

مقایسه تاثیر چهار هفته فعالیت ورزشی اجباری و اختیاری بر سیناپس گلوتاماترژایی شاخ خلفی نخاع موش‌های ماده C57BL6 مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی

راحله امیری رانیز (Ph.D Student)، عباسعلی گائینی* (Ph.D)، محمدرضا کردی (Ph.D)، سیروس چوبینه (Ph.D)

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۷

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱ - ۸۸۳۵ ۱۷۳۰ aagaeini@ut.ac.ir

چکیده

هدف: کاهش GLT-1 - انتقال‌دهنده گلوتامات - با فعال شدن و افزایش بیان زیرواحد گیرنده گلوتامات - NR1 - همراه است که با افزایش فعالیت پایه سلولی باعث درد عصبی در بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر مقایسه تاثیر چهار هفته زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با فعالیت ورزشی شنا بر GLT-1، NR1 و c-FOS، مارکر فعالیت نورونی در شاخ خلفی نخاع در انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) مدل حیوانی برای مطالعه بیماری MS، می‌باشد. مواد و روش‌ها: ۴۰ سر موش C57BL6 ماده به طور تصادفی به چهار گروه کنترل، EAE، شنا و زندگی در محیط غنی شده تقسیم شدند. گروه کنترل سالم تزریق سالین داشتند و در باقی گروه‌ها القا با استفاده از میلین الیگودندروسیتس گیلکوپروتئین (MOG35-55) انجام شد. پس از القای EAE، گروه فعالیت ورزشی اجباری، برنامه شنا را ۳۰ دقیقه، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته انجام دادند و گروه زندگی در محیط غنی به مدت ۴ هفته در این محیط زندگی کردند. در روز سی‌ام پس از القا، تشریح و بافت‌برداری موش‌ها انجام شد. مقادیر پروتئین GLT-1، NR1 و c-FOS با روش ایمونوهیستوشیمی سنجیده شد. یافته‌ها: یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا هر دو، در مقایسه با گروه EAE، مقادیر پروتئین GLT-1 را افزایش و مقادیر NR1 و c-FOS را در حد معناداری کاهش می‌دهد، هرچند زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با فعالیت ورزشی شنا، روش موثرتری بوده است ($P \leq 0.05$). نتیجه‌گیری: فعالیت ورزشی، به ویژه داوطلبانه، علاوه بر کاهش شدت بیماری (علائم بالینی)، می‌تواند با افزایش GLT-1، کاهش NR1 و کاهش فعالیت نورونی در شاخ خلفی، حساسیت به درد را در موش‌های مبتلا به EAE کاهش و کیفیت زندگی آن‌ها را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، فعالیت ورزشی، درد عصبی، GLT-1، NR1

مقدمه

دارد [۴،۵]. NMDA از نوع گیرنده‌های یونوتروپی گلوتامات و ناهمگون است که از دو زیرواحد ثابت NR1 (GluN1) و دو زیرواحد متغیر (GluN2A-D یا GluN3A-B) تشکیل می‌شود [۵].

انتقال‌دهنده‌های گلوتامات از جمله عواملی هستند که فعال شدن گیرنده‌های گلوتامات را تنظیم می‌کنند [۶،۲]. این انتقال‌دهنده‌ها به صورت وابسته یا مستقل از Na عمل می‌کنند. پاک‌سازی گلوتامات از شکاف سیناپسی بر عهده انتقال‌دهنده‌های وابسته به Na است و تا به حال پنج ایزوفرم از آن‌ها شناسایی شده. GLT-1 به دلیل این‌که بخش اعظم گلوتامات برداشتی بر عهده اوست از مهم‌ترین انتقال‌دهنده‌ها است [۷]. با کاهش فعالیت انتقال‌دهنده‌های گلوتامات، میزان

مالتیپل اسکلروزیس (MS) Multiple sclerosis، نوعی بیماری التهابی است که در آن میلین‌زدایی (Demyelination) در دستگاه عصبی مرکزی (Central nervous system) رخ می‌دهد [۱] و درد مزمن یکی از نشانه‌های این بیماری است [۲] که بر کیفیت زندگی بیماران تاثیر می‌گذارد [۳،۱]. دلیل درد نوروپاتی حساس شدن نخاع است. در واقع در این شرایط، آستانه فعال شدن نورون‌های شاخ خلفی نخاع به تحریک زیان‌بار کاهش می‌یابد [۲]. گیرنده‌ها و انتقال‌دهنده‌های گلوتامات نقش مهمی در سیگنال‌های درد دارند [۴]. گلوتامات دو نوع گیرنده یونوتروپی و متابوتروپی

و همکاری‌های اولیه شواهد از دخالت دستگاه گلوتاماترژایی را در بی‌دردی ناشی از فعالیت ورزشی نشان دادند. آن‌ها می‌گویند فعالیت ورزشی با کاهش فسفردارشدن زیرواحد NR1 گیرنده NMDA در دستگاه عصبی مرکزی از ایجاد درد مزمن عضلانی جلوگیری می‌کند [۲۰]. هر چند در مجموع مطالعات اندکی درباره نقش دستگاه گلوتاماترژایی در بی‌دردی ناشی از فعالیت ورزشی انجام شده است در همین راستا، بنسون و همکارانش (۲۰۱۵) تاثیر فعالیت ورزشی اختیاری را بر پیشرفت بیماری و نشانه‌های همراه درد در موش‌های مبتلا به EAE بررسی و گزارش کرده‌اند فعالیت ورزشی اختیاری، شروع علائم بالینی را به تاخیر می‌اندازد و میزان نفوذ سلول‌های ایمنی، بیان c-FOS و نوع فسفردار شده NR1 - زیرواحد گیرنده NMDA - را در شاخ خلفی نخاع کاهش می‌دهد و بدین ترتیب، به کاهش حساسیت به درد منجر می‌شود. تای و همکارانش (۲۰۲۱) آثار محیط غنی شده و کنامین را بر تسکین درد نورویاتی - در آسیب نخاعی رت‌ها بررسی و گزارش کرده‌اند هر چند زندگی در محیط غنی، میزان التهاب و بیان نوع فسفردار شده NR2B را کاهش و بیان GLT-1 را افزایش می‌دهد، ولی زندگی در محیط غنی شده در کنار کنامین، تاثیر بارزتری داشته است [۹]. محیط غنی شده نوعی از فعالیت ورزشی اختیاری است که احتمالاً در کاهش استرس چونندگان موثر است. در ای شرایط، موش‌ها در قفسی دارای چرخ گردان، لوله پلاستیکی و اسباب بازی، در مدت مشخص، زندگی می‌کنند [۲۱]. مارتینز و همکارانش (۲۰۱۷) تاثیر فعالیت ورزشی شنا را بر کاهش درد ناشی از گلوتاماترژایی بررسی و به این نتیجه رسیده‌اند که فعالیت ورزشی شایخی شدید درد ناشی از فعالیت گیرنده NMDA نخاعی را به دلیل افزایش گلوتاماترژایی می‌دهد [۴].

