مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤٨/هفته‌ی چهارم آبان ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۵

تأثیر چهار هفته شنای هوازی بر میزان عامل نورون‌زایی مشتق از مغز و گیرنده‌ی آن در بافت مغز موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی

سید مهدی سیدالحسینی[۱]، حمید رجبی[۲]، عطاالله غدیری[۳]، رضا قراخانلو[۴]، علیرضا سرکاکی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Multiple sclerosis، به عنوان یک بیماری عصبی- ایمنی‌شناسی (Neuroimmunology) در انسان شناخته می‌شود. شواهد حاکی از نقش عامل نورون‌زایی مشتق از مغز (Brain-derived neurotrophic factor یا BDNF) و گیرنده‌ی اختصاصی آن، تیروزین کیناز B (Tyrosine receptor kinase B یا TrkB) در پیشرفت این بیماری است. تأثیر عوامل مختلف بر روی بیان این عوامل در مطالعات مختلف گزارش شده است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین تأثیر چهار هفته شنای هوازی بر میزان عوامل نورون‌زای مشتق از مغز و تیروزین کیناز B در مغز موش‌های مدل حیوانی Multiple sclerosis یا مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE) بود.

روش‌ها: موش‌های C57BL/6 به ۸ گروه ۱۰ تایی شامل ۶ گروه موش‌های مدل EAE (شاهد، شنا، دریافت اینترفرون بتا-۱، شنا و دریافت اینترفرون بتا-۱، شاهد تزریق، شاهد شنا و تزریق) و ۲ گروه موش‌های سالم (شاهد، شنا) تقسیم شدند. از روز ۹ بیماری، موش‌ها به مدت ۴ هفته روزانه مقدار ۱۵۰ واحد بین‌المللی/گرم اینترفرون بتا-۱ دریافت نمودند و یا به مدت ۴ هفته، به صورت ۵ روز در هر هفته و روزانه ۳۰ دقیقه، ورزش شنا داشتند. بافت مغز جدا و سطح عوامل پیش‌گفته به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) سنجیده شد. داده‌ها توسط آزمون One-way ANOVA تحلیل شدند.

یافته‌ها: EAE منجر به کاهش BDNF و افزایش TrkB در مغز موش‌های مدل EAE شد. همچنین، نشان داده شد که شنا و تیمار اینترفرون بتا-۱، منجر به افزایش این عوامل در مغز موش‌ها شد؛ در حالی که این افزایش به صورت آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، احتمال می‌رود ورزش نسبت به داروی اینترفرون بتا-۱، عامل مؤثرتری در تغییر سطح BDNF و TrkB بافت مغز موش‌های مدل EAE باشد.

واژگان کلیدی: انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، عامل نورون‌زایی مشتق از مغز، تیروزین کیناز B، شنای هوازی

ارجاع: سیدالحسینی سید مهدی، رجبی حمید، غدیری عطاالله، قراخانلو رضا، سرکاکی علیرضا. **تأثیر چهار هفته شنای هوازی بر میزان عامل نورون‌زایی مشتق از مغز و گیرنده‌ی آن در بافت مغز موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۸): ۱۲۷۰-۱۲۶۳

مقدمه

در طی چند دهه‌ی اخیر، Multiple sclerosis (MS) به عنوان یک بیماری مزمن التهابی درگیر کننده‌ی سیستم عصبی مرکزی شامل مغز و نخاع به خوبی در جهان شناخته شده است. در این بیماری، سیستم ایمنی با افزایش التهاب، موجب میلین‌زدایی و آسیب برگشت ناپذیر جدی به آکسون سلول‌های عصبی می‌شود و به نوبه‌ی خود، منجر به نقص در انتقال پیام‌های ارتباطی و بروز علایم جسمی می‌گردد (۲-۱).

در سال‌های اخیر، عوامل نورون‌زا شامل Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) به عنوان یک کاندیدای مولکولی برای افزایش محافظت عصبی در بیماری‌های خود ایمن نظیر MS پیشنهاد شده‌اند (۲). این عامل می‌تواند منجر به افزایش رشد، بقا و توسعه و همچنین، بهبود عملکرد سلول‌های

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴- استاد، گروه تربیت بدنی، دانشکده‌ی علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: سید مهدی سیدالحسینی
Email: smhosein2000@gmail.com

عصبی شود. BDNF به فراوانی در مغز تولید می‌شود و در بیماران مبتلا به MS توسط سلول‌های سیستم ایمنی نیز تولید می‌گردد (۲). مطالعات انسانی نشان داده‌اند که سطح سرمی BDNF، در مرحله‌ی حمله‌ی بیماری و ریکاوری بعد از آن در بیماران MS نوع برگشت پذیر، به شکل معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد می‌باشد؛ در حالی که مقدار این عامل در بیماران MS نوع پیش‌رونده، به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد گزارش شده است (۳). علاوه بر این، تحقیقات بر روی مدل حیوانی بیماری MS که با نام Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) شناخته می‌شود (۴) نشان داده است که میزان بیان BDNF می‌تواند تحت تأثیر عوامل التهابی، عوامل ضد التهابی اگزوژنیک و نیز ورزش تغییر پیدا کند (۲). در تأیید این یافته‌ها، محققان نشان داده‌اند که برخی از داروها با خاصیت ضد التهابی می‌توانند منجر به افزایش بیان و تولید این عامل و همچنین، کاهش میلین‌زدایی و شدت نشانه‌های جسمی در موش‌های مبتلا به EAE شوند (۵).

