به MS است را کاهش دهد (۴۶). به علاوه ورزش شنا با افزایش سطوح پروتئین Bcl-2 از آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها جلوگیری می‌کند (۴۷). به‌طور کلی می‌توان افزایش NGF و پروتئین‌های ساختاری میلین مانند MBP و PLP را نشان دهنده تاثیر مثبت ورزش بر میلین سازی در

مبتلایان به MS در نظر گرفت. با این حال نیاز به مطالعات جامع تر و گسترده تر برای روشن شدن ابعاد دیگر موضوع مورد بحث در این زمینه احساس می شود. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می توان گفت که ورزش، به خصوص از نوع شنا، در افزایش محتوای پروتئین های NGF، MBP و PLP در ناحیه هیپوکمپ بیماران مبتلا به MS موثر عمل می کند و احتمالاً میتواند به عنوان یک روش ایمن، غیر دارویی و بدون عارضه برای بهبود علائم مبتلایان به MS در نظر گرفته شود.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و پشتیبانی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز؛ تشکر و قدردانی می شود.

## حامی/حامیان مالی

این مطالعه با استفاده از گرنت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره SCU.SS1400.266 انجام گرفته است.

## مشارکت نویسندگان

در پژوهش حاضر آقای محمد رمی در بخش های انتخاب موضوع، تنظیم روش کار و اجرای پروتکل حیوانی، انجام روش وسترن بلات و الیزا برای ارزیابی پروتئین ها، آنالیز داده ها و نگارش مقاله؛ خانم سمانه راهدار در انجام پروتکل حیوانی و تحقیق و جمع آوری منابع نظری؛ آقای سید شفا مرعشی در نگارش مقاله و طراحی گرافیکی طرح شماتیک و جمع آوری منابع نظری و آقای عبدالحمید حبیبی در تفسیر داده ها مشارکت داشتند. تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده اند.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

## منابع

1. Maciak K, Dziedzic A, Saluk J. Remyelination in multiple sclerosis from the miRNA perspective. *Front. Mol. Neurosci.* 2023 Jun 1;16:1199313.