فعالیت ورزشی داوطلبانه و اجباری، دو نوع اصلی مداخله‌های ورزشی هستند که در چونندگان اعمال می‌شود. تفاوت اصلی بین فعالیت ورزشی اجباری و داوطلبانه، به میزان استرس ناشی از ورزش اجباری به حیوانات بستگی دارد. تفاوت دیگر با میزان فعالیت ورزشی ارتباط دارد، زیرا در فعالیت ورزشی داوطلبانه، فعالیت ریشه در تمایل حیوان به دویدن دارد [۱۴]. در مطالعات محدود گذشته، در مورد موثرترین نوع فعالیت ورزشی در کاهش درد موش‌های مبتلا به EAE اتفاق نظر وجود ندارد. هرچند پیشینه پژوهش مانند پیش‌تر پژوهش‌ها درباره موش‌های مبتلا به EAE، نزدیک به ۴ هفته بعد از القا یا کم‌تر انجام شده است، زیرا انجام فعالیت ورزشی در گذر زمان با افزایش نمرات بالینی برای موش‌ها

گلوتاماترژایی محیطی افزایش می‌یابد که باعث فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماترژایی می‌شود [۶،۲]. مطالعات نشان می‌دهند میزان GLT-1 که انتقال‌دهنده اصلی است [۹،۸] در موش‌های مبتلا به EAE کاهش می‌یابد [۲،۸].

به جز کاهش انتقال‌دهنده‌های گلوتاماترژایی، عوامل دیگری نیز در افزایش فعالیت پایه سلول‌های موجود در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) نقش دارند [۲]. التهاب با افزایش انتقال سیناپسی تحریکی و کاهش انتقال سیناپسی مهارتی، فعالیت نورونی را در شاخ خلفی نخاع افزایش می‌دهد و بدین ترتیب باعث حساسیت مرکزی می‌شود [۱۰]. افزایش فسفردارشدن زیرواحد گیرنده‌های NMDA (NR2B و NR1) نیز در زیاد شدن فعالیت پایه نورونی نقش دارند [۹،۲]. به جز رویدادهای فسفردار شدن، مطالعات جدید نشان می‌دهند عملکرد NMDA بر اثر تعداد گیرنده‌ها در سیناپس نیز کنترل می‌شود. در واقع، در شرایط التهابی، رهایش مستمر گلوتاماترژایی از منابع درد، باعث فعال شدن گیرنده NMDA در شاخ خلفی نخاع می‌شود که میزان NR1 را در سیناپس افزایش می‌دهد و در نهایت، انتقال سیناپسی را از راه NMDA تسهیل می‌کند [۱۱]. علاوه بر موارد گفته شده، زیاده‌تر شدن فعالیت نورونی نیز در افزایش بیان گیرنده NMDA حاوی NR1 [۱۱] و NR2B نقش دارد [۱۲]. برای ارزیابی فعالیت نورونی، از محصول پروتئینی ژن فوری اولیه c-FOS استفاده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد میزان آن در موش‌های مبتلا به EAE افزایش می‌یابد [۲،۱۳]. EAE مدل حیوانی بررسی بیماری MS است [۱۴] و مطالعات گوناگون EAE را با ایمن‌سازی موش‌های ماده C57BL/6 با استفاده از MOG33-35 انجام داده‌اند [۲،۳،۸،۱۳]. MOG 35-55 جز کوچکی از میلین دستگاه عصبی مرکزی است که باعث ایجاد بیماری MS از راه سلول‌های T در مدل‌های حیوانی می‌شود [۱۵-۱۷]. موش‌های C57BL/6 شناخته شده‌ترین نژاد هم‌خون مشتق شده از نژاد C57BL است. در واقع، زیرنژادها (مانند C57BL/6) به عنوان شاخه‌ای از نژاد هم‌خون تعریف می‌شود که به دلایل گوناگونی، از نظر ژنتیکی با نژاد هم‌خون اصلی متفاوت باشد. موش‌های هم‌خون از راه جفت‌گیری خواهر و برادر برای ۲۰ نسل متوالی یا بیش‌تر تولید می‌شوند [۱۸].

مطالعات گوناگون نشان می‌دهند فعالیت ورزشی درمان موثری است که تقریباً برای همه دردهای مزمن، - از جمله دردهای التهابی و نورویاتی - استفاده می‌شود [۱۹]. فعالیت ورزشی با تولید مواد ضد درد درون‌زا (Endogenous analgesic substances)، تاثیر ضد درد گذرا دارد [۴]. اسلوکا

حیوانات روزانه وزن‌کشی شدند و علائم بالینی EAE، توسط دو ناظر مستقل با توجه به مقیاس زیر ارزیابی شدند: نمره صفر = بدون بیماری، نمره ۱ = کم شدن وزن و ضعف در دم، نمره ۲ = ضعف در اندام عقبی، نمره ۳ = فلج کامل اندام عقبی، نمره ۴ = فلج اندام عقبی با ضعف یا فلج در اندام جلویی، و نمره ۵ = مرگ [۲۸، ۲۷].

پروتکل زندگی در محیط غنی شده. موش‌ها پس از القای EAE به قفسی با محیط غنی شده با ابعاد ۱×۱×۱ متر (طول، عرض و ارتفاع) منتقل شدند. قفس، ۳ چرخ گردان، اسباب بازی، نردبان، لوله‌های پلاستیکی، بطری‌های آب و ظروف غذا داشت [۲۱]. در قفس محیط غنی شده تعداد دورهای چرخ گردان و فعالیت موش‌ها با استفاده از یک بورد کامپیوتری ثبت می‌شد.

پروتکل فعالیت ورزشی شنا. در این گروه، موش‌ها در استخر شنای حیوانات (۱×۱ متر) با دمای 31 ± 1 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته (پنج روز در هفته، هر روز به مدت سی دقیقه) تمرین کردند. هم‌چنین، برای تشویق موش‌ها به شنا از اسفنج استفاده شد [۲۹].

