

Original Article

## The impact of six weeks of swimming exercise on the levels of proteins associated with the myelination of hippocampal tissue in Wistar rats with multiple sclerosis

Mohammad Rami<sup>1\*</sup>, Samaneh Rahdar<sup>2</sup>, Sayed Shafa Marashi<sup>1</sup>, Abdolhamid Habibi<sup>1</sup>

1. Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Basic Sciences, Histology Section, Faculty of Veterinary Medicine, 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 aimed to explore the impact of swimming training on the proteins critical for the myelination of hippocampal tissue in cuprizone-induced rat's model of MS.

**Materials and Methods:** In the current investigation, 20 male Wistar rats with an average age of 12 weeks and the weight of 230 g were purchased and divided randomly 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 for 12 weeks. Upon confirming MS induction through the rotarod test, rats underwent a six-week swimming protocol. In the first week, they performed 10 min swimming without applying loads, and thereafter the duration of swimming was added by 5 min every week. In order to maintain the adaptations the duration of the swimming for the fifth and sixth weeks was constant and was kept at 30 min. At the end of the training protocol, memory and balance were assessed via shuttle box and rotarod tests. Subsequently, the hippocampal tissue was extracted, and analyzed for determining the proteolipid protein (PLP) and Myelin basic protein (MBP) protein levels by using western blot and the amount of Nerve growth factor (NGF) protein was measured by using the ELISA method. The data were analyzed using one-way ANOVA and post-hoc comparisons were made by using Tukey's test at a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The findings of the shuttle box and rotarod tests revealed that the MS group had impaired memory function and balance maintenance, but these improved significantly after swimming training ( $p < 0.001$ ). No significant difference was observed in the results of the shuttle box and rotarod tests between healthy training and healthy control groups ( $p > 0.05$ ). The results of the present study showed that NGF, PLP and MBP proteins in the patient control group were significantly lower compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, data analyses 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 was a significant difference for NGF and PLP proteins between healthy training group and healthy control group ( $p < 0.05$ ), whereas, no significant differences in MBP protein levels were found between the healthy training and healthy control groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** Based on the current research findings, it can be concluded that swimming exercise has notable anti-inflammatory and neuroprotective effects through favourable molecular adaptations, and it can probably be considered as a safe, non-pharmacological and complication-free method to improve the symptoms in MS patients.

**Keywords:** Swimming exercise, Multiple Sclerosis, Inflammatory disease, Molecular adaptation, Myelination

**How to cite this article:** Rami M, Rahdar S, Marashi S, Habibi A. The impact of six weeks of swimming exercise on the levels of proteins associated with the myelination of hippocampal tissue in Wistar rats with multiple sclerosis. *J Sport Exerc Physiol.* 2024;17(1):45-59.

\* Corresponding Author Email Address: M.rami@scu.ac.ir

<https://doi.org/10.48308/joeppa.2024.234540.1222>

Received: 21/01/2024

Revised: 20/02/2024

Accepted: 16/03/2024



## اثر شش هفته فعالیت شنا بر سطوح پروتئین‌های مرتبط با میلین‌سازی بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مدل مالتیپل اسکلروزیس

محمد رمی<sup>۱\*</sup>، سمانه راهدار<sup>۲</sup>، سید شفا مرعشی<sup>۱</sup>، عبدالحمید حبیبی<sup>۱</sup>

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

۲ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** مالتیپل اسکلروزیس (MS) بیماری مزمن التهابی، خودایمنی و چندعللی است که کیفیت زندگی مبتلایان را تا حد چشمگیری کاهش می‌دهد. از آنجا که فعالیت بدنی ممکن است دارای فواید ضدالتهابی و حفاظت از آکسون در این بیماران باشد، از این رو هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر فعالیت بدنی از نوع شنا بر محتوای برخی از پروتئین‌های مؤثر در میلین‌سازی بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری MS القاشده با کوپریزون است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سن ۱۲ هفته و وزن  $230 \pm 14$  گرم خریداری و به چهار گروه کنترل سالم، کنترل بیمار، سالم تمرین و تمرین بیمار تقسیم شدند. مدل بیماری MS با استفاده از غذای حاوی کوپریزون ۰/۵ درصد در تمام ۱۲ هفته طول پروتکل تحقیق ایجاد شد. پس از تأیید القای MS از طریق آزمون روتارود، پروتکل شنا به مدت شش هفته انجام گرفت. بدین صورت که در هفته اول ۱۰ دقیقه فعالیت شنا را بدون اعمال بار انجام دادند و به‌منظور اعمال اضافه بار مدت زمان شنا در هر هفته پنج دقیقه اضافه شد. به‌منظور حفظ سازگاری‌های حاصل از فعالیت، مدت زمان فعالیت شنا در هفته‌های پنجم و ششم ثابت و ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از پایان پروتکل تمرینی و انجام آزمون‌های روتارود و شاتل باکس به‌منظور بررسی حافظه و تعادل، بافت هیپوکمپ استخراج و مقادیر پروتئین‌های PLP و MBP با استفاده از روش وسترن بلات و مقدار پروتئین NGF با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌ها به‌وسیله آزمون آنوای یک‌راهه 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 چشمگیری یافت ( $P < 0/001$ ). همچنین تفاوت معناداری در نتایج آزمون‌های شاتل باکس و روتارود در گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). نتایج نشان داد که محتوای پروتئین‌های NGF، PLP و MBP در گروه کنترل بیمار به‌صورت معنادار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت ( $P < 0/05$ ), همچنین مقادیر این پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به‌صورت شایان توجهی افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). نتایج نشان داد که در محتوای پروتئین‌های NGF و PLP تفاوت معناداری بین گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم وجود دارد ( $P < 0/05$ ), در حالی که در محتوای پروتئین MBP تفاوت معناداری بین گروه‌های سالم تمرین و کنترل سالم وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج تحقیق حاضر احتمالاً می‌توان گفت که فعالیت ورزشی از نوع شنا با ایجاد سازگاری‌های مولکولی، تأثیرات ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی قابل توجهی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک روش ایمن، غیردارویی و بدون عارضه برای بهبود علائم مبتلایان به MS در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** فعالیت شنا، بیماری MS، بیماری التهابی، سازگاری مولکولی، میلین‌سازی