- .٢ Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids*. 2022;54(1):99-109.
- .٣ Calahorra L, Camacho-Toledano C, Serrano-Regal MP, Ortega MC, Clemente D. Regulatory cells in multiple sclerosis: From blood to brain. *Biomedicines*. 2022 Feb 1;10(2):335.
- .٤ Lorenzini L, Baldassarro VA, Stanzani A, Giardino L. Nerve Growth Factor: The First Molecule of the Neurotrophin Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021;1331:3-10.
- .٥ Guarnieri G, Sarchielli E, Comeglio P, Herrera-Puerta E, Piaceri I, Nacmias B, et al. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Influences Phenotypic Plasticity and Promotes Epigenetic Changes in Human Basal Forebrain Cholinergic Neuroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(17):6128.
- .٦ Tonev D, Momchilova A. Therapeutic Plasma Exchange and Multiple Sclerosis Dysregulations: Focus on the Removal of Pathogenic Circulatory Factors and Altering Nerve Growth Factor and Sphingosine-1-Phosphate Plasma Levels. *Current issues in molecular biology(CIMB)*. 2023;45(10):7749-74.
- .٧ Terracina S, Ferraguti G, Tarani L, Fanfarillo F, Tirassa P, Ralli M, et al. Nerve Growth Factor and Autoimmune Diseases. *Current issues in molecular biology(CIMB)*. 2023;45(11):8950-73.
- .٨ Acosta CM, Cortes C, MacPhee H, Namaka MP. Exploring the role of nerve growth factor in multiple sclerosis: implications in myelin repair. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12(8):1242-56.
- .٩ Plemel JR, Liu WQ, Yong VW. Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017;16(9):617-34.
- .١٠ Kister A, Kister I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front. Chem.* 2023; 21;10:1041961.
- .١١ Smirnova EV, Rakitina TV, Ziganshin RH, Arapidi GP, Saratov GA, Kudriaeva AA, Belogurov AA. Comprehensive Atlas of the Myelin Basic Protein Interaction Landscape. *Biomolecules*. 2021;11(11):1628.
- .١٢ Greer JM, Trifilieff E, Pender MP. Correlation between anti-myelin proteolipid protein (PLP) antibodies and disease severity in multiple sclerosis patients with PLP response-permissive HLA types. *Front. Immunol.* 2020; 21;11:1891.
- .١٣ Guo LY, Lozinski B, Yong VW. Exercise in multiple sclerosis and its models: Focus on the central nervous system outcomes. *J. Neurosci. Res.* 2020;98(3):509-23.
- .١٤ Campbell E, Coulter EH, Paul L. High intensity interval training for people with multiple sclerosis: A systematic review. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2018;24:55-63.
- .١٥ Joisten N, Proschinger S, Rademacher A, Schenk A, Bloch W, Warnke C, et al. High-intensity interval training reduces neutrophil-to-lymphocyte ratio in persons with multiple sclerosis during inpatient rehabilitation. *Mult. Scler. Int.* 2021;27(7):1136-9.
- .١٦ Taul-Madsen L, Connolly L, Dennett R, Freeman J, Dalgas U, Hvid LG. Is aerobic or resistance training the most effective exercise modality for improving lower extremity physical function and perceived fatigue in people with multiple sclerosis? A systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2021; 1;102(10):2032-48.
- .١٧ Langeskov-Christensen M, Hvid LG, Jensen HB, Nielsen HH, Petersen T, Stenager E, Dalgas U. Efficacy of high-intensity aerobic exercise on common multiple sclerosis symptoms. *Acta Neurol. Scand.* 2022;145(2):229-38.
- .١٨ Torres-Costoso A, Martínez-Vizcaíno V, Reina-Gutiérrez S, Álvarez-Bueno C, Guzmán-Pavón MJ, Pozuelo-Carrascosa DP, et al. Effect of Exercise on Fatigue in Multiple Sclerosis: A Network Meta-analysis Comparing Different Types of Exercise. *Arch Phys Med Rehabil.* 2022;103(5):970-87.e18.

- .19 Bernardes D, Oliveira-Lima OC, Silva TV, Faraco CC, 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. *J. Neuroimmunol.* 2013;264(1-2):24-34.
- .20 Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lécolle S, et al. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Physiol. J.* 2009;587(Pt 14):3561-72.
- .21 Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7(12):1139-51.
- .22 Ohgomori T, Jinno S. Cuprizone-induced demyelination in the mouse hippocampus is alleviated by phytoestrogen genistein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2019;363:98-110.
- .23 Liu C, Zhang N, Zhang R, Jin L, Petridis AK, Loers G, et al. Cuprizone-Induced Demyelination in Mouse Hippocampus Is Alleviated by Ketogenic Diet. *J. Agric. Food Chem.* 2020;68(40):11215-28.
- .24 Kim W, Hahn KR, Jung HY, Kwon HJ, Nam SM, Kim JW, et al. Melatonin ameliorates cuprizone-induced reduction of hippocampal neurogenesis, brain-derived neurotrophic factor, and phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in the mouse dentate gyrus. *Brain Behav.* 2019;9(9):e01388.
- .25 Papadopoulos D, Dukes S, Patel R, Nicholas R, Vora A, Reynolds R. Substantial archaeocortical atrophy and neuronal loss in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2009;19(2):238-53.
- .26 Klein B, Mrowetz H, Barker CM, Lange S, Rivera FJ, Aigner L. Age influences microglial activation after cuprizone-induced demyelination. *Front. aging neurosci.* 2018 Sep 20;10:278.
- .27 Rocca MA, Barkhof F, De Luca J, Ffifis J, Geurts JGG, Hulst HE, et al. The hippocampus in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2018;17(10):918-26.
- .28 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.* 2018;55(2):946-57.
- .29 Ye JN, Chen XS, Su L, Liu YL, Cai QY, Zhan XL, et al. Progesterone alleviates neural behavioral deficits and demyelination with reduced degeneration of oligodendroglial cells in cuprizone-induced mice. *PLoS One.* 2013;8(1):e54590.
- .30 Ghotbeddin Z, Basir Z, Jamshidian J, Delfi F. Modulation of behavioral responses and CA1 neuronal death by nitric oxide in the neonatal rat's hypoxia model. *Brain Behav.* 2020;10(11):e01841.
- .31 Ghotbeddin Z, Khazaeel K, Tabandeh MR, Aliheydari M, Yaghoubi H. Effects of omega-3 fatty acid supplementation during chronic maternal hypoxia on behavioral disorders in male rat offspring: The role of Trk family and oxidative stress. *Metab. Brain Dis.* 2022;37(6):1959-67.
- .32 Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor behavioral deficits in the cuprizone model: Validity of the rotarod test paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(19):11342.
- .33 Zarrindast MR, Farajzadeh Z, Rostami P, Rezayof A, Nourjah P. Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. *Behav. Brain Res.* 2005;163(1):100-6.
- .34 Kim JY, Yi ES, Lee H, Kim JS, Jee YS, Kim SE, et al. Swimming Exercise Ameliorates Symptoms of MOG-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Inflammation and Demyelination in Rats. *Int. Neurol.* 2020;24(Suppl 1):S39-47.