آزمون دم در آب. برای ارزیابی تاثیر ضد درد فعالیت ورزشی آزمون غوطه‌وری دم در آب داغ انجام شد. بخش ۵ سانتی‌متری پائینی دم موش‌ها در ظرفی غوطه‌ور شد که دمای آب در آن 55 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد بود. زمان خروج دم از آب برحسب ثانیه به عنوان زمان واکنش ثبت شد [۳۰].

تست ایمونوهیستوشیمی. جهت بررسی مقدار پروتئین‌های GLT-1، NR1 و c-FOS ابتدا به طور تصادفی پنج برش با ضخامت ۵ میکرومتر از بافت نخاع برداشته، آن‌گاه تکنیک ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی با کدهای orb317613 (برای پروتئین GLT-1)، orb99445 (برای پروتئین NR1) و orb10375 (برای پروتئین c-Fos) انجام شد. بدین منظور نمونه‌های نخاع با PBS در ۴ مرحله و با فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. برای بازیابی آنتی‌ژن روی نمونه‌ها اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد. آن‌گاه به منظور خنثی‌سازی اسید، بافر بورات به مدت ۵ دقیقه اضافه و سلول‌ها با PBS شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه با هدف نفوذپذیر کردن غشای سلول‌ها استفاده شد. آن‌گاه نمونه‌ها دوباره با PBS شسته شدند و سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش‌های آنتی‌بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی اضافه شد. نمونه‌ها با PBS شست‌وشو داده شد و آنتی‌بادی رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS روی نمونه‌ها ریخته و یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد. پس از آن، نمونه‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت

سخت و نشدنی است که با کاهش مسافت طی شده مشخص می‌شود [۲۶-۲۲، ۱۳]. از طرف دیگر، سیناپس گلوتاماترژیایی (Glutamatergic Synapse) -انتقال‌دهنده و گیرنده گلوتامات- در پژوهش واحدی بررسی نشده است، از آنجایی که انتقال‌دهنده‌های گلوتامات از عوامل تنظیم‌کننده گیرنده‌های گلوتامات هستند، به‌نظر می‌رسد بررسی هم‌زمان انتقال‌دهنده و گیرنده گلوتامات یک‌جا به برخی ابهامات بهتر می‌پردازد. از این‌رو و از آنجایی که جلوگیری از افزایش التهاب، فعالیت نورونی و فعالیت گیرنده‌های گلوتامات و افزایش بیان انتقال‌دهنده‌ی گلوتامات با مداخله فعالیت ورزشی می‌تواند در کنترل درد مزمن عصبی نقش داشته باشد [۱۳، ۴]، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر چهار هفته فعالیت ورزشی شنا (فعالیت ورزشی اجباری) و زندگی در محیط غنی شده (فعالیت ورزشی اختیاری) بر سیناپس گلوتاماترژیایی در شاخ خلفی نخاع موش‌های ماده C57BL6 مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر مورد تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران قرار گرفته و شناسه IR.UT.SPORT.REC.1400.049 برای آن صادر شده است. ۴۰ سر موش مایس ماده C57BL6، ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 18 ± 2 گرم از انیستیتوپاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه علوم رفتاری و شناختی سالاری در کرج منتقل شد و به طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم ($n=10$)، کنترل EAE ($n=10$)، زندگی در محیط غنی شده + EAE ($n=10$) و فعالیت ورزشی شنا + EAE ($n=10$) تقسیم شدند. موش‌ها در هفته اول با محیط آزمایشگاه سازگار شدند و در روز سی‌ام پس از القا (دوره مزمن بیماری) در آزمون رفتاری مربوط به تحریک‌پذیری درد شرکت داده شدند. آن‌گاه، موش‌ها با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) کاملاً بی‌هوش و آن‌گاه تشریح و بافت‌برداری شدند. القای EAE و ارزیابی بالینی. برای القای EAE، موش‌های C57BL6 با ۵۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیتی گلیکوپروتئین (MOG35-55) که در محلول بافر شده با فسفات (PBS) حل شده بود، و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دوای کامل فروند (CFA) ایمن‌سازی شدند. هم‌زمان با تزریق اول و ۴۸ ساعت بعد از آن، ۱۰۰ نانوگرم پرتوسیس تاکسین، داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد. هم‌زمان با باقی گروه‌ها، گروه کنترل نیز تزریق سالین داشت. برای ارزیابی وزن بدن،

شاپیرو ویلک (Shapiro Wilk) برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها، از آزمون لوین (Leven) برای بررسی همگن بودن واریانس‌ها و از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی اختلاف در بین گروه‌ها استفاده شد. برای تجزیه تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و تمام تحلیل‌ها در سطح معناداری ۰/۰۵ بررسی شد.

نتایج

یافته‌های توصیفی پژوهشی حاضر در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به اطلاعات جدول ۱، علائم بالینی در گروه‌های پژوهش از روز ۱۳ پس از القا آغاز شده است. میانگین روزانه فعالیت موش‌ها در چرخ گردان محیط غنی شده، $37/0 \pm 700/12/23$ دور است.

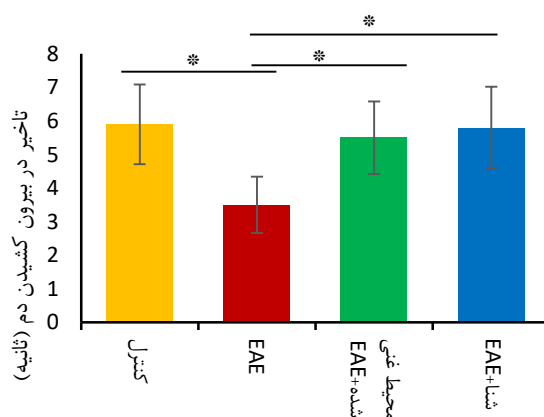
نتایج آزمون غوطه‌وری در آب گرم نشان می‌دهد زندگی در محیط غنی‌شده و فعالیت ورزشی شنا حساسیت به درد را در دوره مزمن بیماری در حد معناداری کاهش داده‌اند ($P \leq 0/05$). زندگی در محیط غنی‌شده و فعالیت ورزشی شنا، زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب گرم را در مقایسه با گروه EAE در دوره مزمن بیماری ($F=10/55$ ، $P=0/00$)، شکل ۱) افزایش دادند.

