

The effect of four weeks of physical activity in the enriched environment on inflammatory and anti-inflammatory factors in the dorsal horn of the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis

Golrokh Mohammadi¹, Mohammad Reza Kordi*², Siroos Chobineh³

Receive 2022 June 23; Accepted 2022 November 05

Abstract

Aim: An excessive increase in the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) and a decrease in the levels of Tumor necrosis factor beta1 (TGF- β 1) are associated with creating an inflammatory environment, resulting in increasing pain hypersensitivity in Different models of nerve pain. This study aimed to investigate the effect of four weeks of physical activity in an enriched environment on TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 in the dorsal horn of the spinal cord in the chronic course of Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods:** Thirty female C57BL6 mice were divided into three groups: control, EAE, and enriched environment. After induction of EAE with MOG35-55, the environmental enrichment group lived in an enriched environment for four weeks. On day 30 post-induction (chronic period of the disease), pain sensitivity was assessed by tail immersion test in water, and then the animals were sacrificed and biopsied. TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 protein levels were measured by immunohistochemistry. The data were analyzed by One-way analysis of variance at a significance level of 0.05. **Results:** The present study's findings showed that living in an enriched environment decreased the levels of TNF- α ($p=0/00$) and IL-1 β ($p=0/00$) in the dorsal horn of the spinal cord and increased the level of TGF- β 1 ($p=0/00$) protein compared to the EAE group. Also, physical activity in the enriched environment increased the delay time in extracting the tail from hot water in the chronic period of the disease ($P = 0.00$). **Conclusions:** Active lifestyle can reduce pain sensitivity in the animal model of MS disease (EAE) by reducing the levels of inflammatory factors TNF- α and IL-1 β and increasing the levels of anti-inflammatory factor TGF- β 1 in the dorsal horn of the spinal cord.

Keywords: Inflammation, neuropathic pain, environmental Enrichment, MS



Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
***(corresponding author)**
(mrkordi@ut.ac.ir)
3. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

Cite as: Golrokh Mohammadi, Mohammad Reza Kordi, Siroos Choobineh. The effect of four weeks of physical activity in the enriched environment on inflammatory and anti-inflammatory factors in the dorsal horn of the spinal cord of female C57BL6 mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.. Applied Health Studies in Sport Physiology. 2022; 9(2): 138-148.

Owner and Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

Journal ISSN (online): 2676-6507

Access Type: Open Access

DOI: 10.22049/JAHSSP.2022.27886.1481

DOR: 20.1001.1.26766507.1401.9.2.12.5



Extended abstract

Background

One of the most important symptoms of multiple sclerosis (MS) that directly affects daily life activities and the quality of life of MS patients is neuropathic pain, which affects 55-60% of patients. neuropathic pain is caused by various reasons, including demyelination and axonal damage in areas such as the dorsal horn of the spinal cord, among which increased inflammation plays an important role in the development of pain. Disturbance of the balance between inflammatory and anti-inflammatory factors, especially an increase in inflammatory cytokines and chemokines derived from microglia and astrocytes such as IL-1 β and TNF- α and a decrease in anti-inflammatory cytokines such as TGF- β in the dorsal horn of the spinal cord through neuroinflammation, it leads to increased central sensitivity and chronic neuropathic pain in MS and EAE. This study aimed to investigate the effect of four weeks of physical activity in an enriched environment on TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 in the dorsal horn of the spinal cord in the chronic course of Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Methodology

Thirty 8-week-old (18 ± 2 g) female C57BL/6J mice (Pasteur Laboratories, Tehran, Iran) were used for all experiments. Mice were housed 2 per cage in a standard 12-hour light cycle (lights on at 7 am, lights off at 7 pm) and given access to food and water ad libitum. Experimental autoimmune encephalomyelitis was induced with 50 μ g myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55), 1 mg/ml complete Freund’s adjuvant, and 100 ng of pertussis toxin (PTX) for behavioral work. A second equal injection of PTX was given 48 hours later. Mice were weighed and monitored daily up to 30 days postimmunization (dpi) with a 5-point clinical score by an experimenter blind to the treatment groups: 0, no motor symptoms; 1, paralyzed tail; 2, loss of coordinated movement; 3, both hind limbs paralyzed; 4, forelimbs paralyzed; 5, moribund. mice were divided into control, EAE, and enriched environment. After induction of EAE with MOG35-55, the environmental enrichment group lived in an enriched environment (in cages [Viewpoint; 58. 40. 32 cm (L. W. H)], which allowed social interactions (10 mice in the cage)]and physical enrichment (equipment of cages with wheel running for exercise), and provides sensory and cognitive enrichment for four weeks .On day 30 post-induction (chronic period of the disease), pain sensitivity was assessed by tail immersion test in water (Here the painful reactions in animals were produced by a thermal stimulus that is by dipping the tip of the tail in hot water) and then the animals were sacrificed and biopsied. TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 protein levels were measured by immunohistochemistry.

Results:

Table 1. includes the changes in clinical signs of mice after EAE induction. After the induction of EAE, clinical symptoms were seen in the mice from the 13th day after the induction, and the evaluation of the clinical symptoms continued until the 30th day after the induction (chronic period of the disease).

	Day of onset of symptoms	The chronic course of the disease
control group	0	0
EAE group	0.5 ± 0.52	1.33 ± 0.5
enriched environment	0.2 ± 0.42	0.52 ± 0.5

Table 1. Changes in the clinical signs of mice from the day of onset of symptoms to the chronic period of the disease

Table 2. shows the changes in the weight of mice one week before induction and in three important time periods, namely the day of induction, the day of onset of symptoms (day 13 after induction), and the chronic period of the disease (day 30 after induction).



	Weight one week before induction	induction day	Day of onset of symptoms	The chronic course of the disease
control group	17.94 ± 0.46	17.74 ± 60	19.70 ± 0.91	20.33 ± 0.95
EAE group	17.58 ± 0.39	17.71 ± 0.47	18.20 ± 0.59	17.81 ± 0.65
enriched environment	17.61 ± 0.43	17.74 ± 0.49	19.82 ± 0.93	22.19 ± 0.91

Table 2. Weight changes of mice in research groups in grams (mean ± standard deviation)

The results show that there is a significant difference between the research groups in the TNF- α variable (P=0.0001, F=70.22) and in the IL-1 β variable (P=0.0001, F=72.79). Tukey's post hoc test results show that there is a significant difference in both IL-1 β and TNF- α protein levels between the control and EAE groups (P=0.0001), living in an enriched environment and EAE (P=0.0001). Based on the findings of the present study, induction of EAE increases IL-1 β levels, and living in an enriched environment decreases IL-1 β (p=0/00) and TNF- α levels (p=0/00) in the dorsal horn of the spinal cord.

