

Effect of six weeks forced and voluntary training before EAE induction on the expression of some adhesive molecules affecting the blood-brain barrier permeability

Mohammad Reza Rahmati, Mohammad Reza Kordi*, Ali Asghar Ravasi

Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

Original Article

Abstract

Purpose: Nearly 2.5 million people worldwide have multiple sclerosis, a chronic neuro-inflammatory disease of the brain and spinal cord that is a common cause of severe physical disability in young people, especially women. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of forced and voluntary training before EAE induction on the expression of adhesive molecule (ICAM-1 and VCAM-1) affecting the blood-brain barrier permeability in C57BL/6 mice.

Methods: Forty female C57BL/6 mice with weight 18 ± 2 g and age 7 ± 1 weeks were randomly divided to four groups of forced training (n = 12), voluntary training (n=12), EAE control (n = 8) and healthy control (n = 8). To perform the forced training, the mice performed swimming for 30 minutes five days/week for six weeks. Also to perform the voluntary training, the mice performed running wheel for one hour five days/week for six weeks. After that ICAM-1 and VCAM-1 gene expression were measured by RT-PCR. In data analysis, one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test were applied to determine the difference between the groups.

Results: Five weeks recording clinical signs after EAE induction showed a significant difference between the scores of the two training groups and EAE control ($P < 0.05$). Also, the expression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesive molecules significantly decreased in the forced and voluntary groups compared to EAE control ($P < 0.05$), but the forced and voluntary groups significantly did not differ from the healthy control group ($P > 0.05$).

Conclusion: The forced and voluntary training appears to reduce the blood-brain barrier permeability by reducing the expression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesive molecules.

Keywords: MS disease, Multiple Sclerosis, ICAM-1, VCAM-1, blood-brain barrier Integrity

How to cite this article: Rahmati M, Kordi M, Ravasi A. Effect of six weeks forced and voluntary training before EAE induction on the expression of some adhesive molecules affecting the blood-brain barrier permeability. Journal of Sport and Exercise Physiology 2022;15(1):57-68

*Corresponding Author; E-mail: mrkordi@ut.ac.ir
DOI: 10.52547/joeppa.15.1.57

Received: 22/06/2020

Revised:21/04/2021

Accepted: 26/04/2021

تأثیر شش هفته تمرین اجباری و اختیاری پیش آماده‌سازی بر بیان برخی مولکول‌های چسبان مؤثر بر نفوذپذیری سد خونی- مغزی در موش‌های ام اس روش EAE

محمد رضا رحمتی، محمد رضا کردی*، علی اصغر رواسی

دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقاله پژوهشی

چکیده

هدف: حدود ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به مولتیپل اسکلروزیس، بیماری مزمن عصبی-التهابی مغز و نخاع، مبتلا هستند که علت شایع ناتوانی جسمی جدی در جوانان، به ویژه زنان است. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر فعالیت اختیاری و اجباری پیش از القای EAE بر بیان مقادیر مولکول‌های چسبان (ICAM-1 و VCAM-1) مؤثر بر نفوذپذیری سد خونی-مغزی در موش‌های ماده C57BL/6 است.

روش‌ها: ۴۰ سر موش ماده C57BL/6 با وزن 18 ± 2 گرم و سن 7 ± 1 هفته به روش تصادفی ساده به چهار گروه فعالیت اجباری ($n=12$)، فعالیت اختیاری ($n=12$)، کنترل EAE ($n=8$) و کنترل سالم ($n=8$) تقسیم شدند. برای اجرای فعالیت اجباری، موش‌ها فعالیت شنا را به مدت ۳۰ دقیقه پنج روز در هفته و در طول شش هفته انجام دادند. همچنین برای اجرای فعالیت اختیاری موش‌ها یک ساعت در روز و پنج روز در هفته به مدت شش هفته در قفسی به یک چرخ گردان دسترسی پیدا کردند. پس از اتمام دوره تمرین بیان ژن ICAM-1 و VCAM-1 به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها برای تعیین اختلاف داده‌ها در بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری $P \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج: پنج هفته ثبت علائم بالینی پس از القای EAE تفاوت معناداری بین نمرات دو گروه فعالیت ورزشی و گروه کنترل EAE نشان داد ($P < 0.05$). همچنین بیان مولکول‌های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 در دو گروه فعالیت اختیاری و اجباری نسبت به کنترل EAE کاهش معنادار داشتند ($P < 0.05$)، اما نسبت به گروه کنترل سالم تفاوت معناداری نداشتند ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد دو نوع فعالیت اختیاری و اجباری با کاهش بیان مولکول‌های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 سبب کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری ام اس، مولتیپل اسکلروزیس، ICAM-1، VCAM-1، یکپارچگی سد خونی-مغزی.

* نویسنده مسئول: رایانامه: mrkordi@ut.ac.ir

مقدمه

در حدود ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به مولتیپل اسکلروزیس، بیماری مزمن عصبی-التهابی مغز و نخاع، مبتلا هستند که علت شایع ناتوانی جسمی جدی در جوانان، به ویژه زنان است. مولتیپل اسکلروزیس، یک مسئولیت مهم شخصی اجتماعی و اقتصادی است؛ میانگین سن شروع بیماری ۳۰ سال است (سنی که برای برنامه ریزی کار و خانواده تعیین کننده است) و ۲۵ سال پس از تشخیص تقریباً ۵۰ درصد بیماران به استفاده دائمی از صندلی چرخدار (ویلچر) نیاز دارند. این بیماری حضور ناهمگونی دارد که می تواند شامل اختلالات حسی و بصری، اختلالات حرکتی، خستگی، درد و نقایص شناختی باشد. این ضایعات مشخصه مولتیپل اسکلروزیس هستند. مولتیپل اسکلروزیس از طریق نفوذ سلول های ایمنی به داخل سد خونی-مغزی (BBB) ایجاد و موجب التهاب، دیمیلیناسیون، گلیوز و تخریب عصبی آکسونی می شود و به اختلال در پیام رسانی عصبی می انجامد (۱). انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) متداول ترین روش آزمایشی برای بیماری التهابی دمیینه شدن انسان (مولتیپل اسکلروزیس) است. EAE، وضعیتی پیچیده است که در آن تعامل بین انواع سازوکارهای ایمنوپاتولوژیک و نوروپاتولوژیک به شباهت زیاد ویژگی های اصلی پاتولوژیک ام اس همچون التهاب، میلین زدایی، از بین رفتن آکسون و گلیوز منجر می شود (۲). فعال سازی میکروگلیا، نفوذ لنفوسیت ها و ورود ماکروفاژها به CNS نقش مهمی در توسعه بیماری دارد. بنابراین، تنظیم انتقال سلول ایمنی از BBB برای حفظ هومئوستاز در مغز سالم و رفع تغییرات پاتولوژیک در ام اس ضروری است (۳).