۵ دقیقه با PBS شست‌وشو داده شد و ۱۰۰ لاندا از Linker (PVP1000D-BioSystems Diagnostic) به مدت ۱۵ دقیقه به نمونه‌ها اضافه شد. در ادامه، ۳ مرتبه با PBS شست‌وشو انجام شد و ۱۰۰ لاندا از محلول پلیمر (PVP1000D-BioSystems Diagnostic) به مدت ۳۰ دقیقه به نمونه اضافه شد. نمونه‌ها دوباره با PBS شست‌وشو داده شد و در ادامه ۱۰۰ لاندا محلول DAB (ACV999-ScyTek) به نمونه اضافه شد. نمونه‌ها پس از ۵ دقیقه با آب شست‌وشو داده شد و در انتها به مدت ۱۰ ثانیه داخل رنگ هماتوکسلین قرار داده شد. پس از آن دوباره با آب شست‌وشو داده شد و بعد از مراحل و شفاف‌سازی، المل به نمونه چسبانده شد و با میکروسکوپ نوری (LABOMED) عکس‌برداری انجام شد و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش با نرم‌افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفت و با استفاده از درصد شمارش سلول‌های بیان مثبت به کل هسته‌های موجود در بافت، به صورت داده‌های عددی توصیف شدند و مبنای بیان پروتئین به درصد گزارش شد [۳۱]. لازم به ذکر است که تعداد کل هسته‌های موجود در بافت نیز با رنگ آبی که از رنگ‌آمیزی هماتوکسلین به دست آمده است، مشاهده می‌شود. روش آماری. در این پژوهش از آمار توصیفی برای گزارش میانگین‌ها و درصد تغییرات استفاده شد. از آزمون

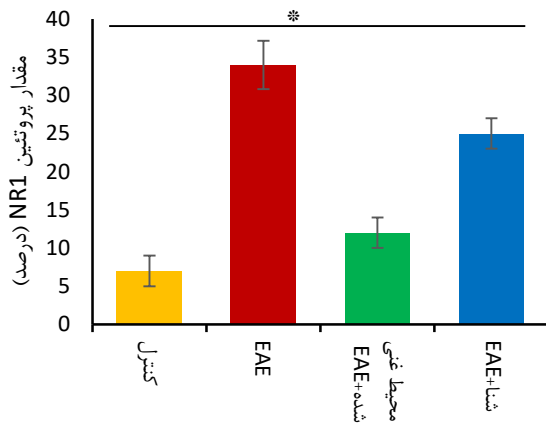
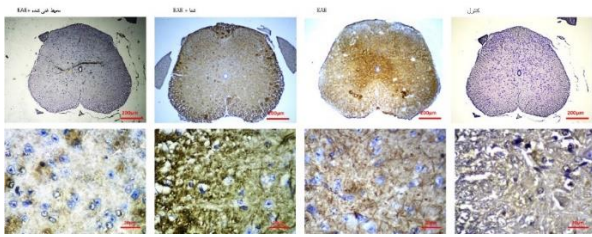
جدول ۱. علائم بالینی و وزن موش‌ها در گروه‌های پژوهش (میانگین \pm انحراف استاندارد)

گروه	شروع علائم بالینی (۱۳ روز پس از القا)	علائم بالینی (۳۰ روز بعد القا)	وزن روز القا	وزن روز شروع علائم بالینی (۱۳ روز پس از القا)	وزن (۳۰ روز پس از القا)
کنترل سالم			$17/74 \pm 0/60$	$19/70 \pm 0/91$	$20/33 \pm 0/95$
EAE	$0/52 \pm 0/52$	$0/5 \pm 0/5$	$17/71 \pm 0/47$	$18/20 \pm 0/59$	$17/8 \pm 0/65$
زندگی در محیط غنی	$0/20 \pm 0/42$	$0/50 \pm 0/52$	$17/74 \pm 0/49$	$19/82 \pm 0/93$	$22/19 \pm 0/91$
شنا	$0/4 \pm 0/16$	$0/7 \pm 0/15$	$17/71 \pm 0/15$	$17/14 \pm 0/39$	$18/96 \pm 0/56$

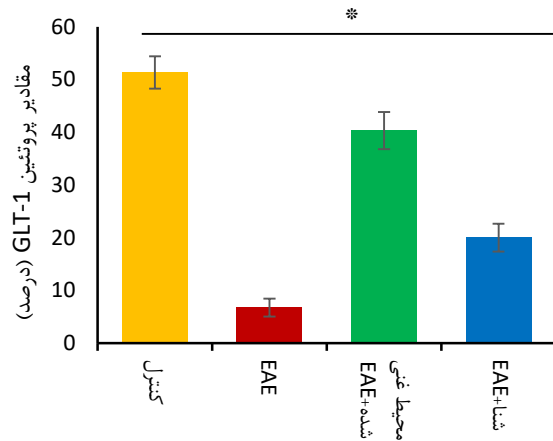
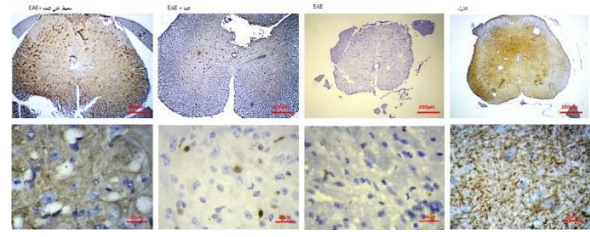
نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد بین گروه‌های پژوهش در مقدار پروتئین GLT-1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود دارد ($F=185/56$ ، $P=0/00$ ، شکل ۲). مقدار پروتئین GLT-1 در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع در حد معناداری کاهش یافته است ($P=0/00$) و زندگی در محیط غنی‌شده و فعالیت ورزشی شنا مقدار پروتئین GLT-1 را در مقایسه با گروه EAE افزایش داده است ($P=0/000$ ، $P=0/001$)، شکل ۲).