**نحوه استناد به این مقاله:** رمی م، راهدار س، مرعشی س، حبیبی ع. اثر شش هفته فعالیت شنا بر سطوح برخی پروتئین‌های مرتبط با میلین‌سازی بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مدل مالتیپل اسکلروزیس. نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی. ۱۴۰۳؛ ۱۷(۱): ۴۵-۵۹.

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

## مقدمه

آستروسیت‌ها از نوع التهابی A1 به نوع ضدالتهابی A2، افزایش تکثیر و بلوغ و بقای سلول‌های نیای الیگودندروسیت (OPC) و افزایش بازسازی، بقا و محافظت از آکسون‌ها اشاره کرد (۶). افزون بر این NGF می‌تواند باعث تحریک ساخت فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) شود (۸) که تأثیر آن در بازسازی غلاف میلین در بیماری MS 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 طرف غشای میلین روبه‌روی هم و تشکیل یک غلاف متراکم (۱۰) و نقش عملکردی آن در ارتباط با بیان بعضی پروتئین‌های مرتبط با میلین و تنظیم میلین‌سازی است (۱۱). از MBP می‌توان به‌عنوان نشانگر مناسبی برای تأیید دوباره‌سازی میلین استفاده کرد (۱). به‌طور مشابه سطوح بالایی 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 به تخریب ساختار میلین منجر شود (۱۰). بیماران مبتلا به MS سطوح بالایی از پاسخ آنتی‌بادی در برابر MBP و PLP را نشان می‌دهند (۶، ۱۲). تأثیر فعالیت ورزشی بر افزایش سطوح نوروتروفین‌ها، افزایش تعداد الیگودندروسیت‌ها، افزایش پروتئین‌های ساختاری میلین، دوباره‌سازی میلین، کاهش التهاب و حفاظت از آکسون در تحقیقات متعدد نشان داده شده است (۱۳). هرچند برخی پژوهش‌ها این موارد را گزارش نکرده‌اند؛ عدم رخداد این فواید به‌طور معمول به کم بودن حجم یا شدت تمرین استفاده‌شده در این تحقیقات نسبت داده می‌شود (۱۳). فواید مثبت فعالیت‌هایی مثل تمرینات تناوبی پر شدت (HIIT)، مقاومتی و هوازی بر بهبود شکایات و علائم بالینی بیماری

مالتیپل اسکلروزیس (MS) بیماری مزمن التهابی، خودایمنی و چندعللی است. تخمین زده می‌شود ۲/۸ میلیون نفر در سراسر جهان به MS مبتلا هستند که از بابت هزینه و زمان، بار زیادی به سیستم بهداشت و درمان تحمیل می‌کند (۱). پاتولوژی این بیماری مشخص نیست؛ اما پاسخ نامتعارف سیستم ایمنی، التهاب دستگاه عصبی مرکزی (CNS)، میلین‌زدایی، تخریب آکسون و همچنین تلاش الیگودندروسیت‌ها برای دوباره‌سازی غلاف میلین از ویژگی‌های بارز آن 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 زیادی کاهش می‌دهد و آن را دشوار می‌سازد. در زمان حمله‌های ناگهانی بیماری، سطوح فاکتور رشد عصب (NGF) در مایع مغزی نخاعی بیماران (نسبت به افراد سالم) افزایش پیدا می‌کند که بیانگر تلاش تقریباً همه سلول‌های عصبی ساکن در محل (۴)، برای حفاظت از CNS در برابر التهاب و میلین‌زدایی است (۵). NGF زیرگروه خانواده نوروتروفین‌هاست (۶) که با تحریک ساخت اینترلوکین ۱۰ (IL-10) توسط سلول‌های گلیا و T، و کاهش ساخت اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) تأثیرات ضد التهابی ایجاد می‌کند (۷). از دیگر تأثیرات مهم و مثبت NGF می‌توان به کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی (BBB)، تغییر فنوتیپ لنفوسیت‌ها به حالت ضدالتهابی با تولید سایتوکاین‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی (IL-10 و TGF- $\beta$ )، تعدیل سیستم ایمنی با تأثیر غیرمستقیم بر کاهش تکثیر سلول‌های ایمنی CD4+ و CD8+، کاهش در ارائه آنتی‌ژن توسط ماکروفاژها و میکروگلیاها با کاهش بیان مولکول‌های مجموعه سازگاری بافتی اصلی (MHC)، تبدیل فنوتیپ ماکروفاژهای التهابی M1 به ماکروفاژهای ضدالتهابی M2، کاهش آستروگلیوسیز و تغییر فنوتیپ

در این تحقیق در پی پاسخگویی به این پرسش هستیم که آیا فعالیت شنا به‌عنوان یک روش غیردارویی می‌تواند موجب تعدیل تغییرات ناشی از بیماری MS در CNS، به‌خصوص هیپوکمپ شود؟ از این‌رو هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته فعالیت شنا بر میزان پروتئین‌های MBP،NGF و PLP در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مدل MS القا شده با کوپریزون است.

