پژوهش‌های فیزیولوژی و مدیریت در ورزش
دورهٔ ۱۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۳
ص ص : ۴۱ – ۲۷

تأثیر نوع فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های MMP-2، MMP-9 و Timp-1 موش‌های ماده C57BL6 مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی

نوشین خورند[۱] – محمدرضا کردی*[۲] – فاطمه شب‌خیز[۳]
۱. دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، ایران ۲و۳. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، ایران
(تاریخ دریافت : ۰۹/ ۱۱/ ۱۴۰۱ ، تاریخ تصویب : ۰۱/۲۸/ ۱۴۰۲)

چکیده

بیماری مالتی پل اسکلروزیس (MS) ناشی از تخریب غلاف عصبی میلین است. قسمتی از تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) توسط خانواده ماتریکس متالوپرتئیناز ها (MMPs) و مهار کننده های بافتی آنها (Timp) صورت‌می‌گیرد. MMPs خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که با افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی باعث تخریب غلاف میلین و آسیب عصبی می‌شود. هدف مطالعه حاضر مقایسه تأثیر فعالیت ورزشی مقاومتی و استقامتی بر بیان ژن‌های MMP-2، MMP-9 و Timp-1 موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) بود.۲۴ موش ماده C57BL6 پس از آشناسازی، به چهار گروه کنترل (Con)، EAE بی‌تحرک (SED-EAE)، EAE با تمرین مقاومتی (RT-EAE) و EAE با تمرین استقامتی (ET-EAE) تقسیم شدند. پس از القاء EAE، تمرین مقاومتی و استقامتی به‌مدت ۴ هفته (۵ روز) انجام شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی بافت‌برداری انجام شد. بیان ژن MMP-9، MMP-2 و Timp-1 هیپوکمپ توسط Real-time-PCR اندازه گیری شد. تحلیل داده‌ها افزایش معناداری را در سطح بیان MMP-2 گروه‌های SED-EAE و RT-EAE نسبت به کنترل نشان داد ($P <0.05$). اما بین کنترل و ET-EAE تفاوت معناداری در MMP-2 و MMP-9 مشاهده نشد ($P>0.05$). SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE تفاوت معناداری در بیان MMP-9 نداشتند ($P>0.05$). Timp-1 در گروه کنترل از SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE بیشتر بود ($P <0.05$). با وجود این بین SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE در بیان Timp-1 تفاوتی وجود نداشت ($P>0.05$). به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات استقامتی می‌تواند در کاهش نشانگرهای مرتبط با EAE مانند MMP-9 و MMP-2 نقش مؤثری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی

اسکلروزیس چندگانه، انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، متالوپروتئیناز، تمرین مقاومتی، تمرین هوازی.

* نویسندهٔ مسئول : پست الکترونیکی: mrkordi@ut.ac.ir

مقدمه

اسکلروزیس چندگانه[1] (MS) بیماری مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) با ماهیتی خود ایمن و التهابی است (۱). اسکلروزیس چندگانه یک بیماری است که در آن غلاف‌های میلین سلول‌های عصبی در مغز و نخاع آسیب می‌بینند. این آسیب‌دیدگی می‌تواند در تعاملات عصبی اختلال ایجاد کند و باعث به وجود آمدنِ علائم و نشانه‌های جسمی زیادی شود (۴-۲). انسفالومیلیت خودایمن تجربی[2] (EAE) یک مدل حیوانی متداول اسکلروزیس چندگانه است که از راه ایمن سازی با آنتی‌ژن های میلین یا توسط سلول‌های T ویژه میلین فعال شده از قبل[3] که به حیوانات منتقل می‌شوند، القا می‌شود (۵). هیپوکامپ ساختاری مهم در مغز است که در یادگیری و شکل گیری حافظه نقش دارد و می‌تواند در اثر انسفالومیلیت خودایمن تجربی یا MS دچار اختلال شود (۶). در واقع یافته‌های حاصل از تصویربرداری رزونانس مغناطیسی[4] (MRI) مغز در بیماران اسکلروزیس چندگانه، اختلالات ساختاری هیپوکامپ و قشر مغز را نشان داده و ارتباط آنها با اختلالات حافظه را تأیید کرده است. در مراحل اولیه اسکلروزیس چندگانه، آسیب هیپوکامپ با کاهش حجم ناحیه CA1 شروع می‌شود که به‌تدریج تا CA2، CA3 و شکنج دندانه‌دار[5] گسترش می یابد (۶). البته باید توجه داشت بافت هیپوکمپ شکل پذیری عصبی زیادی دارد، به‌طوری که در بزرگسالی توانایی نوروژنز در آن فعال است (۶). بنابراین این امید وجود دارد که با استفاده از راهبردهای مختلف بتوان آسیب‌های ناشی از اسکلروزیس چندگانه در بافت هیپوکمپ مغز را متوقف یا کاهش داد.