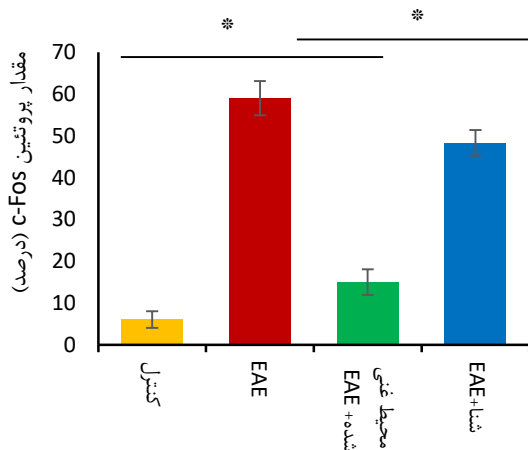
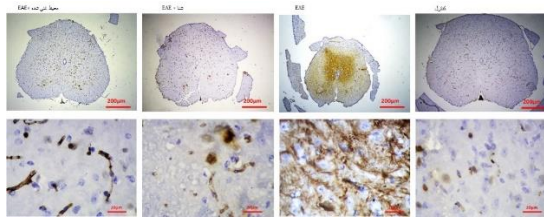
شکل ۱. آزمون بیرون کشیدن دم از آب. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد زندگی در محیط غنی‌شده و فعالیت ورزشی شنا در مقایسه با گروه EAE، زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم را در دوره مزمن بیماری افزایش داد $P \leq 0/05$



شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی - نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا در مقایسه با گروه EAE مقدار پروتئین NR1 را در شاخ خلفی نخاع (لامینای I-II) کاهش می‌دهد $p < 0.05$ *



شکل ۳. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا در مقایسه با گروه EAE مقدار پروتئین GLT-1 را در شاخ خلفی نخاع (لامینای I-II) افزایش می‌دهد $P \leq 0.05$ *



شکل ۴. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی - نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا در مقایسه با گروه EAE مقدار پروتئین c-Fos را در شاخ خلفی نخاع (لامینای I-II) کاهش می‌دهد $P \leq 0.05$ *

نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد بین گروه‌های پژوهش در مقدار پروتئین NR1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود دارد (شکل ۳، $P=0.00$ ، $F=192/86$). مقدار پروتئین NR1 در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع در حد معناداری افزایش یافته است ($P=0.00$) و زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا مقدار پروتئین NR1 را در مقایسه با گروه EAE کاهش داده است ($P=0.01$ ، $P=0.00$) (شکل ۳).

نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد بین گروه‌های پژوهش در مقدار پروتئین c-FOS در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود داشت (شکل ۴، $P=0.00$ ، $F=86/28$). مقدار پروتئین c-FOS در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع در حد معناداری افزایش یافته است ($P=0.00$) و زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا مقدار پروتئین c-FOS را در مقایسه با گروه EAE کاهش داده است ($P=0.00$) (شکل ۴).

بحث و نتیجه گیری

فعالیت بدنی بخش مهمی از مدیریت بیماری MS محسوب می‌شود و پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد فعالیت بدنی شدت علائم بیماری در EAE را کاهش می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد چهار هفته فعالیت ورزشی اجباری (شنا) و اختیاری (زندگی در محیط غنی شده) حساسیت به درد را کاهش می‌دهد و دلیل آن احتمالاً افزایش انتقال‌دهنده‌های گلوتامات، کاهش NR1 و فعالیت نورونی است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد چهار هفته زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا - هر دو - باعث افزایش معنادار مقادیر GLT-1 در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با گروه EAE می‌شود. تفاوت بین دو گروه معنادار و مقادیر GLT-1 در گروه زندگی در محیط غنی شده بیش‌تر از گروه فعالیت ورزشی شنا بوده است (۴۰ درصد در مقابل ۲۰ درصد). پژوهشی یافت نشد که در آن‌ها فعالیت ورزشی با هدف برآورد آسیب ناشی از اختلال گلوتاماترژیبایی بررسی شده باشد. با وجود این، تای و همکارانش [۹] گزارش کردند زندگی در محیط غنی شده مقدار GLT-1 را افزایش می‌دهد. آن‌ها عنوان کردند زندگی در محیط غنی شده از راه کاهش فعالیت میکروگلیا و کاهش ارتباط نورون و میکروگلیا پاسخ گلوتاماترژیبایی را تعدیل می‌کند. نتیجه مطالعه آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر همسو بود. انتقال‌دهنده‌های گلوتامات در سطح فرآیندهای پیش‌سیناپسی آستروسیت بیان می‌شوند [۳۲]. التهاب (IL-1 β) ابتدا باعث trafficking انتقال‌دهنده‌های گلوتامات (GLT-1, GLAST) از طریق مسیر سیگنالی Ca/PKC می‌شود و بعد با اندوسیتوز وابسته به dynamin که به یک پارچگی فیلامنت اکتین بستگی دارد، میزان انتقال‌دهنده‌های گلوتامات را کاهش می‌دهد [۳۳]. کاهش GLT-1 در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE با جذب گلوتامات را مختل می‌کند در نتیجه میزان گلوتامات خارج سلولی افزایش پیدا می‌کند [۲] و باعث فعال شدن بیش از حد گیرنده‌های گلوتامات می‌شود [۳۳] که منجر به حساسیت مرکزی می‌شود [۱۰]. به علاوه، افزایش گلوتامات خارج سلولی منجر به سرریز گلوتامات به سیناپس‌های مجاور و فعال شدن سلول‌های دورتر در شاخ خلفی نخاع شود که باعث فعال‌سازی مداوم سلولی و تحریک‌پذیری بیش از حد [۲] و کاهش آستانه درد می‌شود [۸] که از موارد فوق به عنوان دلیل زمینه‌ای درد نوروپاتی در MS یاد می‌شود [۲، ۸]. فعالیت ورزشی با کاهش التهاب [۳۵، ۳۴، ۱۳] از کاهش میزان انتقال‌دهنده گلوتامات جلوگیری و میزان GLT-1 را در موش‌های مبتلا به EAE افزایش می‌دهد.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد چهار هفته زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا - هر دو - باعث کاهش معنادار مقادیر NR1 در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با گروه EAE شده است. تفاوت بین دو گروه معنادار بود و مقادیر NR1 در گروه زندگی در محیط غنی شده کم‌تر از گروه فعالیت ورزشی شنا است. پژوهشی وجود ندارد که در آن، تاثیر فعالیت ورزشی شنا و زندگی در محیط غنی شده را بر میزان NR1 در موش‌های مبتلا به EAE مقایسه کرده باشد. در نزدیک‌ترین پژوهش چن و همکارانش (۲۰۱۳) تاثیر فعالیت ورزشی را بر سایتوکاین‌های التهابی و میزان NR1 در مدل درد پس از جراحی در رت‌ها بررسی و گزارش کرده‌اند فعالیت ورزشی اجباری دویدن روی ترمیل (۵ دقیقه گرم کردن، ۵۵ دقیقه فعالیت، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته) میزان NR1 را کاهش می‌دهد. نتیجه مطالعه آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر همسو است. فعال شدن گیرنده‌های سایتوکاین‌ها در محل‌های پیش‌سیناپسی به فسفردار شدن و فعال شدن کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی (P-ERK) و (P-p38) منجر می‌شود که آن‌ها به نوبه خود با فعال کردن کانال‌های یونی TRPV1 و Nav1.7/1.8 باعث رها شدن گلوتامات از وزیکول‌های پیش‌سیناپسی [۳۶] و فعال شدن گیرنده‌های گلوتامات به ویژه NMDA می‌شود. فعال شدن NMDA باعث افزایش کلسیم درون سلولی در نورون‌های شاخ خلفی نخاع می‌شود که به فعال شدن PKA و آبشارهای کینازی دیگر منجر می‌شود [۴]. PKA زیرواحد گیرنده NMDA یعنی NR1 را فسفردار و فعال (p-NR1) می‌کند [۲۰، ۴] به علاوه، PKA، کانال‌های کلسیم ولتاژدار را فسفردار و فعال و کانال‌های پتاسیم ولتاژدار را مهار می‌کند [۳۶، ۴]. از این رو گلوتامات باعث حساسیت محیطی و مرکزی می‌شود [۳۶، ۴]. فعالیت ورزشی از راه فعال کردن گیرنده‌های Opioids، Adenosine و Cannabinoid که گیرنده‌های جفت شده با G-protein (G-PCR) هستند [۳۷] تاثیر ضد درد (Analgesic effect) خود را اعمال می‌کند [۳۸، ۴]. گیرنده‌های Opioid (از جمله MOR) گیرنده‌های جفت شده با G-protein هستند، بعد از اتصال آگونیست، گیرنده‌های Opioid با G-Protrin (G_i) جفت می‌شود. زیرواحد α با اتصال به GTP از G $\beta\gamma$ جدا می‌شود و این رخداد به G_{ai} اجازه می‌دهد آدنیلات سیکلاز (AC) را مهار کند که در نتیجه آن cAMP کاهش می‌یابد و PKA مهار می‌شود. با مهار PKA، شکل فسفردار شده (p-NR1) NR1 کاهش می‌یابد [۳۷، ۲۰، ۴]. از آنجایی که فعالیت گیرنده NMDA (p-NR1) عامل افزایش‌دهنده