BDNF از طریق گیرنده‌ی Tyrosine receptor kinase B (TrkB) فعالیت خود را بروز می‌دهد (۲). این عامل با متصل شدن به گیرنده‌ی اختصاصی‌اش و فعال کردن آن، می‌تواند با القای اثرات ضد مرگ سلولی، بقا و توسعه‌ی سلول‌های عصبی را بهبود بخشد (۲). در واقع، مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که فعالیت بیشتر گیرنده‌ی TrkB توسط BDNF در مرحله‌ی حاد بیماری MS، می‌تواند منجر به کاهش مرگ سلول‌های عصبی و مانع از تخریب میلین و دسترسی آن به سلول‌های ایمنی بدن شود (۲).

کاهش میزان بیان این گیرنده، ممکن است منجر به افزایش شدت بیماری شود. در این رابطه، افزایش بیان BDNF همراه با گیرنده‌ی اختصاصی‌اش –TrkB– پس از ورزش به عنوان یک عامل اساسی در تقویت طول آکسون و کاهش ناهنجاری‌های سیناپسی مطرح شده است (۷-۶). همچنین، نشان داده شده است که ورزش روی تردمیل و چرخ دوار، به طور معنی‌داری موجب تقویت بیان BDNF و TrkB در مغز موش‌های صحرایی شده است (۸).

با توجه به افزایش مبتلایان به بیماری MS در ایران و سایر نقاط جهان، بخش بزرگی از تحقیقات بر روی توسعه‌ی راه‌های درمانی این بیماری متمرکز شده است. یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر مورد استقبال دانشمندان قرار گرفته است، انجام فعالیت‌های فیزیکی-ورزشی نظیر شنا می‌باشد (۱۱-۹). شنا کردن به عنوان یک فعالیت فیزیکی و هوازی کنترل شده، شناخته شده است. برخی از شواهد انسانی نشان می‌دهد که ورزش هوازی و شنا به مدت چند هفته، باعث افزایش سطح BDNF در سرم افراد مبتلا به MS می‌شود (۱۳-۱۲). علاوه بر آن، مطالعات انسانی نشان داده است که افرادی که فعالیت فیزیکی به ویژه ورزش هوازی را به صورت طولانی انجام داده‌اند، میزان بالاتری از BDNF را داشته‌اند (۱۴).

در مجموع، این مطالعات بیانگر این موضوع هستند که بیماری MS و ورزش، می‌توانند منجر به تغییر بیان و تولید BDNF و گیرنده‌ی TrkB شوند. از این رو، در مطالعه‌ی حاضر اثر ورزش شنا بر روی میزان این دو عامل پروتئینی در مغز موش‌های مدل EAE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به استفاده از اینترفرون بتا-۱ برای کاهش علایم بیماری در افراد مبتلا به MS، این دارو به منظور مقایسه با تأثیر شنا در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که به تازگی انجام شد، تیمار اینترفرون بتا-۱ منجر به کاهش شدت علایم بالینی در موش‌های مبتلا به EAE گردید؛ از این رو، با توجه به عدم وجود شواهد متقن مولکولی مبنی بر تأثیر اینترفرون بتا-۱ بر روی BDNF و TrkB، این ماده می‌تواند خود نیز به عنوان یک مداخله‌گر مجزا مورد مطالعه قرار گیرد.

روش‌ها

حیوانات: برای انجام این مطالعه‌ی تجربی، ۸۰ سر موش سوری ماده با نژاد C57BL/6 و سن ۱۲-۱۰ هفته و وزن ۲ ± ۲۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۱ ± ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. کلیه‌ی روش‌های موجود در این مقاله، به تأیید کمیته‌ی پژوهشی دانشگاه خوارزمی رسید. اصول اخلاقی رفتار با حیوانات منطبق با کنوانسیون‌های بین‌المللی و اصول اخلاق در پژوهش‌های حیوانی زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز رعایت گردید.