یکی از گزینه‌های مولکولی که در سال‌های اخیر توجه محققان در خصوص آسیب شناسی و کنترل بیماری اسکلروزیس چندگانه به خود جلب کرده است، خانواده ماتریکس متالوپرتئینازها (MMPs)[6] و مهار کننده های بافتی آنها (Timp)[7] است. ماتریکس متالوپرتئینازها یا ماتریکسین‌ها[8] خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتئولیتیک وابسته به روی هستند که در تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) نقش دارند (۷). CNS نرمال و بالغ حاوی سطوح پایین یا غیرقابل تشخیص بیشتر ماتریکس متالوپرتئینازها است (۷). با وجود این، مطالعات روی بیماران اسکلروزیس چندگانه نشان دهنده افزایش فعالیت MMP-1، MMP-2، MMP-3، MMP-7، MMP-9، MMP-11 و MMP-14 است (۷, ۸). به‌علاوه، گزارش شده‌است، سطوح مغزی MMP-2، MMP-9 و MMP-12 در شرایط اسکلروزیس چندگانه افزایش می‌یابد (۹, ۱۰). اشاره شده‌است، MMP ها به درشت مولکول‌های لایه بازال رگ‌های خونی حمله می‌کنند و یکپارچگی سد خونی مغزی[9] (BBB) را مختل کنند. بنابراین عدم تعادل بین فعالیت MMP و عملکرد سرکوب کننده آنها یعنی مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها (TIMPs) در ایجاد اسکلروزیس چندگانه نقش دارد (۱۱). ماتریکس متالوپپتیداز-۲ (MMP-2) (همچنین به‌عنوان ژلاتین از A و کلاژناز ۷۲ کیلودالتونی [kDa] نوع II شناخته می‌شود) علاوه بر عملکرد فیزیولوژیکی خود در تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی در التهاب و ایمنی ایفا می‌کند. بیان MMP-2 در بسیاری از بیماری‌های انسانی و نیز مدل‌های حیوانی بیماری‌های التهابی و ایمنی افزایش می‌یابد (۱۱). برای مثال، بیان MMP-2 در مونوسیت‌های

1. Multiple sclerosis
2. Experimental autoimmune encephalomyelitis
3. Previously activated myelin-specific T-cells
4. Magnetic resonance imaging
5. Dentate gyrus
6. Matrix metalloproteinases
7. Tissue inhibitor matrix metalloproteinase
8. matrixins
9. Blood brain barrier

بیماران اسکلروزیس چندگانه نسبت به افراد عادی بیشتر است (۱۱). همچنین، MMP-2 نه‌تنها در مونوسیت‌ها بلکه در آستروسیت‌ها، میکروگلیا و ماکروفاژها نیز قابل بیان است (۱۲). به نظر می‌رسد MMP-2 نقش مهمی در اختلال سد خونی مغزی ایفا کند، و انتقال سلول‌های ایمنی به CNS و ایجاد اسکلروزیس چندگانه را تسهیل می‌کند (۷). بنابراین، کاهش MMP-2 می‌تواند از اختلال سد خونی مغزی و مهاجرت سلول‌های التهابی به CNS جلوگیری کند.