The results show that there is a significant difference between the research groups in the TGF- β 1 variable (P=0.0001, F=59.26). The results of Tukey's post hoc test show that there is a significant difference in TGF- β 1 protein levels between the control and EAE groups (P=0.0001), living in an enriched environment and EAE (P=0.0001). Based on the findings of the present study, EAE induction decreases TGF- β 1 levels, and living in an enriched environment increases TGF- β 1 levels(p=0/00).

Also, physical activity in the enriched environment increased the delay time in extracting the tail from hot water in the chronic period of the disease (P = 0.00).

conclusion

Changing the environment and lifestyle to a happy and enriched environment and active lifestyle can reduce pain hypersensitivity and increase patients' quality of life by reducing the expression of inflammatory factors such as TNF- α and IL-1 β and increasing the expression of anti-inflammatory factors TGF- β 1 in the dorsal horn of the spinal cord. An enriched environment, which is a form of voluntary activity, includes large cages that provide enrichment or social interaction (placing a large group of mice in each cage), physical enrichment (equipment of cages with wheel running for exercise), and provides sensory and cognitive enrichment (providing different tunnels and spaces for mice to communicate) at the same time, which results in the central nervous system being more receptive to drug treatments than forced training methods. Although the benefits of trained exercises are widely acknowledged, adverse effects may occasionally be noted. In animals, forced exercises such as treadmills and swimming are usually able to mitigate chronic pain and motor dysfunction. More importantly, EE has been tested effective in reducing inflammatory and neuropathic pain.

Keywords

Inflammation, neuropathic pain, environmental Enrichment, MS



مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال نهم، شماره دوم؛

بایز و زمستان ۱۴۰۱؛ صفحات ۱۳۸-۱۴۸

Open Access

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر چهار هفته فعالیت بدنی در محیط غنی شده بر عوامل التهابی و ضد التهابی در شاخ خلفی نخاع موش های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی

گلرخ محمدی^۱، محمدرضا کردی^{۲*}، سیروس چوبینه^۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۲

چکیده

هدف: افزایش بیش از حد در سطوح پروتئین های فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین یک بتا (IL-1 β) و کاهش در سطوح فاکتور رشد تغییردهنده بتا یک (TGF- β 1) با ایجاد یک محیط التهابی و در نتیجه افزایش تحریک پذیری درد در مدل های مختلف درد عصبی همراه است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر چهار هفته زندگی در محیط غنی شده بر سطوح پروتئین های TNF- α و IL-1 β و TGF- β 1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری EAE می باشد. **روش شناسی:** مطالعه حاضر از نوع توسعه ای می باشد به این منظور ۳۰ سر موش C57BL6 ماده به سه گروه کنترل، EAE و زندگی در محیط غنی شده تقسیم شدند. پس از القای EAE با MOG35-55 گروه زندگی در محیط غنی شده به مدت ۴ هفته در این محیط زندگی کردند. در روز ۳۰ پس از القا (دوره مزمن بیماری)، حساسیت به درد با تست غوطه وری دم در آب ارزیابی و سپس تشریح و بافت برداری شدند. سطوح پروتئین TNF- α ، IL-1 β و TGF- β 1 با روش ایمونوهیستوشیمی اندازه گیری شد. برای تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک راهه در سطح معناداری ۰/۰۵ استفاده شد. **یافته ها:** یافته های پژوهش حاضر نشان داد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین TNF- α ($p=0/001$) و IL-1 β ($p=0/001$) را در شاخ خلفی نخاع کاهش و سطح پروتئین TGF- β 1 ($p=0/001$) را افزایش داد. همچنین فعالیت بدنی در محیط غنی شده زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب گرم را در دوره مزمن بیماری ($P=0/001$) افزایش داد. **نتیجه گیری:** سبک زندگی فعال میتواند از طریق کاهش سطوح فاکتورهای التهابی TNF- α و IL-1 β و افزایش سطوح فاکتور ضد التهابی TGF- β 1 در شاخ خلفی نخاع حساسیت به درد را در مدل حیوانی بیماری MS (EAE) کاهش دهد.

واژه های کلیدی: التهاب، درد عصبی، زندگی در محیط غنی شده، MS

نحوه ارجاع: گلرخ محمدی، محمدرضا کردی، سیروس چوبینه. بررسی تاثیر چهار هفته فعالیت بدنی در محیط غنی شده بر عوامل التهابی و ضد التهابی در شاخ خلفی نخاع موش های ماده C57BL6 مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی. "مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش". ۱۴۰۱: ۱۳۸-۱۴۸.

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

شاپای الکترونیکی: ۶۵۰۷-۲۶۷۶

نوع دسترسی: آزاد

DOI: 10.22049/JAHSSP.2022.27886.1481

DOR: 20.1001.1.26766507.1401.9.2.12.5



با اسکن QR فوق می توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/ مشاهده کنید

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران-تهران ایران.
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران-تهران ایران. (نویسنده مسئول).
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران-تهران ایران.