سد خونی-مغزی (BBB) مانع محافظتی ضروری برای نگهداری از محیط مغز است. BBB از سلول های اندوتلیال عروقی اختصاصی، پرپسایت ها و لامینا پایه آن ها که از طریق قسمت انتهایی آستروسیت ها احاطه شده، ماکروفاژهای پرپواسکولار (متصل به عروق) و نورون ها تشکیل شده است (۴). کنترل فیزیولوژیکی عملکرد BBB از طریق تعاملات پیچیده بین سلول های اندوتلیال BBB، آستروسیت های پرپواسکولار (متصل به عروق) و عروق پرپسایت به دست می آید و تغییرات در تعادل حساس BBB با آسیب های CNS مانند ام اس مرتبط می شود. ثابت شده است که در طول پیشرفت

ام اس، تعدادی از سایتوکاین ها و مولکول های چسبان مهاجرت عرضی (دیپدز) لکوسیت ها را از طریق اندوتلیوم و ساطت می کنند (۵).

بیان مولکول های چسبان سلولی افزون بر تسهیل مهاجرت از عرض اندوتلیال (TEM) سلول های ایمنی، ممکن است در طول خودایمنی سبب ایجاد التهاب در CNS شود (۶). مولکول چسبان بین سلولی (ICAM-1) و مولکول چسبان سلولی عروقی (VCAM-1)، عضوی از ابرخانواده ایمونوگلوبولین ها هستند که به عنوان لیگندهایی برای لکوسیت ها عمل می کنند و زمانی که توسط سلول های اندوتلیال بیان می شوند، مهاجرت لکوسیت به CNS را تحریک می کنند. مولکول های چسبان سلولی نفوذ سلول T را افزایش می دهند و نشان داده شده است که در توسعه بیماری های دیمیلیناسیون دخالت دارند. فعال شدن این عوامل، پاسخ های التهابی را تحریک می کند و موجب شروع آبشار پاتوژنتیکی آسیب آکسونی می شود و در نهایت به بروز نشانه های بالینی مشاهده شده در ام اس و EAE می انجامد (۷).

اگرچه ام اس بیماری برگشت ناپذیر همراه با اختلالات حرکتی مزمن است، به مداخلات درمانی نیاز است که بتوانند تأثیر بیماری را کاهش دهند و کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشند. راهبردهایی که در فعال شدن مولکول های چسبان سلول های اندوتلیال CNS تداخل ایجاد می کنند، ممکن است در جلوگیری از نشت سد خونی-مغزی و کنترل التهاب عصبی کمک کنند. راهبردهای دارویی در رابطه با EAE و مهار مولکول های چسبان فراوان است. در این زمینه چوی و همکاران (۲۰۱۵) از یک داروی گیاهی به عنوان رویکرد درمانی در بیماری ام اس (روش EAE) استفاده کردند؛ این دارو تغییرات در اجزای سد خونی-مغزی را مهار کرد و موجب کاهش معنادار ICAM-1 و VCAM-1 شد (۸). در پژوهشی دیگر، وانگ و همکاران (۲۰۱۶) از مکمل رزوراترول برای حفاظت از یکپارچگی سد خونی-مغزی استفاده کردند؛ آن ها نیز در مقادیر مختلف این مکمل با کاهش ICAM-1 و VCAM-1 روبه رو شدند (۹). در پژوهش سانرو همکاران (۲۰۱۷) مسدود کردن ICAM-1 و VCAM-1 - هر دو- توسط آنتی بادی در سطح اندوتلیال، مهاجرت سلول های TCD4+ از عرض اندوتلیال را از خارج به داخل مهار کرد؛ جالب توجه

بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر دو نوع فعالیت اجباری و اختیاری پیش از القای EAE بر بیان مقادیر مولکول های چسبان (ICAM-1 و VCAM-1) مؤثر بر نفوذپذیری سد خونی- مغزی در موش های ماده C57BL/6 است.

روش پژوهش

نمونه های پژوهش: نوع پژوهش حاضر بنیادی، روش آن تجربی و نحوه جمع آوری اطلاعات آزمایشگاهی است. ۴۰ سر موش ماده C57BL/6 با وزن 18 ± 2 گرم و سن 7 ± 1 هفته از انستیتو پاستور تهیه و آهنگ شبانه روزی (۱۲:۱۲) آن ها کنترل شد. نمونه ها در دمای 22 ± 1 درجه سانتی گراد و رطوبت حدود ۴۵ درصد و تهویه مناسب نگهداری شدند و آزادانه به غذا و آب کافی دسترسی داشتند. تمام آزمایش ها براساس شیوه نامه کار با حیوانات دانشگاه تهران با کد اخلاق IR.UT.SPORT. REC.1397.028 صورت گرفت. موش ها به روش تصادفی ساده به چهار گروه فعالیت اجباری ($n=12$)، فعالیت اختیاری ($n=12$)، کنترل EAE ($n=8$) و کنترل سالم ($n=8$) تقسیم شدند. سپس، موش ها به منظور آشناسازی با محیط نگهداری، به مدت یک هفته در معرض استخر شنا (ده دقیقه در روز و پنج روز متوالی) و چرخ گردان (یک ساعت در روز و سه روز متوالی به قفس چرخ گردان دسترسی داشتند تا به چرخ گردان عادت کنند و اطلاعات پایه دوییدن جمع آوری شود) قرار گرفتند. دو گروه کنترل در قفس نگهداری شدند. در ابتدا که موش ها سالم بودند، به مدت چهار هفته فعالیت خود را اجرا کردند. پس از چهار هفته ابتدایی، روی تمامی موش ها القای EAE صورت گرفت. دو هفته پس از القا نیز فعالیت ادامه یافت و تا پنج هفته پس از القا نیز نمرات بالینی موش ها ثبت شد و گروه کنترل EAE و کنترل سالم نیز برای مقایسه با دو گروه فعالیت اجباری و اختیاری در قفس ماندند. در نهایت پس از آزمایش های مربوط، برای سنجش داده ها و مقایسه آن با تمامی گروه ها، موش ها تحت بی هوشی عمیق با تزریق کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) و بدون هیچ زجری معدوم شدند. شکل ۱ نمایی کلی از روند پژوهش را نشان می دهد.