علاوه بر MMP-2، ژلاتین از دیگری به نام MMP-9 (ژلاتین از B)، از نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و تعدادی از سلول های دیگر به‌شکل زیموژن ترشح می‌شود (۷). MMP-9 پس از فعال شدن روی بسیاری از فرآیندهای التهابی عمل می‌کند و در پیشرفت بیماری اسکلروزیس چندگانه نقش دارد (۷). افزایش بیان MMP-9 در اسکلروزیس چندگانه با شواهد موجود اثبات شده‌است (۷, ۱۳). در CNS، MMP-9 می‌تواند توسط سلول‌های اندوتلیال عروقی، مننژها، میکروگلیا، آستروسیت‌ها و سلول‌های التهابی تجمع شده، و همچنین در پلاک‌های ملتهب اسکلروزیس چندگانه و در ماده سفید به ظاهر طبیعی یا بافت انفارکتوس مغزی بیان شود (۷). پیشنهاد شده‌است، در مدل‌های انسفالومیلیت خودایمن تجربی، بیان افزایش یافته MMP-9 ممکن است در برخی تغییرات آسیب‌شناختی، مشابه MMP-2 نقش داشته باشد (۷, ۱۴). برای مثال، نفوذپذیری سد خونی مغزی را افزایش می‌دهد، نفوذ لکوسیت‌ها را به CNS تسهیل می‌کند و باعث تخریب غلاف میلین و آسیب عصبی می‌شود (۱۴). همچنین معلوم شده است، موش‌های جوان با نقص MMP-9 تا حدی در برابر توسعه انسفالومیلیت خودایمن تجربی مقاوم هستند (۷). با این حال، زمانی که هر دو ژلاتین از (MMP-2 و MMP-9) از نظر ژنتیکی حذف شدند، یک مقاومت کامل در برابر انسفالومیلیت خودایمن تجربی ناشی از پپت ید گلیکوپروتئینی الیگودندروسیت میلین مشاهده شد (۷). با توجه به این گزارش‌ها، به نظر می‌رسد MMP-2 و MMP-9 عوامل مولکولی مهمی در آسیب شناسی اسکلروزیس چندگانه به‌شمار می‌روند. از طرفی یکی از تنظیم کننده های منفی ماتریکس متالوپرتئیناز ها، مهار کننده های بافتی متالوپروتئیناز ۱ و ۲ (Timp-1/2) هستند (۷). غلظت این مهارکننده‌های ماتریکس متالوپرتئیناز در CSF و پلاسما بیماران اسکلروزیس چندگانه کم است، در حالی که در طول درمان با اینترفرون β (IFN-β)، غلظت آنها افزایش می‌یابد (۱۵). همچنین، آثار محافظتی اریتروپویتین با افزایش تعداد آستروسیت‌های بیان کننده TIMP-1 در مغز و نخاع در موارد انسفالومیلیت خودایمن تجربی همراه بوده است (۱۶). مطالعه‌ای پیشنهاد کرده است، تغییر در نسبت MMP-9/TIMP-1 به سمت فعالیت پروتئولیتیک MMP-9 می تواند پیامد تنظیم کاهشی ایمنی اسکلروزیس چندگانه باشد (۱۷). به علاوه، با استفاده از ایمونوهیستوشیمی معلوم شده است، TIMP-1 در پلاک‌های مزمن اسکلروزیس چندگانه تنظیم افزایشی شده است (۷, ۱۸).

هر چند راهبردهای دارویی و پزشکی مختلفی برای کنترل بیماری اسکلروزیس چندگانه معرفی‌شده‌اند، با وجود این، نقش راهبردهای غیردارویی به‌ویژه فعالیت ورزشی نیز در کنترل و بهبود وضعیت بیماران اسکلروزیس چندگانه مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هرچند پیشنهاد شده‌است، فعالیت بدنی، به‌ویژه تمرین ورزشی، یک رویکرد مبتنی بر شواهد برای مدیریت علائم، بازیابی عملکرد و بهبود سلامت کلی در افراد مبتلا به اسکلروزیس چندگانه است (۵, ۱۹)، با این حال، مطالعات محدودی آثار فعالیت ورزشی بر تنظیم MMP-2، MMP-9 و Timp-1 را بررسی کرده‌اند. در یک کارآزمایی کنترل شده تصادفی