### روش پژوهش

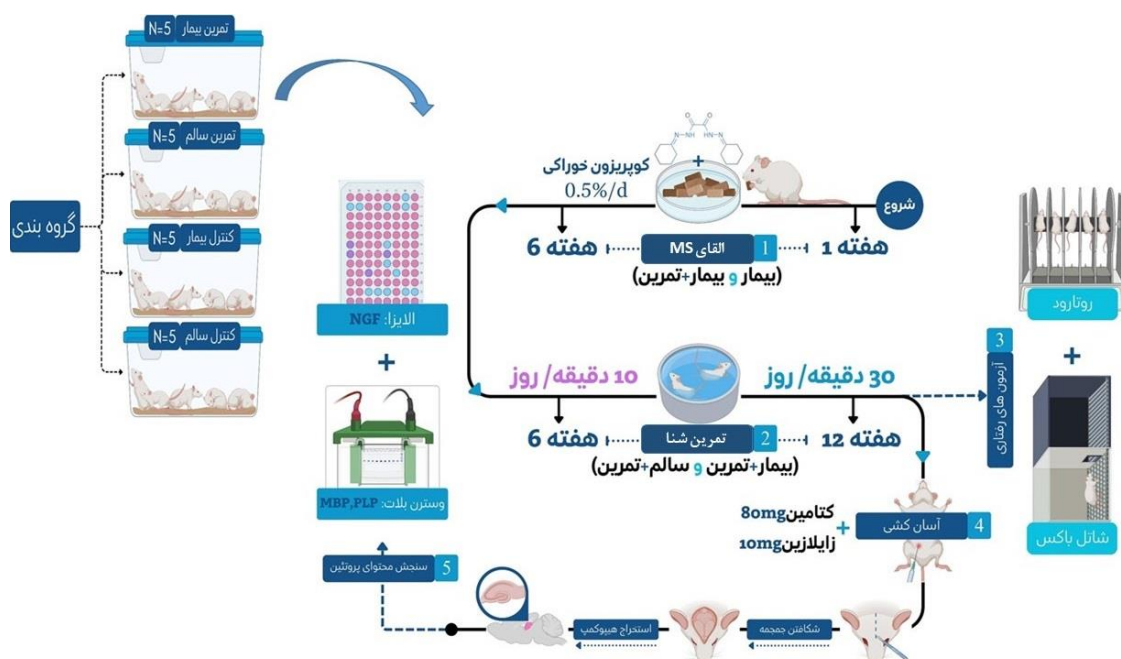
**نمونه‌های پژوهش:** پژوهش حاضر با استفاده از ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با میانگین سن ۱۲ هفته و وزن  $230 \pm 14$  گرم که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری شدند، انجام گرفت. در ابتدا به‌منظور سازگاری با محیط انجام آزمایش، موش‌های صحرایی به مدت دو هفته در خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی با دمای ۲۰ تا 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، موش‌های صحرایی به شکل تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی، در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف تقسیم شدند. شرح گروه‌بندی بدین شکل بود: کنترل سالم، کنترل بیمار، بیمار تمرین و سالم تمرین. در مرحله آشناسازی تمرین‌پذیری موش‌های صحرایی نیز بررسی شد که تمامی موش‌های صحرایی قادر به انجام فعالیت شنا بودند. تمامی مراحل تحقیق حاضر به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید و با شناسه IR.SCU.REC.1402.066 ثبت شد. طرح شماتیک پروتکل تحقیق در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است.

**روش اجرای پژوهش:** برای القای بیماری MS،

MS به شکل گسترده نشان داده شده است (۱۴-۱۷)؛ اما نتایج یک پژوهش متاآنالیز نشان می‌دهد که انجام توأمان تمرینات مقاومتی و هوازی (به‌صورت جلسات مجزا) در طول یک دوره تمرینی می‌تواند در بهبود علائم مبتلایان مؤثرتر عمل کند (۱۸). از طرفی طبق شواهد علمی، ورزش شنا در مقایسه با دیگر فعالیت‌ها می‌تواند با ایجاد سازگاری‌های مولکولی، تأثیرات ضدالتهابی و محافظت‌کننده از عصب بیشتری داشته باشد که احتمالاً به‌دلیل ماهیت ترکیبی هوازی-مقاومتی و به‌کارگیری واحدهای حرکتی بزرگ‌تر و درگیر کردن همزمان همه گروه عضلات اصلی در این نوع ورزش است (۱۹، ۲۰). این ویژگی‌ها می‌تواند موجب صرفه‌جویی در زمان و بی‌نیاز کردن مبتلایان از انجام دو یا چندین ورزش جداگانه شود. شنا در مقابل انواع دیگری از فعالیت‌های ورزشی، مانند دویدن، فشار حداقلی را به مفاصل وارد می‌کند و به افرادی که از درد مفاصل، آسیب‌دیدگی یا پوکی استخوان رنج می‌برند، اجازه می‌دهد تا به‌طور ایمن و مؤثر ورزش کنند. شنا، همچنین با افزایش جریان خون بدن به توزیع گرما کمک کرده، از افزایش دمای مرکزی بدن و خستگی جلوگیری می‌کند، سفتی عضلات را کاهش و به بیمار اجازه می‌دهد که راحت‌تر از خشکی و برای مدت طولانی‌تری به فعالیت بپردازد. پژوهش‌ها در سال‌های اخیر به این مسئله اشاره دارند که میلیون‌زادایی نه‌تنها در بخش سفید، بلکه در بخش خاکستری دستگاه عصبی از جمله قشر مخ، هیپوکمپ و مخچه نیز رخ می‌دهد (۲۱، ۲۲). از بین این نواحی، هیپوکمپ نقش بارزی در فرایند یادگیری، حافظه فضایی و تثبیت حافظه کوتاه‌مدت به حافظه بلندمدت ایفا می‌کند (۲۳، ۲۴). به‌دلیل اینکه بیماران مبتلا به MS به‌طور معمول با مشکلات شناختی، اغلب به شکل اختلالات حافظه اپیزودیک و افسردگی مواجه‌اند که ممکن است ناشی از تغییرات پاتوفیزیولوژیک در هیپوکمپ باشد (۲۵-۲۷)، این ناحیه به‌عنوان هدف اصلی تحقیق حاضر انتخاب شد.