روش اجرای پژوهش: فعالیت اجباری: موش ها در وانی به ارتفاع ۲۵ سانتی متر و عمق آب ۲۰ سانتی متر با

اینکه همراه با کاهش مهاجرت ناشی از مسدود کردن ICAM-1 و VCAM-1، مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل با آنتی بادی های ایزوتوپی بیشتر سلول های T در لایه اندوتلیالی که از طریق آنتی ICAM-1 و آنتی VCAM-1 درمان شده بودند، گیر افتادند (۶).

با این حال، استفاده از درمان های دارویی به سبب هزینه های زیاد و عوارض جانبی و دیگر دلایل محدود شده است. از طرفی، برای پیشگیری از بیماری های انحلال عصبی و به تعویق انداختن روند آن ها، راهبردهای فعالیت ورزشی توصیه می شود که در این زمینه، نشان داده شده است فعالیت ورزشی موجب بهبود مناسب عملکردهای جسمی و شناختی در بیماران MS می شود (۱۰، ۱۱). علاوه بر این، نشان داده شده است اجرای فعالیت ورزشی پیش از شروع EAE علائم بالینی را کاهش می دهد (۱۲). از سوی دیگر، فعالیت ورزشی بیان مولکول های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 را در بیماری های مختلف مانند چاقی (۱۳)، دیابت (۱۴)، قلبی-عروقی (۱۵) و ... کاهش می دهد که در خصوص بیماری ام اس و میزان مقادیر ICAM-1 و VCAM-1 در سطح سلول های اندوتلیال عروق مغزی پژوهشی یافت نشد.

تحقیقات روی موش ها که سازگاری با فعالیت ورزشی را بررسی می کنند، از روش های مختلف شامل فعالیت اختیاری چرخ گردان (VWR) یا فعالیت اجباری استفاده می کنند. موش هایی که داوطلبانه فعالیت چرخ گردان را انجام می دهند، دوییدن های متناوب و کوتاه را با سرعت دلخواه اجرا می کنند. اما فعالیت اجباری اغلب شامل سرعتی است که با میزان ثابت تنظیم می شود (۱۶). در مقایسه با فعالیت اختیاری چرخ گردان، شنای اجباری سطوح فشار بالاتری را در حیوانات ایجاد می کند (۱۷). به تازگی بنسون و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که موش های EAE که در روز به مدت یک ساعت فعالیت اختیاری انجام دادند، علائم بالینی بیماری در آن ها به تأخیر افتاد و درد ناشی از بیماری به سرعت بهبود یافت (۱۸). برناردز و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که برنامه ورزشی اجباری طولانی مدت به طور معناداری نفوذ لکوسیت ها به CNS را کاهش می دهد (۱۲). با این حال، هنوز مشخص نیست که کدام نوع فعالیت ورزشی در تنظیم بیان مولکول های چسبان مغز و نفوذپذیری سد خونی- مغزی در موش های روش EAE مؤثر است.

میکروتیوب به مدت رویی صورت گرفته و به میکروتیوب RNase free انتقال پیدا کرد. سپس ۵۰۰ μL ایزوپروپانول به فاز آبی اضافه شد و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شده و میکروتیوب حاوی نمونه در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه فاز آبی یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دورریخته شده و رسوب حاوی RNA نگه داشته شد و رسوب با ۷۰۰ μL اتانول ۸۰٪ شسته شد. نمونه‌ها به آرامی هم زده شده (ورتکس) و در ۷۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت الکل دورریخته شده و نمونه در دمای اتاق قرار گرفت تا رسوب نسبتاً خشک شد. رسوب RNA در ۳۰۰ μL DEPC water حل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

Real time-PCR از تکنیک RT-qPCR به منظور تأیید بیان ژن‌های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیاژول، RNA کل سلول‌ها طبق روش سیناژن استخراج شد و برای اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با دستگاه اسپکتوفتومتری 1-DPI، Kiagen ارزیابی شد. به منظور تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر (MWG-Biotech, Germany) Oligo dt و آنزیم نسخه‌برداری معکوس Fermentas و براساس روش مربوط استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از SYBER (Applied Biosystems) PCR master mix و ABI Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA) در دستگاه (Sequences Detection Systems) طبق روش شرکت سازنده انجام گرفت.

نمونه‌ها تا زمان انتقال به دستگاه روی یخ نگه داشته شدند. ۴۰ دور برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر دور شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم شد. نمودار Melting به منظور بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام گرفت و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی به منظور بررسی وجود آلودگی در هر واکنش ارزیابی شد.

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق، با

دمای 31 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و فعالیت شنا را به مدت ۳۰ دقیقه، پنج روز در هفته و در طول شش هفته انجام دادند. موش‌های گروه شنا در طول مدت جلسات تمرینی پایش شدند و با استفاده از اسفنج به ادامه شنا کردن تشویق شدند (۱۹، ۲۰).

فعالیت اختیاری: موش‌ها یک ساعت در روز و پنج روز در هفته به مدت شش هفته در قفسی به یک چرخ گردان دسترسی داشتند. در آن یک ساعت، موش‌ها از قفس خود برداشته شده و در قفسی مشابه و استاندارد تنها با پوشال و یک چرخ گردان قرار گرفتند. مسافت پیموده شده با استفاده از رایانه ثبت شد (۲۱).