(RCT) نشان داده‌شده‌است، تمرین هوازی شدید در بیماران اسکلروزیس چندگانه سطوح سرمی MMP-2 را کاهش و عملکرد شناختی را بهبود می‌بخشد (۱۰). در کارآزمایی بالینی دیگری نیز Deckx و همکاران نشان دادند، پس از ۱۲ هفته تمرین ترکیبی (مقاومتی و استقامتی) پیش‌رونده واسطه‌های التهابی TNF-a و MMP-9 در بیماران اسکلروزیس چندگانه کاهش می‌یابد (۲۰). پروسچینگر[1] و همکارانش (۲۰۱۹) نیز نشان داد، ۱۲ هفته تمرین ترکیبی به کاهش معناداری در MMP-2 بیماران اسکلروزیس چندگانه می‌انجامد (۲۱). اگرچه این نتایج حاکی از تأثیر مثبت تمرین ورزشی بر تنظیم ماتریکس متالوپرتئینازها است، اما همه مطالعات انجام‌شده، سطوح سرمی این نشانگرها را بررسی کرده‌اند. مطابق با دانش نویسندگان مطالعه حاضر، تأثیر نوع تمرین ورزشی بر سطوح MMP-2، MMP-9 و Timp-1 در بافت هیپوکمپ مدل انسفالومیلیت خودایمن تجربی تاکنون در هیچ مطالعه‌ای بررسی نشده است. با وجود این، مطالعه‌ای روی مدل‌های ایسکمیک مغزی نشان دادند فعالیت ورزشی می‌تواند بیان Timp-1 بافت مغز را افزایش و فعالیت و بیان MMP-9 را کاهش دهد (۲۲). همچنین نقش فعالیت ورزشی پیش از آسیب ایسکمیک، در پیشگیری از اختلال سد خونی مغزی با کاهش سطح پروتئین و فعالیت آنزیمی MMP-9 ثابت شده‌است (۲۲). پیشنهاد شده‌است فعالیت ورزشی ممکن است آثار محافظتی بر اختلال سد خونی مغزی ناشی از بیان بیش از حد MMP-9 ایجاد کند (۲۳). فعالیت ورزشی ممکن است با کاهش آسیب ماده سفید و اختلال سد خونی مغزی ناشی از بیان بیش از حد MMP-9 در مغز، اختلالات عصبی را بهبود بخشد (۲۳). همچنین در مدل‌های انسفالومیلیت خودایمن تجربی، رت‌هایی که یک روز پس از ایمن‌سازی شروع به دویدن کردند، تأخیری در شروع علائم بالینی و مدت زمان کوتاه‌تر عود اول[2] را نشان دادند (۲۴). الگوهای شنای اجباری و دویدن داوطلبانه- هر دو- که قبل از ایمن‌سازی شروع شده‌بودند، میزان دِمیلینه شدن را کاهش دادند و خارهای دندریت و از دست رفتن آکسون‌ها را محافظت کردند (۲۵, ۲۶). به علاوه فعالیت ورزشی پیش و در طول انسفالومیلیت خودایمن تجربی، از کاهش حافظه وابسته به انسفالومیلیت خودایمن تجربی توسط افزایش نوروژنز هیپوکامپ جلوگیری کرد (۶). همچنین غنی‌سازی محیط (قرار گرفتن در قفس‌های حاوی اشیاء مختلف از جمله چرخ‌های گردان) شدت بالینی انسفالومیلیت خودایمن تجربی را کاهش داد و تعداد سلول‌های دودمان الیگودندروسیتی در حال تکثیر[3] را افزایش داد (۲۷). با وجود این، سازوکارهای مولکولی که فعالیت ورزشی می‌تواند به‌عنوان یک گزینه پیشگیرانه و درمانی اسکلروزیس چندگانه تلقی شود هنوز به‌خوبی شناسایی نشده‌اند. بنابراین، با توجه به کمبود شواهد پژوهشی درباره مقایسه آثار فعالیت ورزشی مقاومتی و استقامتی بر تنظیم نشانگرهای MMP-9، MMP-2 و TIMP-1 مطالعه حاضر قصد پاسخ‌گویی به این سؤال را دارد که تأثیر نوع فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های MMP-2، MMP-9 و Timp-1 در بافت مغز موش‌های ماده C57BL6 مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی چگونه است.

روش‌شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از نوع توسعه‌ای آزمایشگاهی طراحی شد و با شناسه اخلاق (IR.UT.SPORT.REC.1400.049) توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه

1. Proschinger
2. First relapse
3. Proliferating digodendrocyte lineage cells

تهران مورد تأیید قرار گرفته است. نمونه مورد مطالعه شامل ۲۴ موش ماده C57BL6 8 با دامنه سنی ۸–۹ هفته‌ای و میانگین وزنی ۰/۵۲ ± ۱۷/۷۸ گرم تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات پاستور بودند. پس از طی ۲ هفته آشناسازی (هفته اول آشنایی با محیط آزمایشگاه و هفته دوم آشنایی با ابزار تمرینی و پروتکل ورزشی) به‌طور تصادفی به ۴ گروه: ۱-کنترل سالم (Con، تعداد=۶)، ۲-انسفالومیلیت خود ایمن تجربی بی‌تحرک (SED-EAE، تعداد=۶)، ۳-تمرین مقاومتی مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی (RT-EAE، تعداد=۶) و ۴- گروه تمرین استقامتی مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی (ET-EAE، تعداد=۶) تقسیم شدند.

روش نگهداری حیوانات

حیوانات پس از علامت‌گذاری در قفس‌های پلی‌کربنات (با درب توری و به ابعاد ۲۵ × ۲۷ × ۴۳ سانتی‌متر) به‌طور جداگانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط ۳۰–۴۰ درصد با حفظ چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. وزن کشی حیوانات در اول هر هفته با ترازوی دیجیتال مخصوص حیوانات انجام شد. رژیم غذایی رت‌ها شامل الگوی تغذیه استاندارد رت‌ها تهیه شده از صنایع غذایی به پرور بود. تمام پروتکل‌های آزمایشگاهی طبق قوانین و دستورالعمل‌های کمیته اخلاق دانشگاه تهران انجام شد.