این آزمون را تأیید می‌کنند (۳۲). بنابراین می‌توان از آزمون روتارود به‌عنوان نشانه تأیید القای بیماری MS استفاده کرد. در آزمون شاتل باکس که شامل یک دستگاه با دو بخش تاریک و روشن، و یک در که دو بخش را از هم جدا می‌کند است، آزمودنی در بخش تاریک، شوک دریافت می‌کند. مراحل این آزمون شامل یک بخش آشناسازی (به‌منظور آشنایی حیوان با دستگاه و بدون دریافت شوک) و سه بخش آموزش، آزمون و یادآوری است. در مرحله آموزش، ۲۴ ساعت پس از بخش آشناسازی، پس از ۱۰ ثانیه سپری شدن از قرار دادن آزمودنی در درون دستگاه، در بین دو محفظه باز شده و به حیوان اجازه ورود به بخش تاریک داده می‌شود. به محض ورود آزمودنی به بخش تاریک در بسته شده و شوک با فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی‌آمپر و به مدت دو ثانیه به پای آزمودنی اعمال شده و پس از سپری شدن ۲۰ ثانیه به قفس بازگردانده می‌شود. در مرحله آزمون، دو دقیقه پس از مرحله آموزش، آزمودنی مجدد در بخش روشن قرار داده می‌شود و اگر دوباره به بخش تاریک وارد شود، شوک دریافت خواهد کرد. حداکثر مدت زمان باقی ماندن موش در ناحیه تاریک ۳۰۰ ثانیه است. 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 آزمایش حذف می‌شود. در مرحله یادآوری، ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش، به‌منظور تست به یادآوری و حافظه بلندمدت، آزمودنی در محفظه روشن قرار می‌گیرد و مانند مراحل گذشته، در ۱۰ ثانیه پس از قرارگیری در ناحیه روشن، باز می‌شود، با این تفاوت که به آزمودنی شوکی وارد نخواهد شد. مدت زمان تأخیر در ورود به بخش تاریک و زمان سپری شده در بخش تاریک به‌عنوان شاخص‌های حافظه اجتنابی بلندمدت اندازه‌گیری می‌شود. زمان باقی ماندن در هر بخش تاریک و روشن در نهایت ۳۰۰ ثانیه است (۳۳).

کوپریزون با نسبت وزنی ۰/۵ درصد به پودر غذای مخصوص جوندگان اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس با اضافه کردن آب، خمیر به‌دست‌آمده به پلت غذایی تبدیل شد و به مدت شش هفته در اختیار آزمودنی‌ها قرار گرفت (۲۸). بر اساس پژوهش‌های پیشین و با استفاده از آزمون روتارود، زمانی در محدوده ۹۱ ثانیه به‌عنوان نمونه مبتلا به MS در نظر گرفته می‌شود (۲۹). آزمون‌های بررسی حافظه و حفظ تعادل: پس از پایان دوره پروتکل تمرینی به‌منظور ارزیابی هماهنگی و تعادل و حافظه احترازی از آزمون‌های روتارود و شاتل باکس استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در دوره روشنایی فعالیت موش‌های صحرایی و بین ساعات ۹ صبح تا ۱۲ ظهر انجام گرفت (۳۰). در آزمون روتارود که به‌منظور سنجش تعادل و هماهنگی بین اندام‌های حرکتی در جوندگانی مانند موش صحرایی استفاده می‌شود، یک گردانه (روی میله افقی چرخنده) با حدود ۲۰ سانتی‌متر فاصله از زمین که با صفحات کروی به چهار بخش جدا از هم تقسیم می‌شود، بخش متحرک دستگاه را تشکیل می‌دهد. در این آزمون سرعت چرخیدن گردانه 7 rpm در نظر گرفته شد که تقریباً ۱۰-۱۱ دور در دقیقه است. برای ارزیابی تعادل، موش صحرایی 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 روی میله، جداگانه برای هر آزمودنی ثبت شد. برای آموزش و یادگیری مهارت حرکت، ابتدا هر کدام از موش‌های صحرایی دو بار روی گردانه قرار گرفتند و فرصت سازگاری با دستگاه به آن‌ها داده شد و سپس سه مرتبه دیگر روی گردانه قرار گرفتند (هر بار پنج دقیقه با فاصله ۱۵ دقیقه) و میانگین آن‌ها بر حسب ثانیه ثبت شد (۳۱). تحقیقات متعدد همزمانی اثرگذاری کوپریزون در ایجاد آپوپتوز، میلین‌زدایی و اختلال حرکتی را با کاهش زمان تأخیر افتادن آزمودنی از روی گردانه دستگاه روتارود و روایی