ساعت فعالیت ورزشی اختیاری (دویدن روی چرخ گردان) بیان c-FOS را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE کاهش می‌دهد. نتیجه مطالعه آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر همسو است. افزایش فعالیت نورونی در شاخ خلفی نخاع، جدای از نقشش در افزایش بیان گیرنده گلوتامات [۱۲]، در کل باعث افزایش پردازش درد می‌شود [۲، ۱۳]. و مطالعات نشان می‌دهد موش‌های مبتلا به EAE، به دلیل کاهش انتقال دهنده‌های گلوتامات، گلیوز و التهاب، فعالیت مداوم و خیلی زیاد سلولی را در شاخ خلفی نخاع دارند [۲]. جدا از نقش انتقال‌دهنده‌های گلوتامات که توضیح داده شد، گلیابهای فعال و سلول‌های التهابی با رها کردن التهاب، تحریک‌پذیری و فعال شدن نورون‌ها را در نخاع افزایش می‌دهند [۲]. فعالیت ورزشی از راه کاهش التهاب [۳، ۳۴، ۱۳]، افزایش انتقال‌دهنده‌های گلوتامات، کاهش p-NR1 [۴، ۱۳] و میزان NR1 سیناپس [۴۲]، میزان c-FOS را کاهش می‌دهد.

در انتها، با توجه به این‌که GABA و گلوتامات - هر دو - برای عملکرد طبیعی دستگاه عصبی مرکزی حیاتی هستند ولی آثار مخالفی بر پیام‌رسانی در دستگاه عصبی مرکزی دارند، پیشنهاد می‌شود تاثیر فعالیت ورزشی بر گابا در موش‌های مبتلا به EAE بررسی شود. این موضوع شاید بتواند جنبه دیگری از عوامل موثر بر درد ناشی از EAE را روشن کند. یافته‌های پژوهشی این مطالعه نشان می‌دهد زندگی در محیط غنی شده و فعالیت ورزشی شنا - هر دو - می‌توانند فعالیت نورونی غیرطبیعی در شاخ خلفی و حساسیت بیش از حد به درد را در موش‌های EAE کاهش دهند. هرچند به مطالعات زیادتری نیاز است تا برتری روشی را به دیگری نشان دهد، اما با توجه یافته‌های پژوهش حاضر، زندگی در محیط غنی شده - به عنوان فعالیت ورزشی اختیاری - در مقایسه با شنا - به عنوان فعالیت ورزشی اجباری - عامل موثرتری در کاهش علائم درد در موش‌های مبتلا به EAE است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر از رساله دکتری نویسنده اول در گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، استخراج شده است. از تمامی کسانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

NR1 در سیناپس است که دلیل آن PKA است [۱۱] می‌تواند گنت فعالیت ورزشی از راه فعال کردن گیرنده Opioid میزان NR1 را کاهش می‌دهد. همچنین، Cannabinoid و Adenosine با فعال کردن G-Protein مهاری، از طریق cAMP، با افزایش تحریک‌پذیری گیرنده درد مقابله می‌کنند و آثار ضد درد نشان می‌دهند [۳۸، ۳۷، ۴]. فعال شدن MOR که در لایه سطحی شاخ خلفی نخاع قرار دارند، به علاوه کاهش p-NR1 و میزان NR1 در سیناپس، با مهار کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (VDCC) Voltage-dependent Ca channel آزادسازی میانجی عصبی (گلوتامات) را کاهش می‌دهد و از این راه نیز تاثیر ضد درد خود را اعمال می‌کند [۳۹].

با وجود این، تجویز طولانی مدت آگونیست گیرنده μ -opioid برای درد مزمن می‌تواند به تحمل ضد درد (Analgesic tolerance) منجر شود که عامل اصلی برای تسکین کافی یا مناسب درد است. تحمل ضد درد پدیده‌ای است که قرار گرفتن مکرر در معرض آگونیست اپیوئید به کاهش اثر درمانی یا نیاز به دوز بالاتر برای حفظ همان اثر مسکن منجر می‌شود [۴۰].