نحوه القای – انسفالومیلیت خودایمن تجربی و ارزیابی بالینی

موش‌های C57BL6 با ۵۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیتس گلیکوپروتئین (MOG35-55) که در محلول بافرشده با فسفات (PBS) حل شده‌است، و ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر دوای کامل فروند (CFA) ایمن سازی شدند. همه حیوانات در روز تزریق و دو روز بعد از آن به صورت داخل صفاقی ۱۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین داشتند (۲۸). لازم به ذکر است گروه کنترل همزمان با سایر گروه‌ها تزریق سالین داشتند. علائم بالینی انسفالومیلیت خودایمن تجربی، توسط دو ناظر مستقل ارزیابی شد. معیار ارزیابی شامل 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. نمرات ارزیابی بالینی و وزن موش‌ها در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

بافت‌برداری

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه مداخله (روز ۳۰ پس از القا انسفالومیلیت خودایمن تجربی)، حیوانات در شرایط ناشتایی (۱۲ ساعت) توسط داروی زایلازین (۱۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن) وکتامین (۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس عملیات تشریح انجام و بافت هیپوکمپ مغز نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شد.

پروتکل تمرین

برای سازگاری حیوانات با شرایط محیطی از جمله تغییر چرخه تاریکی به روشنایی، یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و یک هفته آشنایی با تمرین ورزشی در نظر گرفته شد. آشنایی با تمرین مقاومتی به‌مدت یک هفته با بالا رفتن از نردبان (۱/۱ متر × ۰/۱۸ متر ،۳ سانتی‌متر ارتفاع هر پله، ۸۰ درجه شیب) انجام شد. بار محاسبه شده برحسب وزن بدن به‌وسیله چسب کاغذی به دم موش‌ها متصل شد و بالا رفتن حیوان از پایین نردبان به بالای آن به‌عنوان یک تکرار موفق ثبت شد. موش‌های گروه RT-EAE برای ۵ روز در هفته، به‌مدت ۴ هفته و روزانه ۳۰

دقیقه تمرین مقاومتی (۸-۱۲ تکرار در هر جلسه، ۲ دقیقه استراحت بین هر تکرار) را اجرا کردند (۲۹). شدت تمرین مقاومتی در هفته اول ۲۵ درصد وزن بدن، هفته دوم ۵۰ درصد وزن بدن، هفته سوم و چهارم ۷۵ درصد وزن بدن بود. گروه ET-EAE پس از یک دوره سازگاری با محیط استخر (۴ روز)، برنامه تمرین استقامتی شنا را به‌مدت ۳۰ دقیقه ۵ روز در هفته در استخر شنای حیوانات (۱۰۰ × ۱۰۰ × ۸۰ سانتی‌متر) با دمای ۱ ± ۳۱ سانتی‌گراد و در طول ۴ هفته انجام دادند. برای تشویق موش‌ها به ادامه شنا کردن از یک قطعه اسفنج استفاده شد (۲۶).

جدول ۱. تغییرات وزن و نمرات بالینی گروه‌های مورد مطالعه

زمان اندازه‌گیری	گروه	وزن (گرم)	نمرات بالینی
		انحراف استاندارد ± میانگین	انحراف استاندارد ± میانگین
هفته آشناسازی	CON	۱۷/۹۴ ± ۰/۴۶	-
	SED-EAE	۱۷/۵۵ ± ۰/۴۱	
	RT-EAE	۱۷/۸ ± ۰/۶۹	
	ET-EAE	۱۷/۸۵ ± ۰/۴۹	
ابتدای هفته اول تمرینات	CON	۱۷/۸۵ ± ۰/۶۹	-
	SED-EAE	۱۷/۷۳ ± ۰/۶۷	
	RT-EAE	۱۸/۰۰ ± ۱/۳۲	
	ET-EAE	۱۸/۴۱ ± ۱/۳۴	
ابتدای هفته دوم تمرینات	CON	۱۸/۳۴ ± ۱/۰۶	-
	SED-EAE	۱۷/۲۴ ± ۰/۷۱	
	RT-EAE	۱۷/۹۴ ± ۰/۸۶	
	ET-EAE	۱۷/۳۶ ± ۱/۴۳	
ابتدای هفته سوم تمرینات	CON	۱۹/۶۷ ± ۰/۹۶	صفر
	SED-EAE	۱۸/۳۱ ± ۰/۶۲	۰/۵۵ ± ۰/۵۲
	RT-EAE	۱۷/۶۴ ± ۱/۱۷	۰/۲۲ ± ۰/۴۴
	ET-EAE	۱۷/۱۵ ± ۱/۳۳	۰/۴۴ ± ۰/۵۲
ابتدای هفته چهارم تمرینات	CON	۱۹/۵ ± ۰/۷۵	صفر
	SED-EAE	۱۷/۰۱ ± ۰/۷۵	۰/۸۸ ± ۰/۳۳
	RT-EAE	۱۶/۹۷ ± ۱/۳۴	۰/۴۴ ± ۰/۵۲
	ET-EAE	۱۸/۴۶ ± ۰/۷۹	۰/۴۴ ± ۰/۵۲
قبل از بافت‌برداری	CON	۲۰/۲۴ ± ۰/۹۷	صفر
	SED-EAE	۱۷/۸۱ ± ۰/۶۵	۱/۳۳ ± ۰/۵
	RT-EAE	۱۹/۱۷ ± ۱/۴۶	۰/۶۶ ± ۰/۵
	ET-EAE	۱۸/۷۸ ± ۱/۸۰	۰/۶۶ ± ۰/۵