گروه‌های مورد مطالعه: در این مطالعه، موش‌ها در ۸ گروه ۱۰تایی قرار گرفتند که در ۶ گروه موش‌های مدل EAE (شاهد، شنا، دریافت اینترفرون بتا-۱، شنا و دریافت اینترفرون بتا-۱، شاهد تزریق، شاهد شنا و تزریق) به صورت تصادفی تقسیم شدند و ۲۰ سر موش دیگر در ۲ گروه سالم (شاهد، شنا) تقسیم شدند و در نهایت، گروه‌ها بدین ترتیب نام‌گذاری گردیدند: ۱) گروه شاهدکه شامل موش‌های سالم (بدون EAE) بودند (Control)؛ ۲) گروه شنا که شامل موش‌های سالم (بدون EAE) بودند و تنها چهار هفته فعالیت ورزشی شنا را تجربه کرده‌اند (Swim یا SW)؛ ۳) گروه MS که شامل موش‌های دارای EAE بودند (EAE)؛ ۴) گروه MS + شنا که شامل موش‌ها دارای EAE بودند که چهار هفته فعالیت ورزشی شنا را تجربه کردند (EAE + SW)؛ ۵) گروه MS + اینترفرون که شامل موش‌های دارای EAE بود که اینترفرون بتا-۱ دریافت کردند (EAE + Interferon beta-1 یا IFN)؛ ۶) گروه MS + حلال

اینترفرون بتا-۱ شامل موش‌های دارای EAE بودند که تنها حلال اینترفرون بتا-۱ دریافت کردند (Solvent یا EAE + SOL)؛ ۷) گروه MS + محیط شنا + حلال که در آن موش‌ها دارای EAE بودند و تنها حلال اینترفرون بتا-۱ دریافت کردند و بر سکویی بالاتر ازسطح آب روی محفظه‌ی شنا مستقر شده بودند (Environment + SOL یا EAE + EN) و ۸) گروه MS + اینترفرون بتا-۱ + شنا که شامل موش‌های دارای EAE بودند که اینترفرون بتا-۱ دریافت و چهار هفته فعالیت ورزشی شنا را تجربه کردند (EAE + SW + INF).

موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی: القای EAE به موش‌ها در مؤسسه‌ی اختلالات شناختی و رفتاری سالاری انجام شد. این بیماری بر اساس روش کار مشخصی به حیوانات القا شد؛ به این ترتیب که حیوان ابتدا با تزریق صفاقی کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شد. سپس، ۳۰۰ میکروگرم Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (۳۵-۵۵) MOG در حجم ۱۰۰ میکرولیتر Phosphate buffered saline (PBS) و با ۵۰۰ میکروگرم مایکوباکتریوم که تسهیل و تشدید کننده‌ی پاسخ‌های التهابی می‌باشد، در حجم ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل (Complete Freund's adjuvant) مخلوط گردید و به صورت زیر جلدی در ناحیه‌ی هر دو پهلو تزریق شد. بلافاصله بعد از این تزریق و ۴۸ ساعت بعد، ۳۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه (Pertussis toxin یا PT) که نفوذپذیری سد خونی- مغزی را به جهت نفوذ عامل‌های التهابی به سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system یا CNS) افزایش می‌دهد، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۵).

شروع علایم بیماری و شدت بیماری درجه‌بندی شد؛ به گونه‌ای که نمره‌ی صفر (بدون علایم بالینی)، نمره‌ی ۰/۵ (شلی بخشی از دم)، نمره‌ی ۱ (فلج کامل دم)، نمره‌ی ۱/۵ (فلج کامل دم و ضعف مقطعی اندام پشتی)، نمره‌ی ۲ (فلج کامل دم و ضعف مشهود اندام پشتی)، نمره‌ی ۲/۵ (فلج یک‌طرفه‌ی اندام پشتی)، نمره‌ی ۳ (فلج کامل اندام پشتی)، نمره‌ی ۳/۵ (فلج کامل اندام پشتی و ضعف دست)، نمره‌ی ۴ (فلج چهار دست و پا) و نمره‌ی ۵ (زمین‌گیری کامل یا مرگ) را نشان می‌دهد.

فعالیت بدنی شنا: برنامه‌ی تمرینی شنا طبق شیوه‌نامه‌ی Bernardes و همکاران (۱۶) از روز ۹ بعد از القای بیماری، که بروز علایم بالینی در حیوانات شروع می‌شود (در شیوه‌نامه‌ی القای مدل انسفالومیلیت تجربی اجرا شده، علایم بالینی به طور معمول از روز ۹ ظاهر می‌شوند)، در یک محفظه‌ی شنا با دمای کنترل شده (۱ ± ۳۱ درجه‌ی سانتی‌گراد)، ۳۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته انجام گرفت. موش‌ها در هفته‌ی اول از روزهای اول تا چهارم جهت آشنایی با آب و تمرین‌پذیری و روز پنجم تحت یک آزمایش بار فزاینده طبق شیوه‌نامه‌ی Bernardes و همکاران در محفظه قرار گرفتند. این شیوه‌نامه، شامل چند مرحله شنا با تحمیل باری پیش‌رونده (افزاینده) بر دم موش‌ها و در هر مرحله به میزان ۲ درصد وزن بدن آن‌ها بود؛ که در این مراحل (حداکثر ۳ دقیقه‌ای)، غوطه‌وری تا مرز خستگی کامل ادامه پیدا کرد.