روش‌های آزمایشگاهی: نحوه القای EAE: موش‌ها ابتدا به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید (۵ mg/kg) و زایلزین (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند، سپس با تزریق زیرجلدی از پهلوی با ۲۰۰ میکروگرم میلی‌لیتر الیگودندروسیتس گلیکوپروتئین (MOG35-55) که در محلول بافر شده با فسفات (PBS) حل شده بود و با حجم مساوی از ادجانت کامل فروند (CFA) به همراه ۴۰۰ میکروگرم عصاره مایکوباکتریوم تیوبرکیولوسیس H37Ra که به حالت ذرات ریز و پایدار (امولسیون) درمی‌آیند، ایمن‌سازی شدند. تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۲ (در روز تزریق و دو روز پس از آن)، به صورت داخل صفاقی ۳۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین داشتند. شایان ذکر است گروه کنترل همزمان با باقی گروه‌ها تزریق سالین داشتند. این روش در مؤسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری تولید شد. برای ارزیابی وزن بدن (پارامتر سلامت)، حیوانات روزانه وزن‌کشی شدند و برای علائم بالینی EAE، توسط دو ناظر مستقل ارزیابی شدند و از یک شیوه نمره‌دهی بالینی EAE برای ارزیابی اختلال عصبی در روش EAE با توجه به مقیاس زیر استفاده شد: نمره ۰ = 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 (۲۲، ۲۳).

سنجش بیان ژن با روش RT-PCR: مراحل استخراج RNA: در ابتدا بافت با استفاده از ازت مایع، داخل ظرف (ترجیحاً هاون چینی) همگن و یکنواخت (هموژن) شد. سپس ۳۰۰ μL RNA X PLUS به ازای ۱۰۰-۵۰ mg بافت اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق و اضافه کردن ۲۰۰ μL کلروفرم سرد،

روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) با قرار دادن داده‌ها در فرمول ارزیابی شد.

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

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

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور سنجش بیان ژن‌های ICAM-1، VCAM-1، m-bactin

ژن	توالی پرایمر
ICAM-1	F ICAM-1: ACATTCTCCCCAACTCTTCT R ICAM-1: CTTTCCCCACTCTCACA
VCAM-1	F VCAM-1: TGGAGTCTATGTGTGTGAAGG R VCAM-1: AGGGGATTGTCTGTCTGGGT
m-bactin	F m-bactin: TCAGAGCAAGAGAGGCATCC R m-bactin: GGTCATCTTCTCACGGTTGG

شروع بیماری، موش‌ها به طور متوسط 294 ± 811 متر را طی یک جلسه یک ساعته می‌پیمودند. اما با شروع بیماری کاهشی را نشان دادند و فقط به طور متوسط مسافت 475 ± 178 متر در ساعت را روی چرخ گردان می‌پیمودند. کاهش ابتدایی مسافت طی شده در سه روز اول پس از القا نشان از علائم فلج دم - مشخصه بارز بروز بیماری - دارد. اما با پیشرفت بیماری، موش‌ها تا حدودی مسافت پیموده شده را بازیابی کردند.

به منظور بررسی مهاجرت لکوسیت‌ها و سازوکارهای احتمالی تأثیرات مهم فعالیت ورزشی، بیان ژن ICAM-1 و VCAM-1 در مغز موش‌ها اندازه‌گیری شد. شکل‌های ۵ و ۶ نشان می‌دهد که ICAM-1 و VCAM-1 در دو گروه فعالیت اجباری و اختیاری نسبت به کنترل EAE تفاوت معنادار داشتند ($P < 0.05$). این داده‌ها نشان می‌دهد کاهش سطوح مولکول‌های چسبان همراه با فعالیت ورزشی فراخوانی لکوسیت‌ها به درون CNS را - که می‌توانند سبب مستعد شدن موش به بیماری شوند - کاهش می‌دهد. از طرفی دو گروه فعالیت اجباری و اختیاری نسبت به گروه کنترل سالم تفاوت معناداری نداشتند ($P > 0.05$) که تأییدی بر حفاظت موش‌های دچار ام اس گروه فعالیت ورزشی از بیماری است که توانسته‌اند سطح مولکول‌های چسبان را نزدیک به گروه کنترل سالم نگه‌دارند.

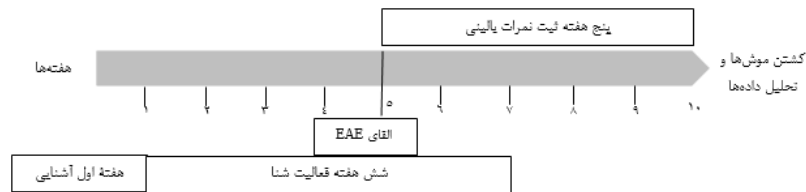
تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام گرفت. برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها از آزمون لویین استفاده شد. برای تعیین اختلاف داده‌ها در بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمامی تحلیل‌ها در سطح $P \leq 0.05$ انجام گرفت.

نتایج

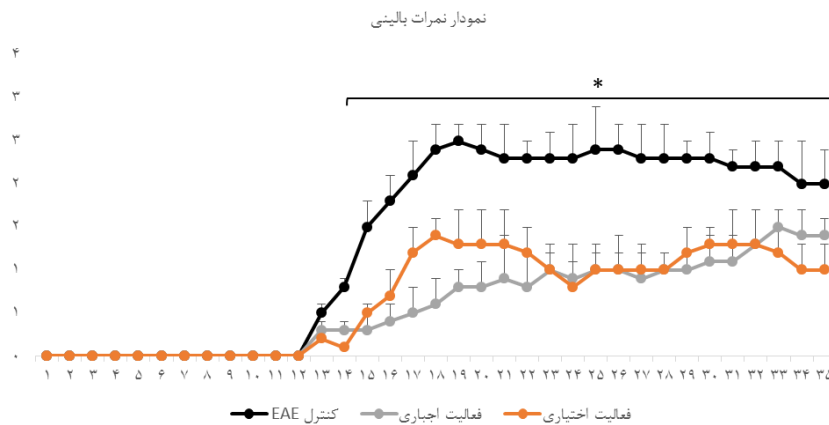
همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، تمام موش‌ها پس از القای EAE به مدت پنج هفته علائم بالینی شان ثبت می‌شد. در نتیجه شش هفته برنامه فعالیت ورزشی، شدت بیماری را از ابتدای شروع بیماری تا اوج، هنگامی کاهش داد که فعالیت ورزشی پس از دو هفته از القا متوقف شد. همچنین روز شروع بیماری هر دو گروه فعالیت اجباری و اجباری در مقایسه با گروه کنترل EAE به تعویق افتاد. منحنی فعالیت اجباری و اجباری با منحنی گروه کنترل EAE تفاوت معنادار داشت و با نوار نشان داده شده است ($P < 0.05$)، آزمون کروسکال والیس). شکل ۲ نمرات بالینی در هر سه گروه و شکل ۳ کاهش تدریجی وزن بدن با افزایش شدت بیماری را در موش‌های گروه کنترل EAE در مقایسه با گروه فعالیت ورزشی و کنترل سالم نشان می‌دهد. شکل ۴ مسافت پیموده شده در چرخ گردان را نشان می‌دهد. پیش از