شکل ۱. طرح شماتیک از گروه‌بندی، نحوه القای MS با کوپریزون، پروتکل تمرین شنا، آسان‌کشی، استخراج بافت و سنجش پروتئین‌ها با روش وسترن بلات و الایزا

شد و پس از انجام روش‌های متداول الکتروفورز و انتقال و بلاکینگ، نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌های اولیه MBP (Myelin Basic Protein (D8X4Q) XP RabbitmAb) و Anti-PLP (Cell Signaling Technology, #78896) با رقت ۱/۲۰۰۰ تا ۱/۵۰۰۰ در بافر PBS مورد سنجش قرار گرفتند. از آنتی‌بادی ثانویه (mouse anti-rabbit IgG) نیز با رقت ۱/۲۰۰۰ در بافر PBS برای اتصال به آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. در این تحقیق از GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb, (Cell Signaling Technology) به‌عنوان پروتئین معیار استفاده شد. سپس در اتاق تاریک و در زیر نور قرمز با استفاده از کیت ECL (abcam, 133408, آمریکا) ظهور باندها در دستگاه پردازشگر X-RAY (LD-14, چین) صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (BoninTech, چین) کاغذهای حساس به نور اسکن شدند و دانسیته باندها با استفاده نرم‌افزار دستگاه JS 2000 بررسی شد. برای سنجش مقدار پروتئین NGF

پروتکل تمرینی: پس از تأیید القای MS و وجود بیماری، پروتکل تمرین شنا در استخر مخصوص جوندگان، به مدت شش هفته انجام گرفت. پروتکل تمرینی برگرفته از تحقیق کیم و همکاران (۲۰۲۰) با اندکی تغییر (رعایت اصل اضافه بار تمرینی) است. موش‌های صحرائی گروه‌های تمرین، یک بار در روز به مدت شش هفته شنا کردند (۳۴). از عامل زمان تمرین شنا به‌عنوان اضافه بار در هفته‌های مختلف تمرینی استفاده شد، به این صورت که در هفته اول ۱۰ دقیقه فعالیت شنا را انجام دادند و در هفته‌های دوم، سوم و چهارم به‌ترتیب ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه شنا کردند. به‌منظور حفظ سازگاری‌های حاصل از فعالیت، مدت زمان فعالیت شنا در هفته‌های پنجم و ششم ثابت و ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

**روش‌های آزمایشگاهی:** به‌منظور سنجش محتوای پروتئین‌های MBP و PLP از روش وسترن بلات و برای سنجش مقدار پروتئین NGF، از روش الایزا استفاده شد. در روش وسترن بلات از ژل ۱۰% SDS-PAGE استفاده

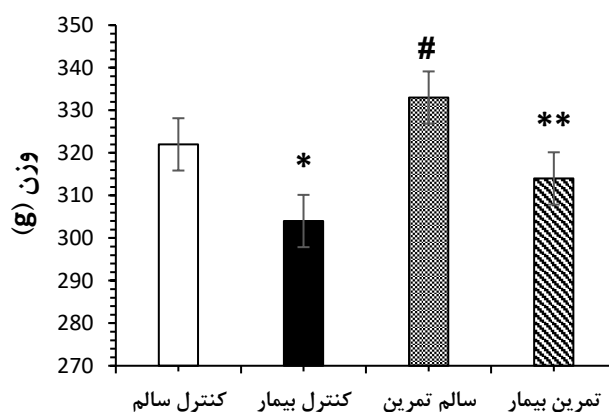
سطح معناداری آزمون  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### 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 چشمگیری یافت ( $F(4,24)=163/738$ ،  $P < 0.05$ ) که بیانگر تأثیرات احتمالی فعالیت ورزشی شنا بر جلوگیری از کاهش وزن ناشی از بیماری MS است.

از کیت الایزا Nerve Growth Factor (NGF) ELISA Kit، SunLong Biotech، SL0515Ra استفاده شد.