در نهایت و با افزایش فزاینده‌ی ۲ درصدی به بار اعمال شده طی مراحل مختلف، مشخص گردید بیشینه‌ی باری که موش‌ها در مراحل آزمایش بار فزاینده تحمل می‌کنند، برابر با ۷ درصد از وزن بدن آن‌ها می‌باشد. بنابراین، اولین جلسه‌ی تمرین در آب، با ۶۰ درصد از بیشینه‌ی بار به دست آمده (معادل ۴/۲ درصد از وزن بدن) آغاز گردید. موش‌ها هر هفته وزن شدند تا درصورت نیاز بار اضافی بر اساس وزن جدید اعمال گردد. با توجه به وضعیت گزارش شده‌ی وزنی در این پژوهش، شیوه‌نامه‌ی اضافه بار بدون نیاز به تغییر و بار جدید، تا پایان ثابت در نظر گرفته شد. برای اعمال فشار محیط شنا و به منظور ایجاد شرایط رطوبتی یکسان، موش‌های گروه شاهد محیط شنا (EN)، همزمان بر روی یک سکو در بالای محفظه‌ی شنای گروه تمرین، قرار داده شدند. برای تسریع در تنظیم دمای بدن و کاهش استرس وارده بعد از هر جلسه‌ی تمرین شنا، حیوانات به آرامی توسط یک حوله‌ی نرم، خشک شدند (جدول ۱).

تیمار اینترفرون: ازآن جایی که اثر اینترفرون بتا-۱ برای کاهش علایم بیماری در افراد مبتلا به MS ثابت شده است، این دارو به منظور مقایسه با تأثیر شنا در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. از این رو، دو گروه از حیوانات میزان ۱۵۰ واحد بین‌المللی/گرم اینترفرون بتا-۱ (سیناژن) به صورت زیر جلدی دریافت کردند. اینترفرون بتا-۱ در بافر فسفات سالین حل شد. حیوانات از روز ۹ و آغاز علایم بیماری، مورد تیمار قرار گرفتند (۱۴).

جدول ۱. برنامه‌ی تمرینی در گروه‌های شنا

گروه‌ها	تعداد موش‌ها	نوع تمرین	سازگاری با محیط	آشنایی با آب	آزمایش بار فزاینده	طول دوره	تعداد جلسات	مدت	شدت
سالم شنا EAE + شنا EAE + IFN + شنا	۳۰	شنا در دمای ۱ ± ۳۱ درجه‌ی سانتی‌گراد	یک هفته	۴ روز	روز پنجم با ۷-۲ درصد وزن	۲۸ روز	۵ جلسه در هفته	روزانه ۳۰ دقیقه	۴/۲ درصد وزن

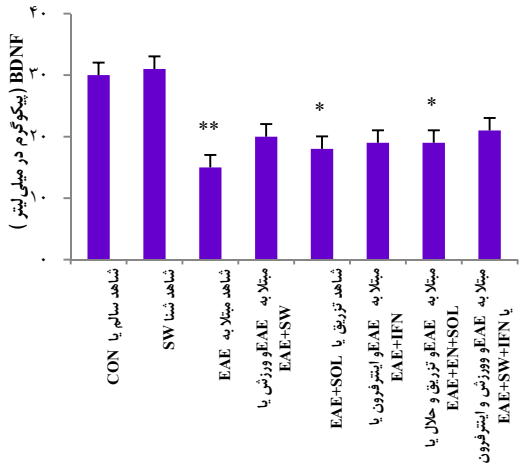
EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; IFN: Interferon beta-1

جداسازی بافت مغز: پس از ۴ هفته از القای بیماری و پایان تیمارها، حیوانات توسط ترکیب کتامین هیدروکلراید (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت برگشت‌ناپذیر بیهوشی عمیق شدند. سپس، حیوانات کشته شدند و مغز آن‌ها از جمجمه خارج و در نیتروژن مایع منجمد و تحت شرایط ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری میزان BDNF و گیرنده‌ی TrkB نگهداری شدند.