جدول ۲. مقادیر بیان ژن ICAM-1 و VCAM-1 در چهار گروه فعالیت اجباری، اختیاری، کنترل EAE و کنترل سالم

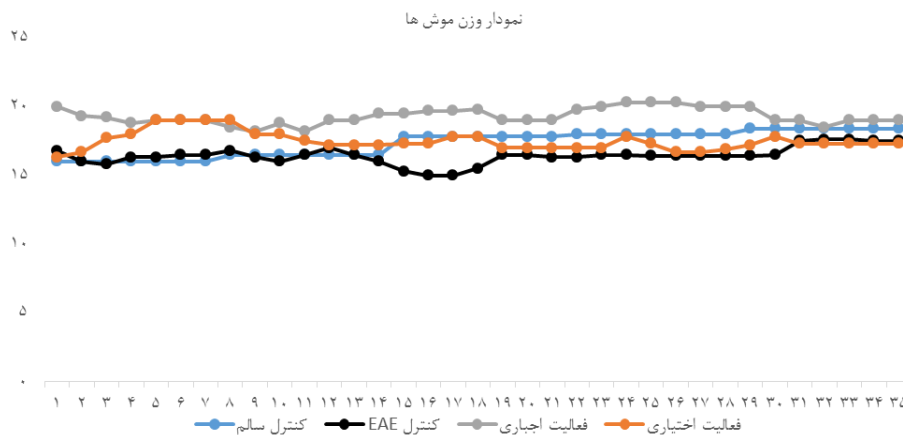
گروه‌ها	VCAM		ICAM	
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین
فعالیت اجباری	۰/۰۰۰۰۹۰۲	۰/۰۰۰۲۰۴	۰/۰۰۰۴۲۸	۰/۰۰۰۷۹۸
فعالیت اختیاری	۰/۰۰۰۱۱۲	۰/۰۰۰۲۷۰	۰/۰۰۰۵۰۱	۰/۰۰۰۸۹۸
کنترل EAE	۰/۰۰۰۲۴۲	۰/۰۰۰۶۳۱	۰/۰۰۰۳۰۶	۰/۰۰۱۵۸
کنترل سالم	۰/۰۰۰۰۶۶۵	۰/۰۰۰۱۲۹	۰/۰۰۰۱۵۰	۰/۰۰۰۳۶۱



شکل ۱. نمایی کلی از روند پژوهش



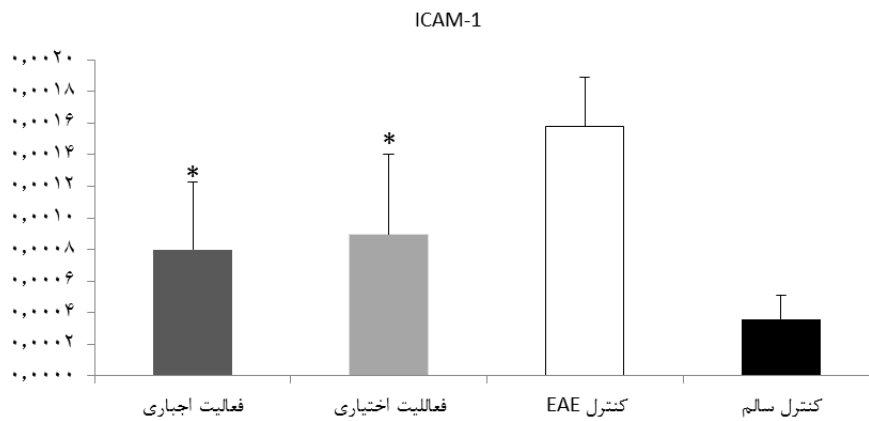
شکل ۲. تغییرات نمرات بالینی در ۳۵ روز. منحنی فعالیت اجباری و اختیاری به‌طور چشمگیری با منحنی گروه کنترل EAE تفاوت دارد (روز ۱۴ تا ۳۵) و با نوار نشان داده شده است ($P < 0/05$ ، آزمون کروسکال والیس)



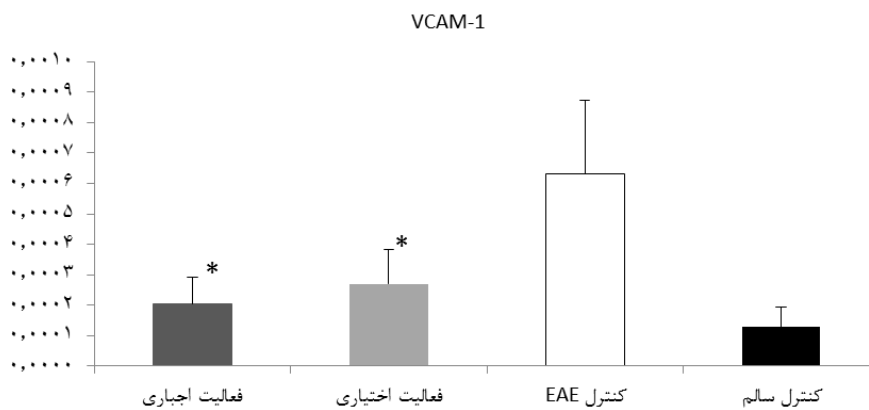
شکل ۳. تغییرات وزن موش‌ها در ۳۵ روز



شکل ۴. تغییرات مسافت پیموده شده (تعداد دور در ساعت) در چرخ گردان شش هفته تمرین ۵ روز/ هفته