mrkordi@ut.ac.ir



مقدمه

یکی از مهمترین علائم مالتیپل اسکلروزیس^۱ (MS) که به طور مستقیم بر فعالیت های زندگی روزانه و کیفیت زندگی بیماران مبتلا به MS اثر می گذارد درد مزمن عصبی است که ۵۵ تا ۶۰ درصد بیماران را تحت تاثیر قرار می دهد (۱). درد مزمن عصبی به دلایل مختلفی از جمله دمیلینه شدن و آسیب آکسونی در مناطقی مثل شاخ خلفی نخاع ایجاد می شود، که در این میان افزایش التهاب نقش مهمی در توسعه درد دارد (۲). در بیماری MS گسترش سلول های التهابی T کمک کننده ۱^۲ (Th1) (مولد سایتوکاین هایی از قبیل اینترفرون گاما (IFN- γ) و TNF- α و سلول های T کمک کننده ۱۷^۳ (Th17) (مولد سایتوکاین هایی از قبیل اینترلوکین ۱۷ (IL-17) ، اینترلوکین ۶ (IL-6) و TNF- α منجر به اختلال در فرایند بازسازی مجدد میلین، مهار بلوغ الیگودندروسیت ها و تشدید بیماری می شود (۳، ۴). از طرفی نقص سلول های ضد التهابی T کمک کننده ۲^۴ (Th2) (مولد TGF- β ، اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و سلول های T تنظیمی^۵ (Treg) که در بازبایی و افزایش بقای نورون ها نقش دارند در این بیماری مشاهده شده است (۵-۷). بنابراین به هم خوردن تعادل بین عوامل التهابی و ضد التهابی به ویژه افزایش در سایتوکاین ها و کموکاین های التهابی مشتق شده از میکروگلیا و آستروسیت ها مثل IL-1 β و TNF- α و کاهش در سایتوکاین های ضد التهابی نظیر TGF- β در شاخ خلفی نخاع از طریق ایجاد التهاب عصبی منجر به افزایش حساسیت مرکزی^۶ و درد مزمن عصبی در MS و EAE می شود (۸، ۹). TNF- α یک سایتوکاین پیش التهابی است که توسط انواع مختلفی از سلولها از جمله ماکروفاژها، نورون های حسی گانگلیون ریشه پستی^۷ و در نخاع در درجه اول توسط میکروگلیا تولید می شود (۱۰، ۱۱). اگرچه سطح طبیعی آن برای تنظیم عملکردهای سیستم ایمنی و سیستم عصبی مرکزی مثل حفظ پلاستیسیته سیناپس^۸ بسیار مهم است ولی تداوم واکنش ایمنی که در اثر تولید نا به جا و بیش از حد آن ایجاد می شود می تواند سبب ایجاد پاسخ های التهابی و خودایمنی شود (۱۲). شواهد متقاعد کننده از مطالعات انجام شده در مطالعات حیوانی و انسانی نشانگر درگیری TNF- α در علائم مختلف پاتولوژیک MS از جمله اختلالات سیستم ایمنی، دمیلینه شدن، سیناپتوپاتی^۹ و التهاب عصبی در مغز و نخاع می باشد (۱۳). IL-1 β نیز یک سایتوکاین پیش التهابی قوی در خانواده اینترلوکین ۱ (IL-1) است. اگرچه ترشح سطوح فیزیولوژیکی IL-1 β در

تنظیم تقویت طولانی مدت^{۱۰} (LTP) و حفظ پلاستیسیته سیناپس نقش دارد، اما نورون های گانگلیون ریشه پستی در پاسخ به التهاب و آسیب به مقدار زیادی IL-1 β ترشح می کنند که منجر به افزایش حساسیت مرکزی و به دنبال آن درد مزمن عصبی می شوند (۱۴). از طرف دیگر TGF- β یک سایتوکاین ضد التهابی قوی است، توسط انواع مختلف سلولهای ایمنی و غیر ایمنی تولید می شود. TGF- β عملکرد سایتوکاین های پیش التهابی، از جمله TNF- α ، اینترفرون گاما و IL-1 β را سرکوب می کند در نتیجه در پیشگیری و بهبود اختلالات خود ایمنی نقش مهمی دارد (۱۵). این فاکتور میکروگلیوز نخاعی ناشی از آسیب عصبی محیطی و فعال شدن میکروگلیا و آستروسیت نخاعی را مهار می کند، از حساسیت مرکزی جلوگیری کرده و حساسیت بیش از حد مزمن را نیز کاهش می دهد (۱۶) با توجه به اثربخشی TGF- β در تعدیل سیستم ایمنی، به یک ماده درمانی بالقوه در درمان بیماری های خود ایمنی تبدیل شده است (۱۵). از طرفی با توجه به نقش مهم TNF- α و IL-1 β در توسعه و پیشرفت بیماری های التهابی مثل MS خنثی سازی و یا مهار کردن گیرنده های آنها نقش مهمی در کنترل بیماری MS و علائم ثانویه آن مثل درد و خستگی دارد. مطالعات نشان داده اند، مداخلات دارویی مثل اتانرسپت^{۱۱} به عنوان مهار کننده TNF- α و آناکینرا^{۱۲} به عنوان آنتاگونیست گیرنده IL-1 β نقش مهمی در کاهش التهاب و درد مزمن ناشی از آن داشته است (۱۷، ۱۸).

فعالیت ورزشی همانند مداخلات دارویی از طریق کاهش در تولید سلول های Th1 منجر به تغییر در تعادل نسبت Th1/Th2 و کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود علائم ثانویه از جمله درد و خستگی در بیماران مبتلا به MS می شود (۱۹). هم چنین پژوهش ها بر روی مدل های حیوانی نشان می دهد که فعالیت ورزشی منجر به کاهش نفوذ سایتوکاین های التهابی و تخریب غلاف میلین و افزایش یکپارچگی سد خونی مغزی می شود (۲۰-۲۲). پاتل و وایت^{۱۳} نشان دادند که تفاوت قابل توجهی در سطوح BDNF و TNF- α بین گروه EAE که دویدن اجباری پیشرونده روی ترمیم انجام دادند در مقایسه با گروه کنترل EAE وجود نداشت (۲۳) هم چنین نتایج مطالعه یوزی^{۱۴} و همکاران نشان داد با وجود شنا منظم در موش های گروه EAE در مقایسه با موش هایی که فعالیت نمی کردند ، تغییری در سطح IL-17 و TGF- β در CNS مشاهده نشد (۲۴). از

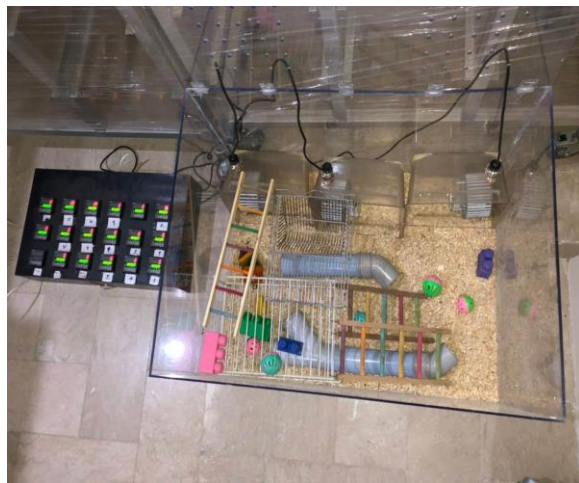
^۸ synaptic plasticity^۹ Synaptopathy^{۱۰} Long Term Potentiation^{۱۱} Etanercept^{۱۲} Anakinra^{۱۳} Patel and White^{۱۴} Xie Y^۱ Multiple Sclerosis^۲ T helper 1^۳ T helper 17^۴ T helper 2^۵ T regulatory cell^۶ Central sensitization^۷ Dorsal root ganglion

القای EAE و ارزیابی بالینی

موش های C57BL/6 با ۵۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین (MOG35-55) که در محلول بافر شده با فسفات (PBS) حل شده است همچنین ۱ میلی گرم بر میلی لیتر دمای کامل فروند (CFA) ایمن سازی شدند. تمامی حیوانات در روزهای صفر و ۲ (در روز تزریق و دو روز پس از آن) ۱۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین به صورت داخل صفاقی داشتند (۱۶). لازم به ذکر است که گروه کنترل همزمان با باقی گروه ها تزریق سالین داشتند. حیوانات به صورت روزانه برای ارزیابی وزن بدن وزن کشی شدند و علائم بالینی EAE، بر اساس مقیاس زیر توسط دو ناظر مورد ارزیابی قرار گرفت: 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 (۲۸).