سنجش عامل نورون‌زایی مشتق شده از مغز و گیرنده‌ی تیروزین کیناز B: عامل نورون‌زایی مشتق شده از مغز و گیرنده‌ی تیروزین کیناز B با استفاده از کیت Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D, USA) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، برای جداسازی پروتئین، بافت مغز جدا شده در بافر لیز کننده (شامل ۱۳۷ میلی‌مول کلرید سدیم، ۲۰ میلی‌مول Hydrocloride یا Tris-HCl، گلیسرول ۱۰ درصد، ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آپروتینین، ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر لوپیتین و ۰/۵ میلی‌مول وانادات سدیم) همگن شد و هیروکسید سدیم (NaOH) یک نرمال به همه‌ی نمونه‌ها برای رسیدن به pH تا حد ۷/۵ اضافه گردید. سپس، نمونه‌ها برای ۳ دقیقه (با شتاب ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری شد. چاهک‌های ELISA به مدت یک شب با بافر پوشاننده‌ی کربنات انکوبه و آن گاه، به مدت یک ساعت با بافر بلوک کننده‌ی Tris-buffered saline (TBS)، بلوک و نمونه‌های استاندارد به دست آمده، در درجه‌ی حرارت اتاق در حالی که تکان می‌خوردند، انکوبه شدند. منحنی استاندارد با استفاده از مقادیر شناخته شده از هر دو پروتئین رسم و غلظت BDNF و گیرنده‌ی TrkB توسط دستگاه ELISA با طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس، با توجه به غلظت پروتئین نمونه‌ها، مقادیر به صورت پیکوگرم در میلی‌لیتر پروتئین بیان گردید.

یافته‌ها

تأثیر ۴ هفته شنای هوازی بر میزان BDNF در بافت مغز موش‌های مدل EAE: همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، آزمون ANOVA حاکی از آن است که EAE منجر به کاهش معنی‌دار میزان BDNF ($P < ۰/۰۱$) در مقایسه با گروه شاهد شد. این کاهش معنی‌دار در گروه EAE + حلال ($P < ۰/۰۵$) و گروه EAE + محیط شنا + حلال ($P < ۰/۰۵$) نیز در مقایسه با گروه شاهد دیده شد. تجزیه و تحلیل‌های بیشتر، نشان می‌دهد که ورزش به تنهایی، اینترفرون به تنهایی و یا همراه با ورزش در موش‌های مبتلا به EAE منجر به افزایش سطح BDNF در مقایسه با گروه EAE شده است؛ با این حال، این افزایش به صورت آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که اینترفرون به تنهایی و حتی همراه با ورزش، قادر به افزایش سطح این عامل در مغز موش‌های مبتلا به EAE نبود.



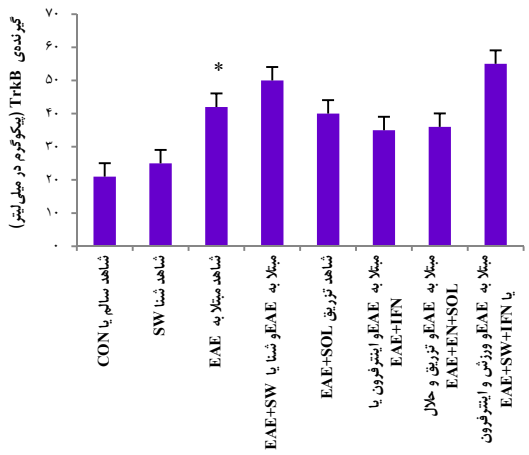
شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین غلظت Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) در گروه سالم شنا (Swim یا SW) با میانگین گروه‌های انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE)، شنا و EAE، EAE و دریافت حلال، EAE و دریافت اینترفرون بتا-۱، EAE که حلال دارو دریافت کردند و در محیط شنا قرار گرفتند و در نهایت گروه EAE و دریافت اینترفرون بتا-۱ که در تمرین‌های شنا شرکت داشتند. تأثیر شنا و تیمار اینترفرون بتا-۱ بر روی میزان عامل نورون‌زایی مشتق شده از مغز (BDNF) در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE بررسی شد.

میزان معنی‌داری: $P < ۰/۰۵$* و $P < ۰/۰۱$** مقایسه شده با گروه شاهد (Control)

تأثیر ۴ هفته شنای هوازی بر میزان گیرنده‌ی TrkB در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE: شکل ۲ نشان می‌دهد که EAE باعث افزایش معنی‌دار در سطح گیرنده‌ی TrkB ($P < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد شد. آنالیزهای آماری نیز نشان داد که گروه‌های EAE + شنا + اینترفرون بتا-۱ و EAE + شنا به صورت محسوسی منجر به افزایش این گیرنده در موش‌های مبتلا به EAE شدند. با این حال، این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این، بر اساس یافته‌های ما، اینترفرون بتا-۱ اثر معنی‌داری بر روی میزان این گیرنده در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE نداشت.

بحث

در این مطالعه‌ی تجربی مشاهده شد که EAE منجر به کاهش میزان BDNF نسبت به موش‌های سالم شده است. در راستای یافته‌های این مطالعه، مطالعات گذشته کاهش سطح بیان BDNF را در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE نشان داده‌اند (۱۷، ۱۴).