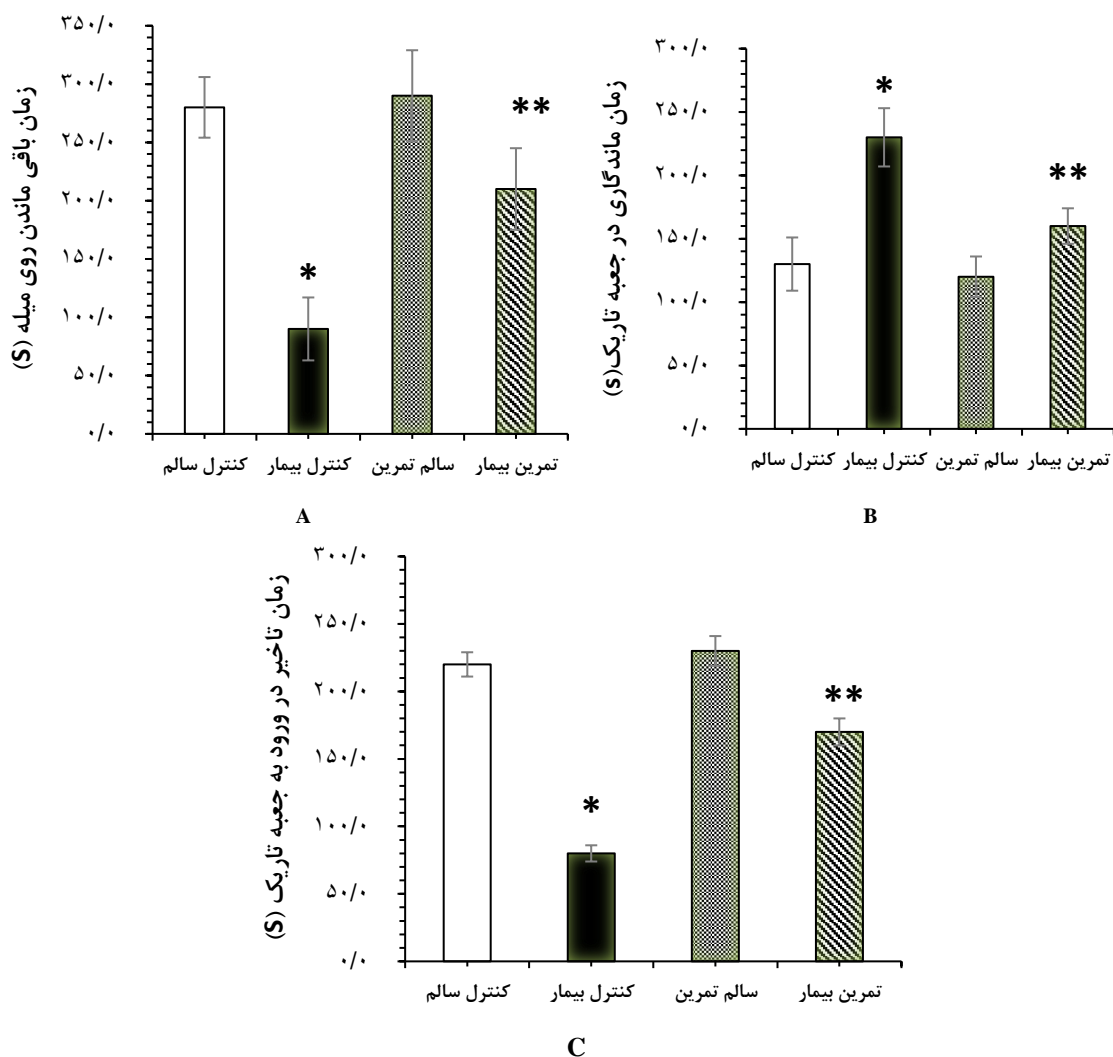
**تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد میانگین گزارش شد. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یکراهه (ANOVA) برای مقایسه میانگین گروه‌ها و از آزمون تعقیبی توکی نیز برای بررسی تفاوت گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده شد.



شکل ۲. نتایج وزن کشتی موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف. \* 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؛ # نشانه تفاوت معنادار با گروه کنترل سالم ( $P < 0.05$ ).

موش‌های صحرایی 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 چشمگیری را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ). همچنین نتایج آزمون شاتل باکس در گروه کنترل بیمار نشان داد که زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در موش‌های صحرایی 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 زیادی را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).

نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس یکراهه و آزمون تعقیبی توکی در آزمون‌های 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 روی میله در گروه کنترل بیمار در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معناداری یافت ( $P < 0.001$ ) و پس از دوره فعالیت شنا در گروه تمرین بیمار افزایش معناداری را در مدت زمان حفظ تعادل 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