پروتکل فعالیت بدنی در محیط غنی شده

پس از القای EAE موش ها برای زندگی به قفسی با مشخصات [۱۱×۱×۱ متر (طول، عرض، ارتفاع)] مجهز به ۳ عدد ویل رانینگ با محیط ۱۲/۵ سانتی متر، نردبان، اسباب بازی، بطری های آب، لوله های پلاستیکی و ظروف غذا منتقل شدند و در کل دوره در این قفس زندگی کردند (۲۹). به وسیله ی یک بورد کامپیوتری، تعداد دور های ویل رانینگ و فعالیت موش ها در قفس غنی شده ثبت شد.



شکل ۱. محیط سازی شده

تست غوطه وری دم در آب

برای ارزیابی اثر ضد درد فعالیت ورزشی تست غوطه وری دم در آب داغ در روز ۳۰ پس از القا انجام شد. بخش ۵ سانتی متری پایینی دم موش ها در یک ظرف غوطه ور شد که دمای آب در آن 55 ± 0.5 درجه سانتی گراد

طرفی پیریور^{۱۵} و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که فعالیت اختیاری منجر به کاهش نفوذ سلول های خودایمنی و کاهش مقدار دمیلینه شدن و حفظ آکسون ها و نورون های حرکتی در نخاع کمری موش های مبتلا به EAE شد (۲۵). میفلین^{۱۶} و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فعالیت اختیاری از طریق کاهش میزان سایتوکاین های التهابی (IL-17A و TNF- α) رفتارهای درد در موش های ماده را کاهش داد (۲۶). با وجود اینکه پژوهش های متعددی تاثیر فعالیت های ورزشی را به عنوان مداخله پیشگیرانه و درمانی بر جنبه های مختلف بیماری MS بررسی کرده اند. اما هنوز در مورد مناسب ترین نوع فعالیت در بیماران MS اتفاق نظر وجود ندارد. همچنین پژوهش ها در مورد تاثیر فعالیت ورزشی در کنترل درد که از مهمترین علائم ثانویه در بیماری MS است بسیار محدود است. محیط غنی سازی شده که نوعی فعالیت اختیاری است، شامل قفس های بزرگی می باشد که تعامل اجتماعی (قرار دادن گروه بزرگی از موش ها درون هر قفس) ، فعالیت بدنی (مجهز کردن قفس ها به ویل رانینگ برای انجام فعالیت ورزشی) و فعالیت های حسی و شناختی (فراهم کردن تونل ها و فضاهای مختلف برای ارتباط برقرار کردن موش ها) را به صورت همزمان فراهم می کند که نتیجه ی آن پذیرا تر بودن سیستم عصبی مرکزی برای درمان های دارویی نسبت به روش های تمرینی اجباری است (۲۷). بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر زندگی در محیط غنی سازی شده بر سطوح سایتوکاین های التهابی TNF- α و IL-1 β و سایتوکاین ضد التهابی TGF- β 1 در شاخ خلفی نخاع در موش های ماده مبتلا به EAE است.

روش پژوهش

مطالعه حاضر از نوع توسعه ای می باشد به این منظور ۳۰ سر موش ماده C57B6L ۸ هفته ای با میانگین وزنی 18 ± 2 گرم پس خریداری از انیستیتو پاستور ایران به آزمایشگاه علوم رفتاری و شناختی سالاری واقع در کرج منتقل شد و به سه گروه کنترل سالم (n=۱۰)، کنترل (n=۱۰) و زندگی در محیط غنی شده + EAE (n=۱۰) تقسیم شدند. پس از انتقال موش ها یک هفته صرف سازگاری موش ها با محیط آزمایشگاه شد. در روز ۳۰ پس از القا (دوره مزمن بیماری) تست های رفتاری مربوط به تحریک پذیری درد انجام و پس از آن با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و سپس تشریح و بافت نخاع برداشته شد. سپس قسمت کمری بافت نخاع بین L4 و L5 برای بررسی ایمونوهیستوشیمی در فرمالین ثابت شد. همه روش های پژوهش حاضر مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی با شناسه-SSRI 2202-1499 قرار گرفته است.

^{۱۶} Mifflin

^{۱۵} Pryor

بود. زمان خروج دم از آب بر حسب ثانیه به عنوان زمان واکنش ثبت شد (۳۰).

روش ایمونوهیستوشیمی

مکان یابی پروتئین های TNF- α , IL-1 β و TGF- β 1 در شاخ خلفی نخاع در ۵ نمونه از هر گروه با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور قسمت کمری نخاع با PBS طی ۴ مرحله به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. به منظور باز یابی آنتی ژنی بر روی نمونه ها اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد پس از آن به مدت ۵ دقیقه بافر بورات برای خنثی سازی اسید اضافه و سلول ها با PBS شسته شدند. به منظور نفوذ پذیر کردن غشاء سلول ها تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس دوباره نمونه ها با PBS شسته شدند و سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه برای بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. نمونه ها با PBS شستشو و آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS روی نمونه ها ریخته و یک ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. پس از آن نمونه ها ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد و ۱۰۰ لاندا از (PVP1000D-BioSystems Linker) (Diagnostic) به مدت ۱۵ دقیقه به نمونه ها اضافه شد. در ادامه ۳ مرتبه با PBS شستشو و ۱۰۰ لاندا از محلول پلیمر (PVP1000D- BioSystems Diagnostic) به مدت ۳۰ دقیقه به نمونه اضافه گردید. مجدد نمونه ها با PBS شسته شد و در ادامه ۱۰۰ لاندا از محلول DAB (ACV999-ScyTek) به نمونه اضافه شد. نمونه ها پس از ۵ دقیقه با آب شستشو داده و در انتها به مدت ۱۰ ثانیه داخل رنگ همتاکسولین قرار داده شد. پس از آن دوباره با آب شستشو و بعد از مراحل آگیری و شفاف سازی، المل روی نمونه چسبانده و با میکروسکوپ نوری (LABOMED) عکس برداری انجام گرفت (۲۱).