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین غلظت Tyrosine receptor kinase B (TrkB) در گروه سالم شنا (Swim یا SW) با میانگین گروه‌های انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE)، شنا و EAE، EAE و دریافت حلال، EAE و دریافت اینترفرون بتا-۱، EAE که حلال دارو دریافت کردند و در محیط شنا قرار گرفتند و در نهایت، گروه EAE و دریافت اینترفرون بتا-۱ که در تمرین‌های شنا شرکت داشتند. تأثیر شنا و تیمار اینترفرون بتا-۱ بر روی میزان گیرنده‌ی تیروزین کیناز B (TrkB) در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE بررسی شد.

میزان معنی‌داری: $P < ۰/۰۵$* مقایسه شده با گروه شاهد (Control)

علاوه بر آن، نتایج متناقضی در سنجش میزان این عامل در مطالعات پزشکی در سرم خون افراد مبتلا به MS وجود دارد. برای نمونه، برخی مطالعات، کاهش تولید BDNF را نشان می‌دهند، در حالی که تعدادی از تحقیقات افزایش سطح بیان و تولید این عامل را گزارش کرده‌اند (۲۰-۱۸).

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داده است که تیمار اینترفرون بتا-۱ در موش‌های مبتلا به EAE منجر به تغییر معنی‌داری در میزان BDNF در بافت مغزی نشده است. در این چارچوب، محققان نشان داده‌اند که تیمار اینترفرون بتا-۱، منجر به افزایش بیان BDNF توسط سلول‌های سیستم دفاعی بدن می‌شود (۲). از سوی دیگر، تضاد بین یافته‌ها بر روی تغییر سطح بیان این عامل توسط اینترفرون بتا-۱ گزارش شده است که بیانگر عدم قطعیت در مورد نقش اینترفرون بتا-۱ در مطالعات می‌باشد. برای مثال، برخی از یافته‌های پزشکی نشان داده‌اند که تیمار اینترفرون بتا-۱ موجب افزایش میزان BDNF در محیط داخلی سلول‌های تک هسته‌ای خون در بیماران مبتلا به MS می‌شود (۲۲-۲۱). در حالی که تفاوتی در مقدار این عامل در سرم این بیماران یافت نشده است (۲۴-۲۳).

علاوه بر آن، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که چهار هفته شنای هوازی توانست به صورت محسوس منجر به افزایش سطح BDNF در موش‌های مبتلا به EAE شود، اما با این حال، این افزایش به صورت آماری معنی‌دار نبود. در موافقت با این یافته‌ها، افزایش سطح BDNF پس از انجام تمرین‌های ورزشی در مغز و نخاع حیوانات سالم و در مغز انسان، البته از طریق تکنیک Microarray مشاهده شده است (۲۶-۲۵). مطالعات انسانی و حیوانی، همچنین نشان داده‌اندکه سطح پایین BDNF سرمی در بیماران مبتلا به MS پس از انجام چهار هفته ورزش هوازی، تغییر و با افزایش میزان این عامل همراه بوده است (۱۸).

این مطالعه، همچنین نمایان ساخته است که ۴ هفته شنای هوازی، توانست منجر به افزایش مقدار گیرنده‌ی TrkB در مغز موش‌های مبتلا به EAE شود. از طرف دیگر، مشاهده شد که ورزش به همراه اینترفرون بتا-۱ توانست منجر به افزایش میزان این گیرنده در موش‌های مبتلا به EAE شود. در حمایت از نتایج مطالعه‌ی حاضر، مطالعات انجام شده بر روی موش و رت‌های مبتلا به EAE افزایش بیان گیرنده‌ی TrkB را در نخاع نشان داده‌اند (۲۸-۲۷). در این تحقیق، تیمار اینترفرون بتا-۱ میزان این پروتئین را تغییر نداده است و مطالعه‌ی مدونی در این رابطه در حیوانات مدل EAE جهت مقایسه وجود نداشت. در این زمینه، گزارشی مبنی بر افزایش گیرنده‌ی TrkB به دنبال انجام ورزش تردمیل در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مشاهده شده است (۲۹). با این حال، مطالعه‌ی دیگری از عدم تغییر میزان این پروتئین در هیپوکامپ موش‌های صحرایی پس از اعمال ورزش شنا گزارش داده است (۳۰).