درمان با مواد افیونی باعث افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA می‌شود. افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA پیش سیناپسی باعث افزایش رهایی گلوتامات سیناپسی و ورودی درد به نورون‌های شاخ خلفی نخاع می‌شود که در نهایت به پردردی و تحمل مواد افیونی منجر می‌شود. در مقابل، فعالیت گیرنده‌های NMDA پس سیناپسی در شاخ خلفی نخاع با درمان مزمن مورفین کاهش می‌یابد و این کاهش پاسخ تطبیقی ثانویه به افزایش انتشار گلوتامات پیش‌سیناپسی از آوران‌های اولیه بیان‌کننده TRPV1 است. نتایج نشان می‌دهد آوران‌های اولیه بیان‌کننده TRPV1 با تاثیر ضد دردی مواد افیونی مقابله می‌کند و پردردی ناشی از مواد افیونی به دلیل بیش‌فعالی آوران‌های اولیه درد است. ظاهراً کاهش فعالیت گیرنده‌های NMDA پس سیناپسی به دلیل درونی‌سازی از راه آندوسیتوز است [۴۰]. مطالعات نشان می‌دهد افزایش برداشت گلوتامات خارج سلولی از راه GLT-1، تحمل و وابستگی مواد افیونی (مورفین) را کاهش می‌دهد [۴۱].

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد ۴ هفته فعالیت ورزشی شنا و زندگی در محیط غنی شده - هر دو - باعث کاهش معنادار بیان پروتئین c-FOS در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE می‌شود. تفاوت بین دو گروه معنادار و گروه زندگی در محیط غنی در مقایسه با فعالیت ورزشی شنا باعث کاهش بیش‌تر پروتئین c-FOS شده است. در همین راستا، بنسون و همکارانش (۲۰۱۵)، گزارش کرده‌اند، روزانه یک

مشارکت و نقش نویسندگان

عباسعلی گائینی، محمدرضا کردی و سیروس چوبینه: ایده و طراحی مطالعه، راحله امیری رانیز: جمع‌آوری داده‌ها، راحله امیری رانیز و عباسعلی گائینی: آنالیز و تفسیر نتایج. راحله امیری رانیز و عباسعلی گائینی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نموده‌اند.

منابع

- [11] Yang X, Yang HB, Xie QJ, Liu XH, Hu XD. Peripheral inflammation increased the synaptic expression of NMDA receptors in spinal dorsal horn. *Pain* 2009; 144: 162-169.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.005>
PMid:19427735
- [12] Duan XL, Guo Z, He YT, Li YX, Liu YN, Bai HH, et al. SNAP25/syntaxin4/VAMP2/Munc18-1 complexes in spinal dorsal horn contributed to inflammatory pain. *Neuroscience* 2020; 429: 203-212.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.003>
PMid:31962145
- [13] 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). *Exp Neurol* 2015; 271: 279-290.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.017>
PMid:26033473
- [14] Einstein O, Katz A, Ben-Hur T. Physical exercise therapy for autoimmune neuroinflammation: Application of knowledge from animal models to patient care. *Autoimmun Rev* 2022; 21: 103033.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103033>
PMid:34995760
- [15] Dias AT, De Castro SB, Alves CC, Mesquita FP, De Figueiredo NS, Evangelista MG, et al. Different MOG35-55 concentrations induce distinguishable inflammation through early regulatory response by IL-10 and TGF- β in mice CNS despite unchanged clinical course. *Cell Immunol* 2015; 293: 87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.12.009>
PMid:25585346
- [16] Miyamura S, Matsuo N, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG 35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: a model of chronic multiple sclerosis. *Bio Protocol* 2019; 9: e3453.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3453>
PMid:33654948 PMCID:PMC7853963
- [17] Mendel I, de Rosbo NK, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor β expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1951-1959.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830250723>
PMid:7621871
- [18] Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 2009; 58: 141-149.
<https://doi.org/10.1538/expanim.58.141>
PMid:19448337
- [19] Baratzadeh H, Safakhah HA, Rashidy-Pour A, Talebi A, Jarrahi M. Effects of co-administration of chronic curcumin and forced exercise on behavioral pain responses in the neuropathic pain model of chronic constriction injury in rats. *Koomeh* 2022; 24: 366-375. (Persian).
- [20] Sluka KA, O'Donnell JM, Danielson J, Rasmussen LA. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. *J Appl Physiol* 2013; 114: 725-733.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01317.2012>
PMid:23271699 PMCID:PMC3615604
- [21] Fournier AP, Baudron E, Wagnon I, Aubert P, Vivien D, Neunlist M, et al. Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 2020; 6: 2055217320959806.
<https://doi.org/10.1177/2055217320959806>
<https://doi.org/10.1101/2020.04.10.033662>
PMid:33101703 PMCID:PMC7550951
- [22] Souza PS, Gonçalves ED, Pedrosa 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. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 4723-4737.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0014-0>
PMid:27447807

- [1] Moghadasi A, Ghasemi G, Abbasi M. Effects of total body resistance exercise on sexual function and quality of life in female with multiple sclerosis. 2021.
<https://doi.org/10.52547/koomeh.23.5.627>
- [2] Olechowski CJ, Parmar A, Miller B, Stephan J, Tenorio G, Tran K, et al. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 2010; 149: 565-572.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.03.037>
PMid:20399559
- [3] Yuan S, Shi Y, Tang SJ. Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 904-913.
<https://doi.org/10.1007/s11481-012-9370-3>
PMid:22547300
- [4] Martins DF, Siteneski A, Ludtke DD, Dal-Secco D, Santos AR. High-intensity swimming exercise decreases glutamate-induced nociception by activation of G-protein-coupled receptors inhibiting phosphorylated protein kinase A. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 5620-5631.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0095-9>
PMid:27624384
- [5] Laumet G, Chen SR, Pan HL. Nmda receptors and signaling in chronic neuropathic pain. *NMDA Recept Spring* 2017; p: 103-119.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-49795-2_6
- [6] Weng HR, Gao M, Maixner DW. Glycogen synthase kinase 3 beta regulates glial glutamate transporter protein expression in the spinal dorsal horn in rats with neuropathic pain. *Exp Neurol* 2014; 252: 18-27.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.018>
PMid:24275526 PMCID:PMC3946993
- [7] Tao YX, Gu J, Stephens Jr RL. Role of spinal cord glutamate transporter during normal sensory transmission and pathological pain states. *Mol Pain* 2005; 1: 1744-8069-1-30.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-1-30>
PMid:16242033 PMCID:PMC1274343
- [8] Olechowski CJ, Tenorio G, Sauve Y, Kerr BJ. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* 2013; 241: 113-121.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.12.012>
PMid:23291347
- [9] Tai W, Sun L, Li H, Gu P, Joosten E, Cheung C. Additive effects of environmental enrichment and ketamine on neuropathic pain relief by reducing glutamatergic activation in spinal cord injury in rats. *Front Neurosci* 2021; 15: 635187.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.635187>
PMid:33828447 PMCID:PMC8019908
- [10] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neuroscience* 2008; 28: 5189-5194.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>
PMid:18480275 PMCID:PMC2408767