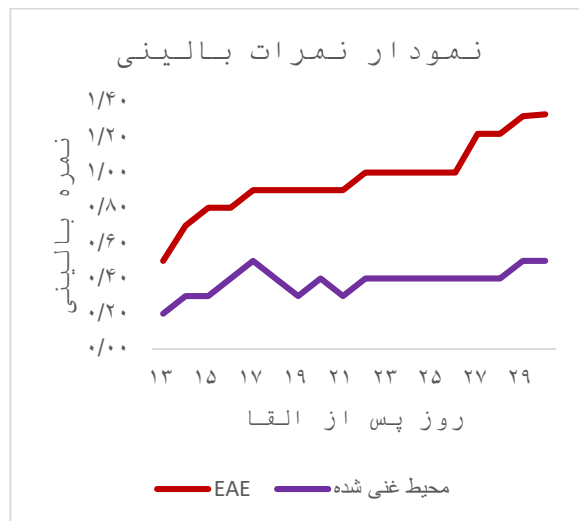
روش آماری

در این پژوهش برای گزارش میانگین ها و درصد تغییرات از آمار توصیفی استفاده شد. همچنین برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک^{۱۷} و به منظور بررسی همگن بودن واریانس از آزمون لوین^{۱۸} و برای بررسی اختلاف داده ها بین گروه ها از آزمون تعقیبی توکی و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه^{۱۹} استفاده شد. از نرم افزار SPSS ۱۶ برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. تمام تحلیل ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته ها

یافته های توصیفی پژوهش حاضر نشان می دهد که علائم بالینی در گروه های پژوهش از روز ۱۳ پس از القا آغاز شده است (گروه EAE : ۰/۵۲

$\pm 0/5$) (گروه زندگی در محیط غنی شده : $0/42 \pm 0/20$). این علائم ۳۰ روز پس از القا در گروه EAE و زندگی در محیط غنی شده به ترتیب $0/5 \pm 0/33$ و $0/52 \pm 0/50$ می باشد در شکل ۱ سیر پیشرفت بیماری از روز ۱۳ تا روز ۳۰ آورده شده است. وزن موش ها در گروه های پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین ثبت یافته های مربوط به ویل رانینگ در محیط غنی شده نشان می دهد که موش ها روزانه به طور میانگین $377/89 \pm 87/54$ متر در ویل رانینگ فعالیت داشته اند.



شکل ۲. نمرات بالینی موش ها از روز ۱۳ (شروع علائم) تا روز ۳۰ (دوره مزمن بیماری)

جدول ۱. وزن موش ها در گروه های پژوهش (میانگین \pm انحراف استاندارد)

وزن روز القا (گرم)	وزن روز شروع علائم (۱۳ روز پس از القا)	وزن (۳۰ روز پس از القا)	
$17/74 \pm 0/60$	$19/70 \pm 0/91$	$20/33 \pm 0/95$	گروه کنترل سالم
$17/71 \pm 0/47$	$18/20 \pm 0/59$	$17/8 \pm 0/65$	گروه EAE
$17/74 \pm 0/49$	$19/82 \pm 0/93$	$22/19 \pm 0/91$	گروه زندگی در محیط غنی شده

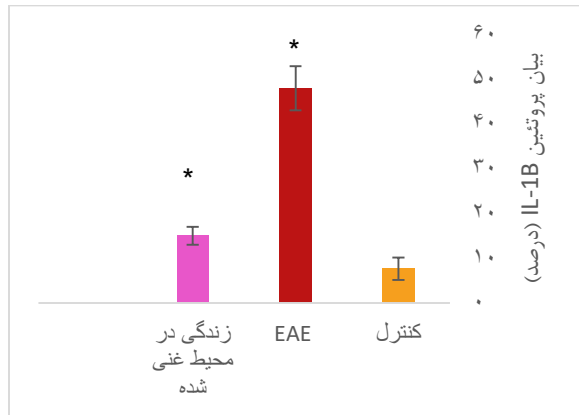
^{۱۹} One-way ANOVA

^{۱۷} Shapiro Wilk

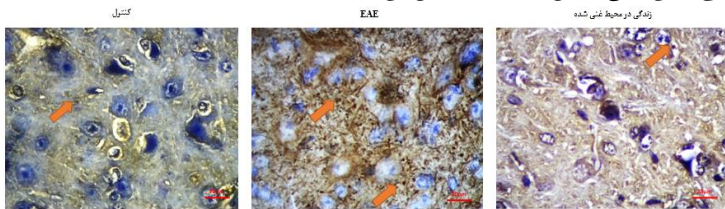
^{۱۸} Leven



پروتئین IL-1β را در مقایسه با گروه EAE کاهش داده است (شکل ۲، p=۰/۰۰۱).



شکل ۴- نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین IL-1β را در شاخ خلفی نخاع (لامین IV-VI) کاهش می‌دهد (*P≤۰/۰۰۵).



شکل ۴- نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین IL-1β را در شاخ خلفی نخاع (لامین IV-VI) کاهش می‌دهد (*P≤۰/۰۰۵).

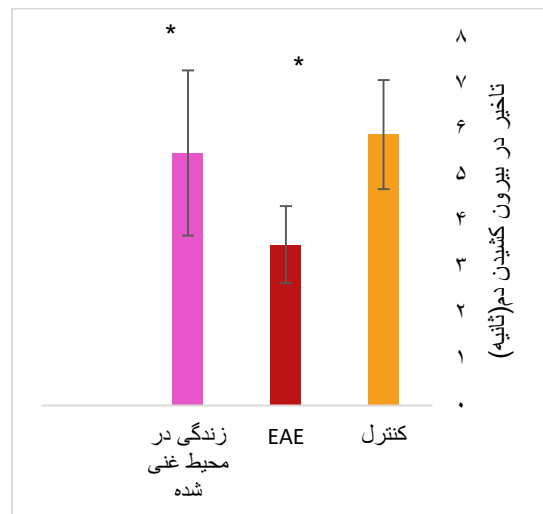
زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین TNF-α را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد.

نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که بین گروه‌های پژوهش در بیان پروتئین TNF-α در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود دارد (F=۷۰/۲۲، P=۰/۰۰۱، شکل ۵). بیان پروتئین

TNF-α در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع به طور معناداری افزایش یافته است (p=۰/۰۰۱، شکل ۵) و زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین TNF-α را در مقایسه با گروه EAE کاهش داده است (p=۰/۰۰۱، شکل ۵).

زندگی در محیط غنی شده حساسیت به درد را در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد.

نتایج آزمون غوطه‌وری دم در آب گرم نشان داد، بین گروه‌های پژوهش در حساسیت به درد (زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب) تفاوت معناداری وجود دارد (F=۱۰/۵۹، P=۰/۰۰۱) و در مقایسه با گروه کنترل و زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب گرم کاهش پیدا کرد (P=۰/۰۰۱) همچنین زندگی در محیط غنی شده حساسیت به درد را در دوره مزمن بیماری به طور معنی‌داری کاهش و زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب گرم را در مقایسه با گروه EAE در مزمن بیماری افزایش داد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۳).