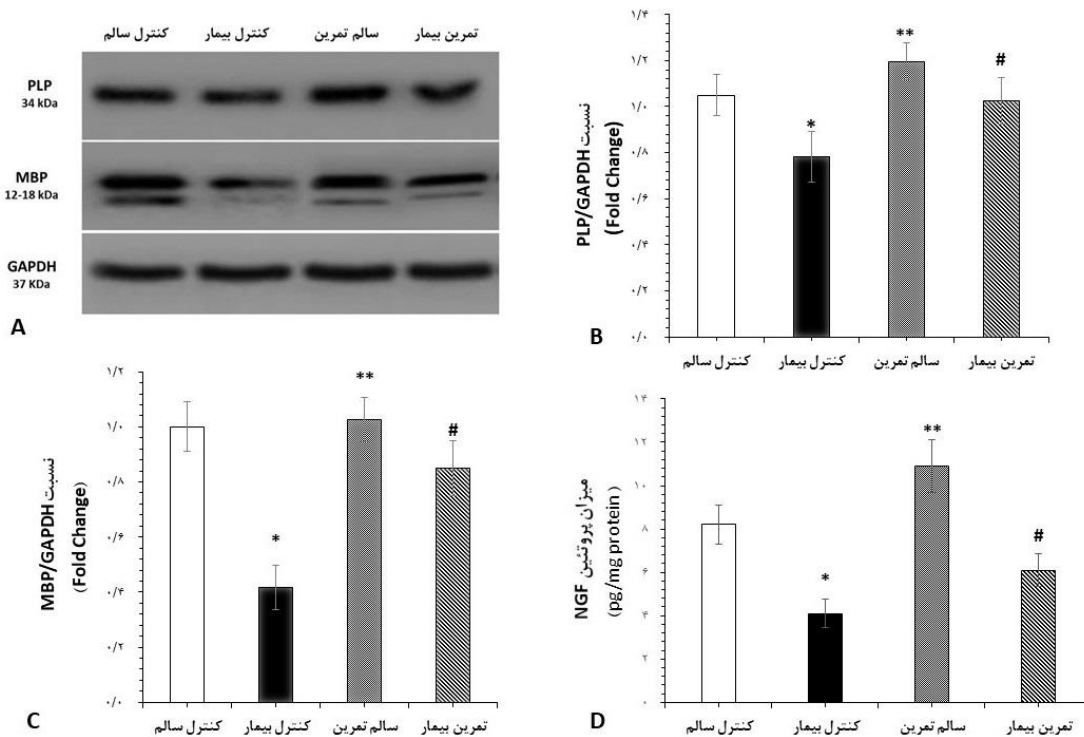


شکل ۳. نتایج آزمون‌های روتارود و شاتل باکس در گروه‌های مختلف. (A) نتایج آزمون روتارود (زمان باقی ماندن روی میله)، (B و C) نتایج شاتل باکس (زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک و زمان ماندگاری در جعبه تاریک). \* نشانه تفاوت معنادار گروه کنترل بیمار با گروه کنترل سالم و سایر گروه‌ها؛ \*\* نشانه تفاوت معنادار گروه تمرین بیمار با گروه کنترل بیمار و سایر گروه‌ها؛ (P < 0.001).

پروتئین‌ها در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به صورت شایان توجهی افزایش پیدا کرد ( $P < 0.05$ )، علاوه بر این، مقادیر پروتئین NGF در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین مقادیر این پروتئین در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار به صورت چشمگیری افزایش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). در شکل ۴ باندهای وسترن بلات و نمودارهای کمی مقادیر پروتئین‌های MBP و PLP و نیز مقدار پروتئین NGF که به روش الیزا اندازه‌گیری شده، نشان داده شده است.

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه در مورد مقایسه میانگین مقادیر پروتئین‌های NGF، MBP و PLP بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف بیانگر تفاوت معنادار 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 معنادار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافت ( $P < 0.05$ )، همچنین مقادیر این





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

MS یک بیماری خودایمنی و التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با ویژگی‌های پاتولوژیک مانند میلین زدایی، گلیوسیز و آسیب آکسونی است و با وجود پژوهش‌های وسیع هنوز دلایل و سازوکارهای دقیق این بیماری کاملاً مشخص نیست (۳۵). با توجه به تأثیرات مثبت برخی از تمرینات ورزشی بر کیفیت پروتئین‌های ساختاری و دوباره‌سازی میلین در سیستم عصبی مرکزی این بیماران، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر فعالیت شنا بر محتوای پروتئین NGF، MBP و PLP در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مدل MS القاشده با کوپریزون بود. نتایج نشان داد که وزن آزمودنی‌های گروه کنترل بیمار با مصرف کوپریزون به شکل معناداری نسبت به گروه کنترل سالم کاهش و

پس از اجرای پروتکل تمرینی به شکل چشمگیری در گروه تمرین بیمار افزایش یافت، اما این مقدار همچنان از وزن گروه‌های سالم کمتر بود. این نتایج با نتایج پژوهش مندولسی و همکاران (۲۰۲۰) (۳۶) همسوست، با این تفاوت که در پژوهش ذکر شده، وزن آزمودنی‌های گروه بیمار تمرین، پس 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 زیاد زمان باقی ماندن آزمودنی‌های گروه کنترل بیمار روی گردانه دستگاه روتارود نشان از تأثیرگذاری کوپریزون بر القای MS دارد که منطبق با پژوهش‌های پیشین است (۳۲). این زمان در گروه تمرین بیمار، پس از یک دوره فعالیت شنا بسیار افزایش پیدا کرد، اما باز هم از

گروه‌های کنترل سالم و سالم تمرین کمتر بود که ممکن است با افزایش طول دوره تمرین این تفاوت کم‌رنگ‌تر شود. در آزمون شاتل باکس، افزایش شایان توجه زمان ماندگاری در بخش تاریک در گروه کنترل بیمار نیز نشان از اثرگذاری کوپریزون بر ایجاد اختلال در حافظه دارد که با یک دوره تمرین شنا به‌طور چشمگیری کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر کاهش معنادار سطوح NGF در گروه بیمار کنترل نسبت به گروه سالم کنترل را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که سطوح NGF بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی در گروه تمرین مبتلا به MS در مقایسه با گروه‌های کنترل و بیمار افزایش معناداری یافته است. این یافته‌ها با نتایج پژوهش نقیب‌زاده و همکاران (۲۰۱۸) (۳۷) همسوست، با این تفاوت که آنها به‌جای فعالیت شنا، به مدت نه هفته از فعالیت روی تردمیل استفاده کردند و به این دلیل که پیش از القای MS با کوپریزون چهار هفته از زمان شروع پروتکل تمرینی سپری شده بود، امکان اینکه به‌دلیل 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 تحقیق حاضر با نتایج پژوهش کیم و همکاران (۲۰۲۰) (۳۴) مشابهت دارد. با وجود تفاوت در روش القای MS (MOG<sub>33-55</sub>) و بافت مورد بررسی متفاوت (نخاع) در پژوهش کیم، نتایج این پژوهش با تحقیق حاضر متفاوت نبود. از دیگر تفاوت‌های این تحقیق و پژوهش کیم و همکاران، می‌توان به رعایت اصل اضافه بار تمرینی در پژوهش حاضر بر خلاف تحقیق ذکر شده اشاره کرد؛ با وجود این عدم رعایت اصل اضافه بار در تحقیق کیم، نتایج آنها به عدم افزایش NGF و پروتئین‌های ساختاری میلین منجر نشد. در پژوهش پاتل و همکاران (۲۰۱۳) (۳۸) که از تمرین تردمیل استفاده کرده بودند، سطوح NGF در گروه کنترل بیمار به‌طور چشمگیری نسبت به گروه