سنجش بیان ژن

سنجش بیان ژن توسط real time PCR انجام شد. بدین‌منظور ابتدا بافت هموژنایز و فرایند استخراج RNA انجام شد. سپس RNA حاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت Easy cDNA synthesis kit (ساخت پارس توس، ایران) انجام شد. سپس cDNA آماده شده در دمای 20 C- نگهداری شد.

جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم‌افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و از ژن Gapdh به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). برای هر ژن مخلوطی از اجزای مختلف PCR شامل SYBER Green Master mix تهیه شد. پس از میکس کردن و اسپین داخل میکرو تیوب‌های مخصوص دستگاه توزیع شد. در هر و یال ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA نیز اضافه شد. سپس برنامه دستگاه Real-time PCR تنظیم و پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها و میزان نشرفلورسانس با محاسبه ΔΔCt میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به Gapdh اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ میزان بیان نسبی ژن‌های MMP-2، MMP-9 و Timp-1 محاسبه شد.

جدول ۲. لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

هاژن	توالی پرایمرها
MMP-2	Forward: 5'- CGAGAAGCAGAGGCAGTAGAG-3'
	Reverse: 5'- GAACTTGATGATGGGCGATGG-3'
MMP-9	Forward: 5'-CCCCATGTCACTTTCCCTTCA-3'
	Reverse: 5'-AGATGAACGGGAACACACAGG-3'
Timp-1	Forward: 5'-GCGGTGGGTGGATGAGTAATG-3'
	Reverse: 5'-CAAGAGGATGCCAGATGCCAG-3'
Gapdh	Forward: 5'- ACTCCACTCACGGCAAATTC-3'
	Reverse: 5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'