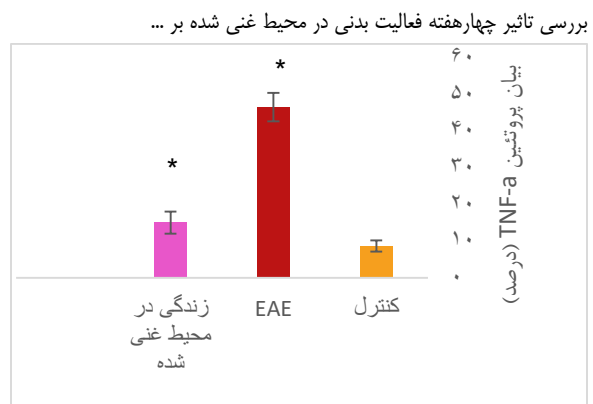
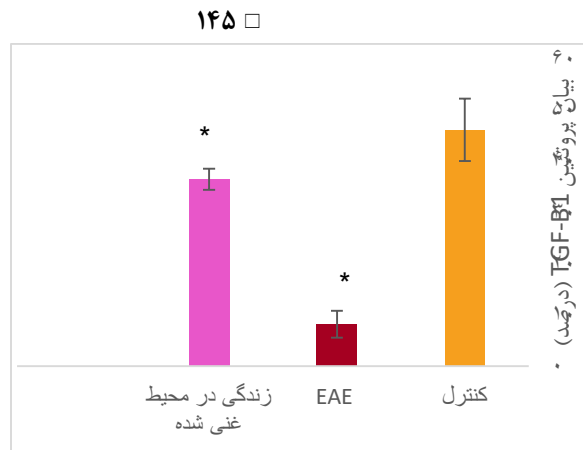


شکل ۳- نتایج آزمون غوطه‌وری دم در آب گرم نشان می‌دهد زندگی در محیط غنی شده زمان تاخیر در بیرون کشیدن دم از آب گرم را در مقایسه با گروه EAE در دوره مزمن بیماری افزایش داده (*P≤۰/۰۰۵).

زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین IL-1β را در شاخ خلفی نخاع موش‌های مبتلا به EAE در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد.

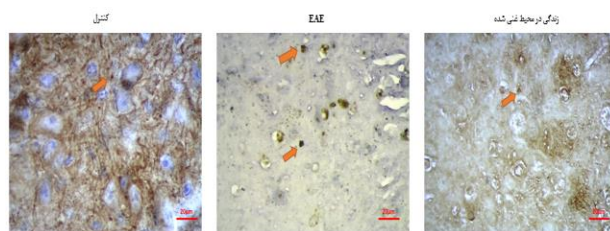
نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می‌دهد که بین گروه‌های پژوهش در بیان پروتئین IL-1β در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود دارد (F=۷۲،۷۹، P=۰/۰۰۱، شکل ۴). بیان پروتئین

IL-1β در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع به طور معناداری افزایش یافته است (p=۰/۰۰۱، شکل ۴) و زندگی در محیط غنی شده بیان



بحث

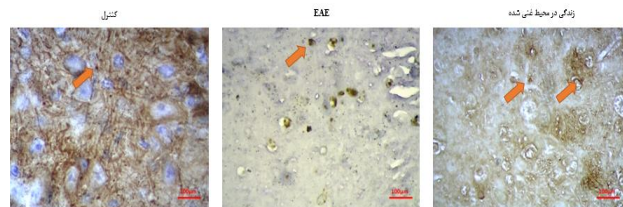
یافته های پژوهش حاضر نشان داد در دوره مزمن بیماری EAE سطوح پروتئین TGF-β1 در شاخ خلفی نخاع کاهش و سطوح TNF-α، IL-1β و حساسیت پذیری به درد افزایش یافت. این موضوع که سطوح سایتوکاین های التهابی در موش های مبتلا به EAE در سیستم عصبی مرکزی (CNS) افزایش می یابد کاملا اثبات شده است. علاوه بر نقشی که این سایتوکاین ها بر فعال شدن و به کارگیری سلول های ایمنی دارند، ممکن است بر سیگنال دهی عصبی تاثیر بگذارند و در نتیجه حساسیت به درد^{۳۱} را افزایش دهند (۳۱). به عنوان مثال بگوم^{۳۲} و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که شروع درد نوروپاتی در مدل EAE با افزایش بیان TNFα در گانگلیون ریشه پشتی و نخاع همراه است (۳۳). IL-1β توسط میکروگلیا و آستروسیت در نخاع بیان می شود و حساسیت مرکزی را از طریق تعدیل پیش سیناپسی (افزایش آزادسازی گلوتامات) و تنظیم پس سیناپسی (فسفوریلاسیون گیرنده گلوتامات N-متیل D-آسپاراتات) (NMDA) و افزایش جریان NMDA ایجاد می کند. IL-1β همچنین عملکرد گیرنده NMDA (NMDAR) پیش سیناپسی را در درد نوروپاتی تقویت می کند. علاوه بر این، IL-1β



شکل ۵- نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می دهد که زندگی در محیط غنی شده در مقایسه با گروه EAE سطوح پروتئین TNF-α را در شاخ خلفی نخاع (لامین IV-VI) کاهش می دهد *P≤۰/۰۵

زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین TGF-β1 را در شاخ خلفی نخاع موش های مبتلا به EAE در دوره مزمن بیماری افزایش می دهد.

نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان می دهد که بین گروه های پژوهش در بیان پروتئین TGF-β1 در شاخ خلفی نخاع در دوره مزمن بیماری تفاوت معناداری وجود دارد (F= ۵۹/۲۶، P=۰/۰۰۱، شکل ۶). بیان پروتئین TGF-β1 در مقایسه با گروه کنترل در شاخ خلفی نخاع به طور معناداری کاهش یافته است (p=۰/۰۰۱، شکل ۶) و زندگی در محیط غنی شده بیان پروتئین TGF-β1 را در مقایسه با گروه EAE افزایش داده است (p=۰/۰۰۱، شکل ۶).