مطالعات گذشته، نشان داده‌اند که ورزش تردمیل و چرخ دوار به مدت ۶ هفته، منجر به افزایش معنی‌دار بیان TrkB در مغز موش‌های صحرایی می‌شود (۸). همچنین، گزارش شده است که افزایش بیان TrkB پس از ورزش، می‌تواند موجب تقویت طول آکسون و کاهش ناهنجاری‌های سیناپسی شود (۷-۶). علاوه بر آن، مطالعات و شواهد جدید نشان می‌دهند که روزانه یک کیلومتر راه رفتن روی تردمیل به مدت ۴ هفته، میزان گیرنده‌های TrkB بر روی سلوهای الیگودندروسیت را به طور معنی‌داری در ماده‌ی خاکستری نخاع افزایش داده است؛ در حالی که این اثر بر روی سلول‌های عصبی کمتر مشاهده شده است (۳۱). در این رابطه مطالعه‌ی دیگری نشان داده است که فعالیت حرکتی کوتاه مدت، منجر به افزایش بیان پروتئین این گیرنده می‌شود (۳۲). جالب توجه است که بیان Messenger RNA (mRNA) گیرنده‌ی TrkB پس از انجام ورزش به مدت کوتاهی بالا می‌ماند (۳۳). در مجموع، در مطالعه‌ی حاضر، این امکان وجود داشت که ورزش با افزایش بیان گیرنده‌ی تیروزین کیناز B، منجر به ایجاد یک مکانیسم جبرانی برای کاهش بیان BDNF در موش‌های مبتلا به EAE شده است.

در نتیجه، این مطالعه نشان می‌دهد که EAE می‌تواند منجر به

کاهش سطح BDNF و افزایش گیرنده‌ی TrkB در بافت مغز موش‌های مبتلا به EAE شود و ممکن است ورزش بتواند اثر کاهشی EAE بر روی BDNF را مهار و منجر به افزایش این عامل و همچنین، افزایش بیشتر گیرنده‌ی TrkB شود. احتمال دارد این افزایش بتواند موجب کاهش میلین‌زدایی در مغز شود که برای اثبات قطعی این یافته، مطالعات تکمیلی و بیشتری توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری فیزیولوژی ورزشی با کد ۴۰۱۴۷۰۰ می‌باشد که در دانشگاه خوارزمی به ثبت رسیده است. نویسندگان از مؤسسه‌ی اختلالات شناختی و رفتاری سالاری به خاطر همکاری صمیمانه و ارایه‌ی حیوانات مدل EAE و مسؤولین دانشکده‌ی پزشکی و بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اهواز سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372(9648): 1502-17.
2. De SL, Annunziata P, Sessa E, Bramanti P. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. J Neurol Sci 2009; 287(1-2): 17-26.
3. Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002; 132(1-2): 180-8.
4. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol 2011; 164(4): 1079-106.
5. Ziemssen T, Kumpfel T, Klinkert WE, Neuhaus O, Hohlfeld R. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: Implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. Brain 2002; 125(Pt 11): 2381-91.
6. Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, English AW. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. Exp Neurol 2008; 211(2): 489-93.
7. Krakowiak J, Liu C, Papudesu C, Ward PJ, Wilhelm JC, English AW. Neuronal BDNF signaling is necessary for the effects of treadmill exercise on synaptic stripping of axotomized motoneurons. Neural Plast 2015; 2015: 392591.
8. Kim SE, Ko IG, Shin MS, Kim CJ, Jin BK, Hong HP, et al. Treadmill exercise and wheel exercise enhance expressions of neutrophic factors in the hippocampus of lipopolysaccharide-injected rats. Neurosci Lett 2013; 538: 54-9.
9. Motl RW, Pilutti LA. The benefits of exercise training in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 2012; 8(9): 487-97.
10. Andreasen AK, Stenager E, Dalgas U. The effect of exercise therapy on fatigue in multiple sclerosis. Mult Scler 2011; 17(9): 1041-54.
11. Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Galduroz RF. Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review of experimental studies in the elderly. Arch Gerontol Geriatr 2013; 56(1): 10-5.
12. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: A systematic review of experimental studies in human subjects. Sports Med 2010; 40(9): 765-801.
13. Bansi J, Bloch W, Gamper U, Kesselring J. Training in MS: Influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial. Mult Scler 2013; 19(5): 613-21.
14. Aharoni R, Saada R, Eilam R, Hayardeny L, Sela M, Arnon R. Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 2012; 251(1-2): 14-24.
15. Majidi-Zolbanin J, Doosti MH, Kosari-Nasab M, Salari AA. Prenatal maternal immune activation increases anxiety- and depressive-like behaviors in offspring with experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience 2015; 294: 69-81.
16. 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. J Neurochem 2016; 136(Suppl 1): 63-73.
17. Chen X, Hu X, Zou Y, Pi R, Liu M, Wang T, et al. Combined treatment with minocycline and prednisone attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. J Neuroimmunol 2009; 210(1-2): 22-9.
18. Castellano V, White LJ. Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2008; 269(1-2): 85-91.
19. Frota ER, Rodrigues DH, Donadi EA, Brum DG, Maciel DR, Teixeira AL. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse. Neurosci Lett 2009; 460(2): 130-2.
20. Liguori M, Fera F, Patitucci A, Manna I, Condino F, Valentino P, et al. A longitudinal observation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Brain Res 2009; 1256: 123-8.
21. Lalive PH, Kantengwa S, Benkhoucha M, Juillard C, Chofflon M. Interferon-beta induces brain-derived neurotrophic factor in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2008; 197(2): 147-51.
22. Azoulay D, Mausner-Fainberg K, Urshansky N, Fahoum F, Karni A. Interferon-beta therapy up-regulates BDNF secretion from PBMCs of MS