کنترل سالم افزایش پیدا کرده بود که در تضاد با نتایج تحقیق 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 پس از تحریک میلین‌سازی به سطوح پایه باز می‌گردد (۵). بنابراین ممکن است زمان اندازه‌گیری (فقط ۱۰ روز پس از القای MS) بر سطوح NGF تأثیرگذار بوده باشد. افزون بر این احتمالاً به‌دلیل کم بودن حجم تمرین (فقط ۱۰ روز)، سطوح NGF در گروه تمرین بیمار و بیمار کنترل تفاوت معناداری نداشت. حجم تمرین کافی نکته‌ای بود که در تحقیق حاضر به‌دقت رعایت شد. همچنین افزایش سطوح MBP و PLP در پژوهش حاضر همسو با نتایج تحقیق کیم و همکاران بود (۳۴). همچنین پژوهش کیم و سونگ (۲۰۱۷) (۳۹) و پژوهش ماندولسی و (۲۰۱۹) (۳۶) نیز افزایش سطح معنادار پروتئین MBP را در گروه تمرین بیمار نسبت به گروه بیمار نشان دادند که مشابه تحقیق حاضر است. نکته شایان توجه در تحقیق کیم و همکاران (۳۴) این است که افزایش NGF، MBP و PLP در گروه تمرین با گروه درمان با داروی IFN-B، تفاوت چشمگیری نداشت که بیانگر قدرت اثرگذاری تمرین شناست. در پژوهش حاضر، کاهش سطوح MBP و PLP در گروه کنترل بیمار بیانگر تأثیر القای MS بر میلین‌زدایی است که با نتایج پژوهش‌های کیم و همکاران (۳۴)، کیم و سونگ (۴۰) و ماندولسی و همکاران (۳۶) همسوست. برخی پژوهش‌های انسانی در مبتلایان به MS نیز افزایش سطوح NGF در پاسخ به ورزش را نشان داده‌اند. نتیجه تحقیق گلد و همکاران (۲۰۰۳) (۴۱) افزایش حاد و گذرا، اما معنادار NGF در پاسخ به ۳۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت متوسط را نشان داد که ۳۰ دقیقه پس از تمرین به حالت پایه بازگشت. اما پژوهش انسانی دیگری در مبتلایان به MS در سال ۲۰۰۴ (۴۲) در پاسخ هشت هفته تمرین

دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌شود.

### حمایت مالی

این پژوهش 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 بخش‌های انتخاب موضوع، تنظیم روش کار و اجرای پروتکل حیوانی، انجام روش وسترن بلات و الیزا برای ارزیابی پروتئین‌ها، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛ خانم سمانه راهدار در انجام پروتکل حیوانی و تحقیق و جمع‌آوری منابع نظری؛ آقای سید شفا مرعشی در نگارش مقاله و طراحی گرافیکی طرح شماتیک و جمع‌آوری منابع نظری و آقای عبدالحمید حبیبی در تفسیر داده‌ها مشارکت داشتند. تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

کم‌شدت، 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 به کاهش علائم افسردگی منجر شود (۴۳، ۴۴). افزایش سطوح سروتونین با کاهش کالری دریافتی ارتباط مستقیم دارد (۴۵) و احتمالاً ابتدا به چاقی را که از عوامل مهم ابتلا به MS است، کاهش دهد (۴۶). همچنین ورزش شنا با افزایش سطوح پروتئین Bcl-2 از آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها جلوگیری می‌کند (۴۷). به طور کلی می‌توان افزایش NGF و پروتئین‌های ساختاری میلین مانند MBP و PLP را نشان‌دهنده تأثیر مثبت ورزش بر میلین‌سازی در مبتلایان به MS در نظر گرفت. با این حال نیاز به پژوهش‌های جامع‌تر و گسترده‌تر برای روشن شدن ابعاد دیگر موضوع مورد بحث در این زمینه احساس می‌شود. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان گفت که ورزش، به خصوص از نوع شنا، در افزایش محتوای پروتئین‌های NGF، MBP و PLP در ناحیه هیپوکمپ بیماران مبتلا به MS مؤثر عمل می‌کند و احتمالاً می‌تواند به عنوان روش ایمن، غیردارویی و بدون عارضه برای بهبود علائم مبتلایان به MS در نظر گرفته شود.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری و پشتیبانی معاونت پژوهشی

### منابع

1. Maciak K, Dziedzic A, Saluk J. Remyelination in multiple sclerosis from the miRNA perspective. *Front. Mol. Neurosci.* 2023 Jun 1;16:1199313.
2. Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids.* 2022;54(1):99-109.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Kister A, Kister I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front. Chem.* 2023; 21;10:1041961.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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, Frisén J, Geurts JJG, 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. J.* 2020;24(Suppl 1):S39-47.
35. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2021 Apr;14:17562864211007687.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Kim TW, Sung YH. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Neurosci.* 2017;346:173-81.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. van Galen KA, Ter Horst KW, Serlie MJ. Serotonin, food intake, and obesity. *Obes Rev.* 2021;22(7):e13210.
46. 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.
47. 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.