^{۳۲} Begum

^{۳۳} N-methyl-D-aspartate

^{۲۰} Central Nervous System

^{۳۱} Nociception



ضدالتهابی، تنظیم مثبت پروتئین های شوک حرارتی، و ایجاد تغییرات در انتقال دهنده های عصبی درد نوروپاتی را کاهش دهد (۳۴). در ارتباط با شناسایی مکانیسم های درگیر در اثر فعالیت بدنی در محیط غنی شده بر کاهش سطوح پروتئین TNF α و IL-1B در شاخ خلفی نخاع موش های مبتلا به EAE و کاهش حساسیت به درد میتوان استدلال کرد که فعالیت بدنی از طریق تعدیل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز (HPA) و افزایش پروتئین های شوک گرمایی نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی و التهابی ایفا می کند. فعالیت بدنی با افزایش فیزیولوژیکی در سطوح گلوکوکورتیکوئیدها و کاتکولامین ها از طریق مهار P38MAPK سطوح سایتوکاین های التهابی مثل مانند TNF- α ، IFN- γ و IL-1B را کاهش و تولید سایتوکاین های ضد التهابی IL-10، IL-4 و TGF- β می دهند. علاوه بر این به نظر می رسد فعالیت بدنی از طریق افزایش سطوح HSP70 منجر به مهار P38MAPK و کاهش فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C و فعال شدن فاکتور نسخه برداری NF-KB می شوند و نتیجه آن کاهش تجمع اضافی IL-1B و TNF-a در نخاع و کاهش حساسیت به درد است.

در همین راستا واگنر^{۳۶} و همکاران نشان دادند، تزریق TNF α به گانگلیون ریشه خلفی نخاع باعث ایجاد حساسیت بیش از حد به درد می شود (۳۵) و از طرفی آنتی بادی خنثی کننده TNF α یا مهار کننده گیرنده TNF α در کاهش درد نوروپاتی در مدل CCI نقش دارد که می توان نتیجه گرفت این سایتوکاین در ایجاد درد در بیماری های عصبی دخیل است (۳۶). مکانیسمی که از طریق آن TNF α باعث افزایش حساسیت مرکزی و در نتیجه درد نوروپاتی می شود شامل افزایش انتقال تحریکی گلوتاماترژیک و کاهش انتقال مهارتی گاباژرژیک همچنین فسفوریلاسیون فاکتورهای از جمله ERK، P38، JNK در شاخ خلفی نخاع است (۳۷، ۳۸). مطالعات نشان داده اند که تزریق TGF- β 1 به صورت روزانه به مدت ۲-۱ هفته از موش ها در برابر EAE محافظت می کند و هنگامی که در طول القای بیماری تجویز شود شروع EAE را به تاخیر می اندازد. این اثر TGF- β 1 ممکن است بر اساس توانایی آن در سرکوب سایتوکاین های پیش التهابی باشد (۳۸). TGF- β 1 با اتصال به گیرنده TGF- β 1 (TGF-Br) و فعال کردن smad2,3 و سپس smad4 منجر به رونویسی سایتوکاین های ضد التهابی نظیر IL-10 و Treg و مهار رونویسی سایتوکاین های التهابی نظیر TNF α و IL-2 می شود. از طرفی نتایج مطالعات نشان داده اند که تزریق داخل نخاعی TGF- β 1 منجر به کاهش حساسیت به درد در موش های نوروپاتی می شود. مکانیسمی که از طریق آن TGF- β 1 باعث کاهش درد می شود شامل کاهش بیان phosphoERK و phosphoP38 در شاخ

جریان های پس سیناپسی مهارتی (IPSCs) و گابا (GABA) و جریان های ناشی از گلیسین را در نورون های نخاع سرکوب می کند (۳۳). به طور کلی این یافته ها شواهدی هستند که نشان می دهد سایتوکاین ها می توانند در افزایش بیش از حد درد^{۳۵} در EAE نقش داشته باشند (۳۲). در ترمینال های مرکزی آوران های اولیه درد، فعال شدن گیرنده های سایتوکاین ها و گیرنده های کمو کاین ها منجر به فسفوریلاسیون و فعال شدن ERK و p38 (P-ERK, P-p38) می شود. فعال شدن این فاکتورها از طریق فعال سازی کانال های یونی Nav1.7، TRPV1، و Nav1.8 منجر به آزاد شدن گلوتامات^{۳۶} (Glu) از وزیکول های سیناپسی می شود. در نورون های پس سیناپسی، افزایش آزادسازی انتقال دهنده های عصبی (به عنوان مثال Glu) منجر به فسفوریلاسیون P-ERK می شود که می تواند با تعدیل مثبت گیرنده (NMDAR)NMDA و گیرنده AMPA (AMPA) و همچنین تعدیل منفی زیر واحد کانال پتاسیم (Kv4.2) حساسیت مرکزی را ایجاد کند. P-ERK همچنین حساسیت مرکزی را از طریق ایجاد فسفوریلاسیون CREB حفظ می کند (۸).

در این پژوهش نشان دادیم که فعالیت اختیاری در محیط غنی شده سطوح سایتوکاین ضد التهابی TGF- β 1 را افزایش و سایتوکاین های التهابی TNF- α و IL-1 β در شاخ خلفی نخاع و حساسیت به درد را در دوره مزمن بیماری کاهش می دهد. در این راستا میفیلین و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فعالیت اختیاری از طریق کاهش میزان سایتوکاین های التهابی (TNF- α و IL-17A) ناشی از سلول های T واکنش دهنده به میلین و همچنین کاهش تحریک پذیری گانگلیون ریشه پستی (در نتیجه ی کاهش پاسخ های کلسیم) رفتارهای درد در موش های ماده را کاهش داد، اما در موش های نر این تغییرات ایجاد نشد (۲۶). ژای^{۳۷} و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تمرین با شدت بالا (شنا با ۴٪ وزن بدن) باعث کاهش IL1 β ، IFN- γ ، IL17، و افزایش IL-10 و TGF- β در نخاع موش های مبتلا به EAE شد (۲۴). صفار و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که فعالیت ورزشی اختیاری از طریق افزایش NRF2 و IL-10 و کاهش IL-17 و نفوذ سلول های ایمنی به نخاع، شدت بیماری را در موش های مبتلا به EAE کاهش می دهد (۲۱). مطالعات پیش بالینی از این فرضیه حمایت می کند که فعالیت ورزشی منظم باعث کاهش هایپرآلژی^{۳۸} و حساسیت به درد در مدل های حیوانی درد نوروپاتی می شود. در تحقیقات انسانی، مطالعات مشاهده ای نشان می دهد که افرادی که فعالیت بدنی بیشتری دارند، کمتر در معرض خطر ابتلا به نوروپاتی هستند. شواهد نشان می دهد که فعالیت ورزشی ممکن است از طریق تعدیل فعالیت میکروگلیا، متعادل کردن پاسخ های التهابی و

^{۳۷} Xie^{۳۸} Hyperalgesia^{۳۹} Wagner^{۳۴} inhibitory postsynaptic current^{۳۵} Hypernociception^{۳۶} Glutamate