patients through a CD40-dependent mechanism. J Neuroimmunol 2009; 211(1-2): 114-9.
23. Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, et al. Neurotrophic factors in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients during interferon beta therapy. Clin Immunol 2006; 118(1): 77-82.
24. Sarchielli P, Zaffaroni M, Floridi A, Greco L, Candeliere A, Mattioni A, et al. Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon-beta 1a, and high doses of immunoglobulins. Mult Scler 2007; 13(3): 313-31.
25. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. Brain Res 1996; 726(1-2): 49-56.
26. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci 2002; 25(6): 295-301.
27. Zhu W, Acosta C, MacNeil BJ, Klonisch T, Cortes C, Doupe M, et al. Spinal cord brain derived neurotrophic factor (BDNF) responsive cells in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis (MS): Implications in repair. Res Immunol 2014; 2014: 612604.
28. Khan N, Gordon R, Woodruff TM, Smith MT. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. Pharmacol Res Perspect 2015; 3(3): e00137.
29. Kim YM, Ji ES, Kim SH, Kim TW, Ko IG, Jin JJ, et al. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing hippocampal cell proliferation in quinolinic acid-induced Huntington's disease rats. J Exerc Rehabil 2015; 11(1): 5-11.
30. Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I, Morys J. Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neutrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2010; 70(4): 370-81.
31. Skup M, Dwornik A, Macias M, Sulejczak D, Wiater M, Czarkowska-Bauch J. Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. Exp Neurol 2002; 176(2): 289-307.
32. Macias M, Dwornik A, Skup M, Czarkowska-Bauch J. Confocal visualization of the effect of short-term locomotor exercise on BDNF and TrkB distribution in the lumbar spinal cord of the rat: the enhancement of BDNF in dendrites? Acta Neurobiol Exp (Wars) 2005; 65(2): 177-82.
33. Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. J Neurophysiol 2002; 88(5): 2187-95.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 35, No. 448, 4th Week, November 2017

Received: 14.08.2017

Accepted: 06.09.2017

The Effect of Four Weeks of Aerobic Swimming on the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tyrosine Receptor Kinase B (TrkB) in the Brain of Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE)

Mehdi Seyed-Alhosseini[1], Hamid Rajabi[2], Ata Allah Ghadiri[3], Reza Gharakhanlou[4], Alireza Sarkaki[5]

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is known as a neuroimmunological disease in human being. The evidences show that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its specific receptor, tyrosine receptor kinase B (TrkB) play a role in the development of multiple sclerosis. Previous studies demonstrated that various interventions affect the expression of these factors. This study aimed to investigate the effect of four weeks of aerobic swimming on the level of BDNF and TrkB in the brain of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) or animal model of multiple sclerosis.

Methods: A total number of 80 C57BL/6 mice, aging 10 to 12 weeks and weighing 20 ± 2 gram were divided into eight groups of 10, control, swimming (SW), EAE, EAE + SW, EAE + solvent (SOL), EAE + interferon-beta (IFN), EAE + environment (En) + SOL, and EAE + SW + IFN. On post-immunization day 9, animals received IFN (150 IU/g) or were subjected to swimming daily for 4 weeks (5 days/week). Brains were extracted and the levels of BDNF and TrkB were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data were analyzed using one-way ANOVA.

Findings: EAE decreased BDNF and increased TrkB level in the brain of EAE-induced mice. Level of BDNF and TrkB increased in mice brain following swimming and IFN treatment; however these alterations were not significant.

Conclusion: These findings suggest that probably swimming is more effective than IFN to alter the level of BDNF and TrkB in the brain of EAE-induced mice.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, Brain-derived neurotrophic factor, Tyrosine receptor kinase B (TrkB) receptor, Swimming

Citation: Seyed-Alhosseini M, Rajabi H, Ghadiri AA, Gharakhanlou R, Sarkaki A. **The Effect of Four Weeks of Aerobic Swimming on the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tyrosine Receptor Kinase B (TrkB) in the Brain of Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE).** J Isfahan Med Sch 2017; 35(448): 1263-70.

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- Professor, Department of Physical Education, School of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Mehdi Seyed-Alhosseini, Email: smhosein2000@gmail.com