شکل ۵. تغییرات مقادیر بیان ژن ICAM-1 در چهار گروه فعالیت اجباری، اختیاری، کنترل EAE و کنترل سالم. مقادیر فعالیت اجباری و اختیاری به طور معناداری با گروه کنترل EAE تفاوت دارد ($P < 0/05$ ، آزمون تحلیل واریانس یکطرفه)



شکل ۶. تغییرات مقادیر بیان ژن VCAM-1 در چهار گروه فعالیت اجباری، اختیاری، کنترل EAE و کنترل سالم. مقادیر فعالیت اجباری و اختیاری به طور معناداری با گروه کنترل EAE تفاوت دارد ($P < 0/05$ ، آزمون تحلیل واریانس یکطرفه)

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود این، گزارش‌های ضدونقیضی در تأثیر فعالیت اجباری در بهبود نتیجه کارکردی وجود دارد. برای مثال در گزارشی بیان شده است که تمرینات ورزشی کوتاه‌مدت نوار گردان تأثیری بر نمرات بالینی ندارد (۲۹). تفاوت اصلی بین فعالیت اجباری و اختیاری به میزان فشار فعالیت اجباری که به حیوان وارد می‌کند و متغیر بودن میزان فعالیت اختیاری است، زیرا در این حال فعالیت مبتنی بر تمایل حیوان برای اجراست. علاوه بر این مدت زمان فعالیت روزانه و همچنین برنامه تمرینی، چه پیشگیری یا درمانی می‌تواند بر نتایج تأثیر بگذارد و هنگام مقایسه برنامه‌های مختلف باید در نظر گرفته شود (۳۰، ۳۱). در این پژوهش همان‌طور که شکل‌های بیان ژن نشان می‌دهد (شکل‌های ۵ و ۶)، فعالیت اجباری نسبت به اختیاری سبب کاهش بیشتر ژن ICAM-1 و VCAM-1 شد، اما این تفاوت‌ها معنادار نبود. از طرفی هر دو فعالیت نسبت به گروه کنترل EAE کاهش معنادار داشتند.

گزارش شده است که رابطه‌ای بین شدت بیماری ام اس و مهاجرت لکوسیت‌ها به CNS وجود دارد که با تغییراتی در یکپارچگی سد خونی-مغزی همراه است (۳۲). در پژوهش حاضر داده‌های ICAM-1 و VCAM-1 به‌عنوان عوامل انتقالی لکوسیت‌ها به مغز در دو گروه فعالیت اجباری و اختیاری نسبت به گروه کنترل EAE به‌طور چشمگیری کاهش یافتند. از طرفی سطح این عوامل نزدیک به سطح گروه کنترل سالم حفظ شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی با کاهش مولکول‌های چسبان سبب حفظ یکپارچگی BBB می‌شود. به‌نظر می‌رسد که فعالیت ورزشی، التهاب و در نتیجه اختلال در BBB را کاهش می‌دهد، بنابراین اثر محافظتی بر CNS بیماران ام اس دارد (۳۳). مشابه با تحقیق حاضر که تأثیر فعالیت ورزشی را بر مولکول‌های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 و بیماری ام اس نشان دهد، پژوهشی یافت نشد. در این زمینه، تنها در پژوهش سوزا و همکاران (۲۰۱۷) که تمرین پیشگیرانه استقامتی و قدرتی را روی موش‌های EAE اجرا کردند، کاهش بیان مولکول چسبان PECAM-1 و لکوسیت‌های نفوذی مشاهده شد (۵).

تجزیه و تحلیل بافت‌های ام اس تأیید می‌کند که افزایش ICAM-1 و VCAM-1 در رگ‌های خونی ضایعات ام‌اسی، سطوح سلول‌های ایمنی را پایین و بالا-هر دو-

در این پژوهش یکپارچگی سد خونی-مغزی و بیان مولکول‌های چسبان در موش‌های EAE تحت برنامه فعالیت اجباری و اختیاری بررسی شد. داده‌ها نشان می‌دهد که علائم بالینی و نفوذ لکوسیت‌ها به CNS، با این روش تضعیف می‌شوند. این داده‌ها حاکی از آن است که شش هفته فعالیت ورزشی پیشگیرانه می‌تواند پیشرفت بیماری را از شروع بیماری تا مرحله مزمن بهبود بخشد و دوره بیماری را به تأخیر بیندازد و سرکوب کند. در پژوهش پریور و همکاران (۲۰۱۵) موش‌های EAE که در معرض فعالیت ورزشی قرار گرفتند، نمرات بالینی کمتر و شروع با تأخیر بیماری را در مقایسه با حیوانات EAE بی‌تحرك نشان دادند. نفوذ سلول‌های ایمنی و دیمییلیناسیون در مجاری ماده سفید شکمی نخاع در گروه ورزش EAE در مقایسه با گروه EAE بی‌تحرك کاهش یافت (۲۴). این یافته‌ها همسو با پژوهش حاضر، بهبود چشمگیری از نمره بالینی و تأخیر در شروع علائم را در مقایسه با گروه کنترل EAE نشان دادند. این بهبود در نمرات بالینی ممکن است به تغییرات در نیمرخ التهابی ناشی از ورزش نسبت داده شود. مطابق با این فرضیه، تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که کاهش نفوذ سلول‌های ایمنی مانع از دیمییلیناسیون، مرگ آکسونی و عصبی در EAE می‌شود (۲۴). در توافق با داده‌های این پژوهش، برناردز و همکاران (۲۰۱۳، ۲۰۱۶) گزارش کردند که برنامه ورزشی طولانی‌مدت، نفوذ لکوسیت‌ها به CNS را به‌طور شایان توجهی کاهش می‌دهد و با بهبود در بازیافت کارکردی ارتباط دارد (۱۲، ۲۵).