7. Liu J, Gong N, Huang X, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1-associated neurodegeneration. *J Immunol.* 2009;182(6):3855-65.
8. Ji RR, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology.* 2018;129(2):343-66.
9. Barry A, Cronin O, Ryan AM, Sweeney B, Yap SM, O'Toole O, et al. Impact of Exercise on Innate Immunity in Multiple Sclerosis Progression and Symptomatology. *Frontiers in Physiology.* 2016;7(194).
10. Xu JT, Xin WJ, Zang Y, Wu CY, Liu XG. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain.* 2006;123(3):306-21.
11. Berta T, Park CK, Xu ZZ, Xie RG, Liu T, Lü N, et al. Extracellular caspase-6 drives murine inflammatory pain via microglial TNF- α secretion. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1173-86.
12. Farajzadeh D, Karimi-Gharigh S, Dastmalchi S. Tumor necrosis factor-alpha and its inhibition strategies: review article. *Tehran-Univ-Med-J.* 2017;75(3):159-7 [in persian]
13. Fresegna D, Bullitta S, Musella A, Rizzo FR, De Vito F, Guadalupi L, et al. Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy. *Cells.* 2020;9(10):2290.
14. Rizzo F, Musella A, Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plasticity.* 2018;2018:1-12.
15. Chen NF, Huang SY, Chen WF, Chen CH, Lu CH, Chen CL, et al. TGF- β 1 attenuates spinal neuroinflammation and the excitatory amino acid system in rats with neuropathic pain. *J Pain.* 2013;14(12):1671-85.
16. Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain.* 2009;5:16.
17. Boettger MK, Weber K, Grossmann D, Gajda M, Bauer R, Bär KJ, et al. Spinal tumor necrosis factor alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: a role for spinal tumor necrosis factor alpha during induction and maintenance of peripheral inflammation. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1308-18.
18. Zhang H, Li F, Li WW, Stary C, Clark JD, Xu S, et al. The inflammasome as a target for pain therapy. *British Journal of Anaesthesia.* 2016;117(6):693-707.
19. Einstein O, Katz A, Ben-Hur T. Physical exercise therapy for autoimmune neuroinflammation: Application of knowledge from animal models to patient care. *Autoimmunity Reviews.* 2022;21(4). ۱۰۳۰۳۳:
20. Lozinski BM, Yong VW. Exercise and the brain in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020;1352458520969099.
21. Saffar Kohneh Quchan AH, Kordi MR, Namdari H, Shabkhiz F. Voluntary wheel running stimulates the expression of Nrf-2 and interleukin-10 but suppresses

بررسی تاثیر چهار هفته فعالیت بدنی در محیط غنی شده بر ...

خلفی نخاع می باشد(۳۹, ۴۰). در پژوهش حاضر مانند سایر پژوهش هایی که از محیط غنی شده به عنوان مداخله استفاده می کنند کنترل کردن دقیق فعالیت حیوانات در طی شبانه روز در محیط غنی شده با محدودیت هایی روبرو بود که توصیه می شود در پژوهش های آتی با کم کردن زمان قرار دادن موش ها در محیط غنی شده امکان کنترل فعالیت موش ها در این محیط فراهم شود.

نتیجه گیری

تغییر محیط و سبک زندگی به محیطی پویا و فعال میتواند با کاهش فاکتورهای التهابی و افزایش فاکتورهای ضد التهابی در شاخ خلفی نخاع، حساسیت به درد را در موش های مبتلا به EAE کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ نفع متقابلی از انتشار آن ندارند.

References

1. Rodrigues DH, Leles BP, Costa VV, Miranda AS, Cisalpino D, Gomes DA, et al. IL-1 β Is Involved with the Generation of Pain in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol Neurobiol.* 2016;53(9):6540-7.
2. Robinson RR, Dietz AK, Maroof AM, Asmis R, Forsthuber TG. The role of glial-neuronal metabolic cooperation in modulating progression of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Immunotherapy.* 2019;11(2):129-47.
3. Zhu J, Jankovic D, Oler AJ, Wei G, Sharma S, Hu G, et al. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity.* 2012;37(4):660-73.
4. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *Journal of neurochemistry.* 2011;116(4):508-21.
5. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:13-25.
6. Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2011;134(Pt 5):1293-314.



36. Zanella JM, Burright EN, Hildebrand K, Hobot C, Cox M, Christoferson L, et al. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(3):227-34.
37. Zhang L, Berta T, Xu ZZ, Liu T, Park JY, Ji RR. TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*. 2011;152(2):419-27.
38. Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8219-58.
39. Chen NF, Chen WF, Sung CS, Lu CH, Chen CL, Hung HC, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF- β 1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats. *J Headache Pain*. 2016;17(1):72.
40. Wang J, Xiang H, Lu Y, Wu T. Role and clinical significance of TGF- β 1 and TGF- β R1 in malignant tumors (Review). *Int J Mol Med*. 2021;47(4):55.
- interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Letters*. 2020;738:135382.
22. Rahmati MR, Kordi MR, Ravasi AA. 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.[in persian]
23. Patel DI, White LJ. Effect of 10-day forced treadmill training on neurotrophic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2013;38(2):194-9.
24. Xie Y, Li Z, Wang Y, Xue X, Ma W, Zhang Y, et al. Effects of moderate- versus high- intensity swimming training on inflammatory and CD4(+) T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunol*. 2019;328:60-7.
25. Pryor WM, Freeman KG, Larson RD, Edwards GL, White LJ. Chronic exercise confers neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2015;93(5):697-706.
26. 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(4):870-81.
27. Silva BA, Ferrari CC. Environmental enrichment as a promising strategy for aiding multiple sclerosis treatment. *Neural Regen Res*. 2020;15(9):1660-1.
28. 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. *Journal of Neuroimmunology*. 2020;341:577172.
29. 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(4):2055217320959806.
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 Journal of Biological Sciences*. 2021;28(9):4891-9.
31. Rodrigues DH, Leles BP, Costa VV, Miranda AS, Cisalpino D, Gomes DA, et al. IL-1 β Is Involved with the Generation of Pain in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):6540-7.
32. Begum F, Zhu W, Cortes C, MacNeil B, Namaka M. Elevation of tumor necrosis factor α in dorsal root ganglia and spinal cord is associated with neuroimmune modulation of pain in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(3):677-90.
33. Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*. 2018;129(2):343-66.
34. Leitzelar BN, Koltyn KF. Exercise and Neuropathic Pain: A General Overview of Preclinical and Clinical Research. *Sports Med Open*. 2021;7(1):21-.
35. Wagner R, Myers RR. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport*. 1996;7(18):2897-901.