تجزیه و تحلیل داده‌ها

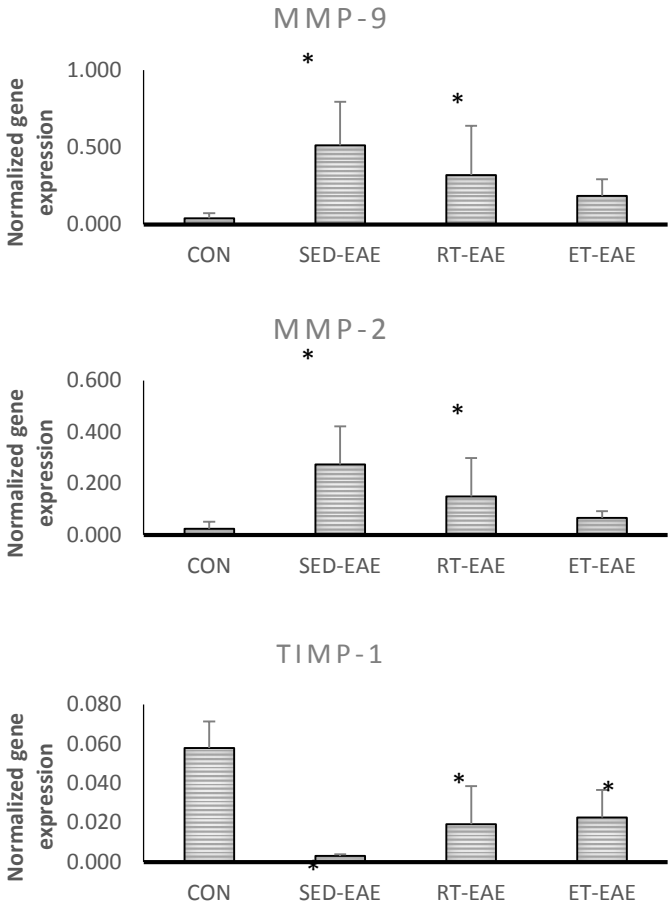
کلیه عملیات‌های آماری در مطالعه حاضر با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل استنباطی داده‌ها از آزمون آنوای یک راهه در سطح $P<0.05$ استفاده شد. با توجه به عدم برقراری پیش فرض همگنی واریانس‌ها، از آزمون و لچ و نیز آزمون تعقیبی Games-Howell به‌منظور مقایسه جفتی گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌ها نشان داد اثر اصلی گروه بر MMP-2، MMP-9 و Timp-1 معنادار بود ($P<0.05$) (جدول ۳). انسفالومیلیت خودایمن تجربی به‌طور معناداری بیان MMP-2 را افزایش داد به‌طوری که سطوح آن در گروه کنترل در حد معناداری کمتر از گروه‌های SED-EAE ($P=0.03$) ، RT-EAE ($P=0.02$) بود (شکل ۱). با وجود این، بین گروه کنترل و ET-EAE تفاوت معناداری در بیان MMP-2 مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۱). بین سه گروه SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE تفاوت معناداری در بیان MMP-2 مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۱). همچنین، بیان MMP-9 نیز در گروه‌های SED-EAE ($P=0.03$) و RT-EAE ($P=0.008$) بیشتر از گروه کنترل بود، با وجود این بین گروه کنترل و ET-EAE تفاوت معناداری در بیان MMP-9 مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۱). به‌علاوه، گروه‌های SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE نیز تفاوت معناداری در بیان MMP-9 نداشتند ($P>0.05$) (شکل ۱). بیان Timp-1 در کنترل به‌طور معناداری از گروه‌های SED-EAE ($P=0.001$)، RT-EAE ($P=0.002$) و ET-EAE ($P=0.006$) بیشتر بود (شکل ۱). با وجود این بین گروه‌های SED-EAE، RT-EAE و ET-EAE در بیان Timp-1 تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۱).

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه

متغیر (واحد)	گروه	انحراف استاندارد ± میانگین	درجه آزادی	آماره	sig
MMP-9 (تغییرات نسبی)	CON	۰/۰۳۹۴ ± ۰/۰۳۲	(۳ ، ۹/۱۳)	۱۴/۹۱	۰/۰۰۱
	SED-EAE	۰/۵۱۳ ± ۰/۲۸۱			
	RT-EAE	۰/۳۱۹ ± ۰/۱۲۳			
	ET-EAE	۰/۱۸۵ ± ۰/۱۰۷			
MMP-2 (تغییرات نسبی)	CON	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۲۶	(۳ ، ۱۰/۲۸)	۹/۵۵	۰/۰۰۳
	SED-EAE	۰/۲۷۴ ± ۰/۱۴۷			
	RT-EAE	۰/۱۴۹ ± ۰/۰۷۲			
	ET-EAE	۰/۰۶۶ ± ۰/۰۲۵			
Timp-1 (تغییرات نسبی)	CON	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۱۳	(۳ ، ۸/۴۰)	۳۵/۳۹	۰/۰۰۱
	SED-EAE	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۰۰۸			
	RT-EAE	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۱۱			
	ET-EAE	۰/۰۲۲ ± ۰/۰۱۴			



شکل ۱) تغییرات بیان ژن‌های MMP-2، MMP-9 و TIMP-1 در گروه‌های مورد مطالعه. MMP: متالوپروتئیناز، **TIMP**: مهارکننده متالوپروتئیناز، **EAE**: انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، کنترل سالم (**Con**)، انسفالومیلیت خودایمن تجربی بی‌تحرک (**SED-EAE**)، تمرین مقاومتی مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی (**RT-EAE**) و گروه تمرین استقامتی مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی (**ET-EAE**)، * تفاوت معنادار با گروه کنترل (**P <0.05**).