- .۳۵ Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2021 Apr;14:17562864211007687.
- .۳۶ Mandolesi G, Bullitta S, Fresegna D, De Vito F, Rizzo FR, Musella A, Guadalupi L, Vanni V, Bassi MS, Buttari F, Viscomi MT. Voluntary running wheel attenuates motor deterioration and brain damage in cuprizone-induced demyelination. *Neurobiol. Dis.* 2019 Sep 1;129:102-17.
- .۳۷ Naghibzadeh M, Ranjbar R, Tabandeh MR, Habibi A. Effects of Two Training Programs on Transcriptional Levels of Neurotrophins and Glial Cells Population in Hippocampus of Experimental Multiple Sclerosis. *Int J Sports Med.* 2018;39(08):604-12.
- .۳۸ Patel DI, White LJ. Effect of 10-day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2013;38(2):194-9.
- .۳۹ Kim T-W, Sung Y-H. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Neurosci.* 2017;346:173-81.
- .۴۰ Kim TW, Sung YH. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Neurosci.* 2017;346:173-81.
- .۴۱ Gold SM, Schulz KH, 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. *J. Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):99-105.
- .۴۲ 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(1-2):11-8.
- .۴۳ Xie Y, Wu Z, Zhou L, Sun L, Xiao L, Wang G. Swimming Exercise Modulates Gut Microbiota in CUMS-Induced Depressed Mice. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2022;18:749-60.
- .۴۴ Wigati KW, Bintari MP, Rejeki PS, Wungu CD, Pranoto A, Ramadhan RN, Setiawan HK, Munir M, Halim S. The effect of 4 week-long swimming exercise intervention on increased serotonin levels in male mice (*Mus musculus*). *Comp. Exerc. Physiol.* 2023; 4;1(aop):1-0.
- .۴۵ van Galen KA, Ter Horst KW, Serlie MJ. Serotonin, food intake, and obesity. *Obes Rev.* 2021;22(7):e13210.
- .۴۶ Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, Langer-Gould A. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(9):1905-22.
- .۴۷ Park HS, Kim TW, Park SS, Lee SJ. Swimming exercise ameliorates mood disorder and memory impairment by enhancing neurogenesis, serotonin expression, and inhibiting apoptosis in social isolation rats during adolescence. *J Exerc Rehabil.* 2020;16(2):132-40.