- Glia 2014; 62: 1093-1109.
<https://doi.org/10.1002/glia.22665>
 PMID:24677092
- [34] Mifflin KA, Yousuf MS, Thorburn KC, Huang J, Pérez-Muñoz ME, Tenorio G, et al. Voluntary wheel running reveals sex-specific nociceptive factors in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pain* 2019; 160: 870-881.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001465>
 PMID:30540622
- [35] Xie Y, Li Z, Wang Y, Xue X, Ma W, Zhang Y, Wang J. Effects of moderate-versus high-intensity swimming training on inflammatory and CD4+ T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunology* 2019; 328: 60-67.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.12.005>
 PMID:30583216
- [36] Ji RR, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology* 2018; 129: 343-366.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>
 PMID:29462012 PMCID:PMC6051899
- [37] Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 351-369.
<https://doi.org/10.1124/pr.56.3.2>
 PMID:15317908
- [38] Martins D, Mazzardo-Martins L, Soldi F, Stramosk J, Piovezan A, Santos A. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. *Neuroscience* 2013; 234: 69-76.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.042>
 PMID:23291454
- [39] Lee JJ, Hahm ET, Min BI, Cho YW. Activation of protein kinase C antagonizes the opioid inhibition of calcium current in rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res* 2004; 1017: 108-119.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.025>
 PMID:15261106
- [40] Zhao YL, Chen SR, Chen H, Pan HL. Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptor activity in spinal cords: implications for opioid hyperalgesia and tolerance. *J Biol Chem* 2012; 287: 25073-25085.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378737>
 PMID:22679016 PMCID:PMC3408179
- [41] Nakagawa T, Ozawa T, Shige K, Yamamoto R, Minami M, Satoh M. Inhibition of morphine tolerance and dependence by MS-153, a glutamate transporter activator. *Eur J Pharmacol* 2001; 419: 39-45.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00965-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00965-7)
 PMID:11348628
- [42] Chen YW, Lin MF, Chen YC, Hung CH, Tzeng JI, Wang JJ. Exercise training attenuates postoperative pain and expression of cytokines and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in rats. *Reg Anesth Pain Med* 2013; 38: 282-288.
<https://doi.org/10.1097/AAP.0b013e31828df3f9>
 PMID:23640243
- [23] Pryor WM, Freeman KG, Larson RD, Edwards GL, White LJ. Chronic exercise confers neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2015; 93: 697-706.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23528>
 PMID:25510644
- [24] Patel DI, White LJ. Effect of 10-day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013; 38: 194-199.
<https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0303>
 PMID:23438232
- [25] Le Page C, Bourdoulous S, Beraud E, Couraud P, Rieu M, Ferry A. Effect of physical exercise on adoptive experimental auto-immune encephalomyelitis in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; 73: 130-135.
<https://doi.org/10.1007/BF00262821>
 PMID:8861681
- [26] Le Page C, Ferry A, Rieu M. Effect of muscular exercise on chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2341-2347.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.5.2341>
 PMID:7868453
- [27] Khezri S, Javan M, Baharvand H, Semnani S. Reaction of subventricular zone stem cells to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse. *Physiol Pharmacol* 2011; 15: 229-240.
- [28] Segal JP, Bannerman CA, Silva JR, Haird CM, Baharnoori M, Gilron I, Ghasemlou N. Chronic mechanical hypersensitivity in experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by disease severity and neuroinflammation. *Brain Behav Immun* 2020; 89: 314-325.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.010>
 PMID:32688029
- [29] 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. *J Neuroimmunology* 2020; 341: 577172.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577172>
 PMID:32028123
- [30] Li Z, Wang Y, Zhao J, Zhang H. Dieckol attenuates the nociception and inflammatory responses in different nociceptive and inflammatory induced mice model. *Saudi J Biol Sci* 2021; 28: 4891-4899.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.021>
 PMCID:PMC8381058
- [31] Quchan AH, Kordi MR, Namdari H, Shabkhiz F. Voluntary wheel running stimulates the expression of Nrf-2 and interleukin-10 but suppresses interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neur Lett* 2020; 738: 135382.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135382>
 PMID:32931861
- [32] Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells* 2019; 8: 184.
<https://doi.org/10.3390/cells8020184>
<https://doi.org/10.3390/cells8050400>
- [33] Yan X, Yadav R, Gao M, Weng HR. Interleukin-1 beta enhances endocytosis of glial glutamate transporters in the spinal dorsal horn through activating protein kinase C.

Comparison of the effect of four weeks of forced and voluntary exercise on glutamatergic synapse in the spinal dorsal horn of female C57BL6 mice with experimental autoimmune encephalomyelitis

Rahele Amiri Raez (Ph.D Student), Abbas Ali Gaeini (Ph.D)*, Mohammad Reza Kordi (Ph.D), Siroos Chobineh (Ph.D)

Dept. of exercise physiology, Faculty of sport science, University of Tehran, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21 8835 1730

aagaieini@ut.ac.ir

Received: 14 Nov 2022; Accepted: 7 May 2023

Introduction: The decrease of GLT-1 is associated with the activation and increased expression of the glutamate receptor subunit, NR1, which causes neuropathic pain in multiple sclerosis (MS) by increasing basal cell activity. This study aimed to compare the effect of four weeks of swimming and living in an enriched environment on GLT-1, NR1, and c-FOS, a marker of neuronal activity, in the dorsal horn of the spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model used to study of MS.

Materials and Methods: forty female C57BL6 mice were randomly divided into four groups: EAE, control, swimming exercise, and enriched environment. The healthy control group received a saline injection, other groups were induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55). After the induction of EAE, the swimming group performed swimming for 30 minutes, 5 days a week for four weeks, and the environmental enrichment group lived in an enriched environment for four weeks. On day 30 post-induction, the mice were sacrificed, and the spinal cord tissue was removed. GLT-1, NR1, and c-FOS protein levels were measured by immunohistochemistry.

Results: The findings showed that living in an enriched environment and swimming exercise both significantly increased GLT-1 levels and significantly decreased NR1 and c-FOS levels compared to the EAE group. Although, living in an enriched environment compared to swimming exercise, showed that the first was a more effective method.

Conclusion: Exercise, in addition to reducing disease severity, can reduce pain sensitivity in the EAE mice and increase their quality of life by increasing GLT-1, and decreasing NR1 and c-FOS in the spinal dorsal horn.

Keywords: Multiple Sclerosis, Exercise, Neuropathic Pain, GLT-1, NR1