دو فعالیت اجباری و اختیاری پیش از القا، مداخله مفیدی برای CNS هستند، اما بعضی تحقیقات نشان می‌دهند که در محافظت عصبی و تغییر سوخت‌وساز مغز، فعالیت اجباری بسیار مفیدتر از فعالیت اختیاری است (۲۶، ۲۷). همچنین فعالیت اجباری امکان دستکاری شدت، مدت و تعداد تکرار برنامه را فراهم می‌کند و مشابه با برنامه تمرینات آماده‌سازی مطالعات انسانی است (۲۸). اعتقاد بر این است که فعالیت اجباری مؤلفه بالقوه فشار عاطفی ناشی از اجبار به حیوان را درگیر می‌کند و این مسئله موجب ایجاد مشکل در تفاوت بین اثر فشار بدنی فعالیت ورزشی و تأثیر فشار عاطفی ناشی از اجبار می‌شود، از این رو نتایج بررسی شده به‌طور بالقوه اشتباه گرفته می‌شود (۱۶).

ایسکمی مغزی فعالیت دویدن روی نوار گردان را اجرا کردند، مشاهده شد که کارکرد شناختی بهبود یافته و فعالیت سلول های آستروسیت و میکروگلیا و همچنین بیان عوامل پیش التهابی و مولکول های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 کاهش معناداری یافتند (۳۹). همچنین در پژوهش لی و همکاران (۲۰۱۷) موش ها سه روز پس از ایجاد سکنه مغزی فعالیت روی روتارود را انجام دادند که در نهایت سبب کاهش معنادار عوامل پیش التهابی و مولکول های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 شد (۴۰). تحقیقات موجود همسو با پژوهش حاضر کاهش ICAM-1 و VCAM-1 را مانعی برای عبور سلول های ایمنی از سد خونی-مغزی و کاهش التهاب در CNS می دانند که هر دو فعالیت اجباری و اختیاری این موضوع را به خوبی نشان دادند.

از آنجا که افزایش ICAM-1 و VCAM-1 احتمالاً از عوامل مرتبط با پیشرفت MS است، این موضوع ممکن است از طریق فعالیت ورزشی با کاهش بیان مولکول های چسبان، مانع از پیشرفت MS شود. همچنین داده های پژوهش حاضر نشان می دهد که فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی از پیشرفت EAE در موش ها جلوگیری می کند. بنابراین فعالیت ورزشی منظم ممکن است مداخله مهمی برای پیشگیری از بیماری های خودایمنی مانند MS باشد. یک برنامه تمرینی شش هفته ای که پیش از افزایش نمره بالینی EAE انجام می گیرد، می تواند گسترش نفوذپذیری سد خونی-مغزی را کاهش دهد. این مسئله تأکید می کند که فعالیت ورزشی ممکن است نوعی اثر پیشگیری کننده و ترکیب فعالیت ورزشی با سبک زندگی شخصی اثر حفاظتی داشته باشد و به کاهش شدت و پیشرفت بیماری در افرادی که ممکن است در طول عمر خود به بیماری ام اس مبتلا شوند، کمک کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، مستخرج از رساله دکتری دانشگاه تهران و هزینه شخصی نویسندگان است. از زحمات استادان محترم راهنما و مشاور و تمام افرادی که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545-58.

نشان می دهند (۳۴). ICAM-1 یک مولکول چسبان القایی سایتوکائینی است که در طول بیماری های التهابی CNS مانند ام اس افزایش می یابد. ICAM-1 توسط سلول های بی شماری از جمله سلول های اندوتلیال و آستروسیت ها بیان می شود و دارای لیگاند LFA1 است که از طریق لنفوسیت ها بیان می شود. در ضایعات ام اس، ICAM-1 به طور گسترده ای روی سلول های اندوتلیال بیان می شود. در اطراف ماده سفید مجاور نیز بیان می شود که نشان دهنده واسطه های محلول مانند سایتوکائین هاست و ممکن است بر بیان مولکول های چسبان روی عروق مجاور تأثیر بگذارد و مکان های تشکیل ضایعه جدید را ایجاد کند. علاوه بر این در حین التهاب، TNF- α و IFN- γ سلول های اندوتلیال را تحریک می کنند تا VCAM-1 را بیان کنند. ICAM-1 از طریق سلول های T فعال، اینترگرینی مانند VLA-4 را بیان می کند که سبب تسهیل ورود آن ها به CNS می شود (۳۵). براساس نتایج برخی تحقیقات فعالیت ورزشی می تواند برخی اختلالات BBB (پروتئین های التهابی بدن) را در بیماری های عصبی مانند ام اس کاهش دهد (۳۶). از طرفی فعالیت ورزشی به طرز چشمگیری مانع بیان مولکول های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 می شود. فعالیت ورزشی پیشگیرانه بیان پروتئین ICAM-1 و تعداد سلول های لکوسیت های نفوذی را در هر دو قشر و جسم مخطط موش های ایسکمی مغزی کاهش می دهد (۲۸). در پژوهش دینگ و همکاران (۲۰۰۵) موش های یک روش سکنه مغزی که پیش از القا با استفاده از نوار گردان فعالیت ورزشی داشتند، کاهش معناداری در نفوذ لکوسیت التهابی و بیان اندوتلیال ICAM-1 در پاسخ به ایسکمی مغزی داشتند. علاوه بر این، بیان mRNA ICAM-1 در طول تزریق مجدد جریان خون به موش های ایسکمی به طور چشمگیری در سطح پایین باقی مانده بود. این کاهش در ICAM-1 mRNA، به احتمال زیاد به کاهش نفوذ لکوسیت ها و انفارکتوس مغز منجر می شود (۳۷). در پژوهش زولاتزو همکاران (۲۰۱۴) روی بیماران پارکینسون، هشت هفته تمرین تناوبی با شدت متوسط مقادیر VCAM-1 سرم را کاهش داد و سبب کاهش التهاب در این افراد شد که نشان از اثر تحریکی تمرین بر برخی پاسخ های ضد التهابی در بیماران مبتلا به پارکینسون دارد (۳۸). در تحقیق ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) که روی موش های

- experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neurochemistry*. 2016;136(S1):63-73.
13. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise immunology review*. 2010;16.
 14. Limberg JK, Johansson RE, McBride PE, Schrage WG. Increased leg blood flow and improved femoral artery shear patterns in metabolic syndrome after a diet and exercise programme. *Clinical physiology and functional imaging*. 2014;34(4):282-9.
 15. Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Börjesson M. The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis—a systematic review. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):150-61.
 16. Morgan JA, Corrigan F, Baune BTJ. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. 2015;3(1):3.
 17. Gentile A, Musella A, De Vito F, Rizzo FR, Fresegna D, Bullitta S, et al. Immunomodulatory effects of exercise in experimental multiple sclerosis. 2019;10.
 18. Benson C, Paylor JW, Tenorio G, Winship I, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Experimental neurology*. 2015;271:279-90.
 19. Jin J-J, Ko I-G, Kim S-E, Shin M-S, Kim S-H, Jee Y-S. Swimming exercise ameliorates multiple sclerosis-induced impairment of short-term memory by suppressing apoptosis in the hippocampus of rats. 2014;10(2):69.
 20. Liu W, Xue X, Xia J, Liu J, Qi Z. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. 2018;227:126-35.
 21. Saffar Kohneh Quchan AH, Kordi MR, Namdari H, Shabkhez F. Voluntary wheel running stimulates the expression of Nrf-2 and interleukin-10 but suppresses interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Letters*. 2020;738:135382.
 22. Mifflin KA, Frieser E, Benson C, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running differentially affects disease outcomes in male and female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. 2017;305:135-44.
 23. Mifflin K, Baker GB, Kerr BJ. Effect of voluntary wheel running on neuroactive steroid levels in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. 2018;685:150-4.
 2. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran BJB. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). 2011;164(4):1079-106.
 3. Jiang H, Zhang F, Yang J, Han S. Angiotensin-1 ameliorates inflammation-induced vascular leakage and improves functional impairment in a rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental neurology*. 2014;261:245-57.
 4. Wang X-S, Fang H-L, Chen Y, Liang S-S, Zhu Z-G, Zeng Q-Y, et al. Idazoxan reduces blood-brain barrier damage during experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse. *European journal of pharmacology*. 2014;736:70-6.
 5. Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, et al. Physical exercise attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting peripheral immune response and blood-brain barrier disruption. *Molecular neurobiology*. 2017;54(6):4723-37.
 6. Sonar SA, Shaikh S, Joshi N, Atre AN, Lal G. IFN- γ promotes transendothelial migration of CD4+ T cells across the blood-brain barrier. *Immunology and cell biology*. 2017;95(9):843.
 7. Seo J-E, Hasan M, Han J-S, Kang M-J, Jung B-H, Kwok S-K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis and age-related correlations of NADPH oxidase, MMP-9, and cell adhesion molecules: the increased disease severity and blood-brain barrier permeability in middle-aged mice. *Journal of neuroimmunology*. 2015;287:43-53.
 8. Choi JH, Lee MJ, Jang M, Kim E-J, Shim I, Kim H-J, et al. An oriental medicine, Hyung-bangpaedok-San attenuates motor paralysis in an experimental model of multiple sclerosis by regulating the T cell response. *PloS one*. 2015;10(10):e0138592.
 9. Wang D, Li S-P, Fu J-S, Zhang S, Bai L, Guo L. Resveratrol defends blood-brain barrier integrity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Journal of neurophysiology*. 2016;116(5):2173-9.
 10. Dalgas U, Stenager E. Exercise and disease progression in multiple sclerosis: can exercise slow down the progression of multiple sclerosis? *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2012;5(2):81-95.
 11. Kim T-W, Sung Y-H. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Neuroscience*. 2017;346:173-81.
 12. 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

33. Malkiewicz MA, Szarmach A, Sabisz A, Cubala WJ, Szurowska E, Winklewski PJJ. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. 2019;16(1):15.
34. Alvarez JI, Cayrol R, Prat AJBeBA-MBoD. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. 2011;1812(2):252-64.
35. Williams JL, Klein RS. Blood-Brain Barrier Dysfunction during Central Nervous System Autoimmune Diseases. *The Blood Brain Barrier and Inflammation*: Springer; 2017. p. 175-86.
36. Zăgrean A-M, Ianos B, Sonea C, Opris I, Zăgrean L. Blood-Brain Barrier and Cognitive Function. *The Physics of the Mind and Brain Disorders*: Springer; 2017. p. 713-40.
37. Ding Y-H, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. 2005;109(3):237-46.
38. Zoladz J, Majerczak J, Zeligowska E, Mencil J, Jaskolski A, Jaskolska A, et al. Moderate-intensity interval training increases serum brain-derived neurotrophic factor level and decreases inflammation in Parkinson's disease patients. 2014;65(3):441-8.
39. Zhang Q, Zhang J, Yan Y, Zhang P, Zhang W, Xia RJB, et al. Proinflammatory cytokines correlate with early exercise attenuating anxiety-like behavior after cerebral ischemia. 2017;7(11):e00854.
40. Li F, Pendy Jr JT, Ding JN, Peng C, Li X, Shen J, et al. Exercise rehabilitation immediately following ischemic stroke exacerbates inflammatory injury. 2017;39(6):530-7.
24. Pryor WM, Freeman KG, Larson RD, Edwards GL, White LJ. Chronic exercise confers neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2015;93(5):697-706.
25. Bernardes D, Oliveira-Lima OC, da Silva TV, Faraco CCF, 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. 2013;264(1-2):24-34.
26. Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta neuropathologica*. 2008;115(3):289-96.
27. Kinni H, Guo M, Ding JY, Konakondla S, Dornbos III D, Tran R, et al. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. *Brain research*. 2011;1388:48-55.
28. Zhang F, Wu Y, Jia JN. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. 2011;177:170-6.
29. Le Page C, Ferry A, Rieu M. Effect of muscular exercise on chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of applied physiology*. 1994;77(5):2341-7.
30. Brown DA, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Caruso NM, Ehlers LB, et al. Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? *Journal of applied physiology*. 2007;103(6):1979-85.
31. Klaren RE, Motl RW, Woods JA, Miller SD. Effects of exercise in experimental autoimmune encephalomyelitis (an animal model of multiple sclerosis). *Journal of neuroimmunology*. 2014;274(1-2):14-9.
32. Larochelle C, Alvarez JI, Prat AJFL. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? 2011;23(585):3770-80.