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی یافته‌های‌های مطالعه حاضر نشان داد، ۴ هفته تمرین استقامتی در موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی می‌تواند بیان MMP-9 و MMP-2 را تا سطوح گروه کنترل سالم کاهش دهد. با این حال ۴ هفته تمرین مقاومتی تأثیر معناداری بر کاهش MMP-2 یا MMP-9 در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی ندارد. همچنین، به نظر می‌رسد ۴ هفته تمرین ورزشی برای تغییرات بیان Timp-1 بافت عصبی در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی محرک کافی نیست. به‌طور خلاصه یافته‌های مطالعه حاضر، با برخی مطالعات قبلی همسو (۱۰, ۲۰-۲۳, ۳۰, ۳۱) و برخی ناهمسو (۲۲, ۳۰, ۳۱) است. با وجود این، مطالعاتی که به‌طور دقیق تأثیر فعالیت ورزشی را بر سطوح MMP-9، MMP-2 و Timp-1 در بافت مغز بررسی کرده باشند بسیار محدود است. به علاوه، هیچ‌یک از این مطالعات تغییرات این پروتئین‌ها را در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی بررسی نکرده‌اند. برای مثال، مطالعه گو و همکارانش (۳۰) نشان داده است، ۳ هفته تمرین هوازی (۵ روز در هفته/ ۳۰ دقیقه در روز) پیش از القاء سکته قلبی اگرچه بیان ژن MMP-9 ناشی از سکته مغزی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش نمی‌دهد، اما میزان پروتئین MMP-9 به‌طور معناداری در گروه تمرین کرده کمتر بود (۳۰). همچنین تمرین ورزشی باعث افزایش معناداری در بیان و سطوح پروتئین Timp-1 شد. با وجود این، تفاوت در وضعیت بالینی نمونه‌های مطالعه حاضر (انسفالومیلیت خودایمن تجربی در مقابل القاء سکته مغزی) و نیز تفاوت در روش شناسی پژوهشی می‌تواند تا حدی ناهمسویی نتایج درباره پروتئین Timp-1 را توضیح دهد (۳۰). برای مثال در مطالعه حاضر تأثیر فعالیت ورزشی پس از القاء انسفالومیلیت خودایمن تجربی بررسی شده‌است در حالی که در مطالعه گو و همکارانش (۳۰) تأثیر پیش آماده سازی با فعالیت ورزشی قبل از القاء سکته مغزی بررسی شده‌است. با توجه به نتایج گو و همکارانش (۳۰) و نیز یافته‌های مطالعه حاضر به نظر می‌رسد تمرینات استقامتی کوتاه‌مدت (۴-۳) هفته، می‌تواند آثار معناداری بر تنظیم کاهشی سطوح MMP-9 به‌ویژه در شرایط‌های التهابی نظیر انسفالومیلیت خودایمن تجربی و سکته مغزی داشته باشد. همسو با این نتایج، مطالعه دیگری نیز نشان داده است فعالیت ورزشی زودهنگام پس از القاء سکته مغزی (۲۴ ساعت پس از آسیب ایسکمیک مغزی، ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل/۳ روز) می‌تواند با کاهش MMP-9 و نیز افزایش Timp-1 آثار محافظتی برای سد خونی مغزی فراهم کند (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر نیز لی و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند، دویدن روی تردمیل به مدت ۱۴ هفته (۳۰ دقیقه در روز) با کاهش آسیب ماده سفید و اختلال سد خونی مغزی ناشی از بیان بیش از حد MMP-9 در مغز، اختلالات عصبی ایسکمیک را بهتر می کند (۲۳).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و نیز نتایج مطالعات انسانی (۱۰, ۱۲, ۱۷) و حیوانی (۲۲, ۲۳, ۳۰) قبلی می توان کاهش بیان و سطوح پروتئینی MMP-9 و MMP-2 در بافت مغز را یکی از مهمترین سازوکارهای محافظتی فعالیت ورزشی استقامتی در برابر اختلالات بافت عصبی مغز دانست. اگرچه یکی از مهم‌ترین سرکوب کنندگان ماتریکس متالوپرتئیناز ها پروتئین‌های مهارکننده‌های Timp هستند، با این حال نتایج مطالعه حاضر نشان‌می دهد کاهش‌های معنادار MMP-2 و MMP-9 پس از تمرین استقامتی با افزایشی غیر معنادار در Timp-1 مغز همراه شد. بنابراین می‌توان گفت، Timp تنها سازوکار ناشی از فعالیت ورزشی برای کاهش ماتریکس متالوپرتئیناز ها در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی نیست. با این

حال، تنظیم سطوح بیان ژن MMP-9 و MMP-2 با تنظیم سطوح پروتئینی آنها و نیز فعالیت آنها متفاوت است. به‌علاوه، در مطالعه حاضر بیان ژن MMP-9، MMP-2 و Timp-1 ارزیابی شده‌است، در حالی که سطوح پروتئینی و نیز فعالیت آنها ارزیابی نشده است. از آن جایی که ارتباط معکوس بین سطوح پروتئینی Timp-1 و MMP-9 وجود دارد، و نیز سازوکارهای پیشنهادی نیز از نقش مهار کننده Timp-1 بر MMP-9 حمایت می‌کنند، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، علاوه بر بیان ژن، سطوح پروتئینی این نشانگرها نیز مورد توجه قرار گیرد. همچنین، برخی مطالعات ارتباط بین سیتوکین ها و بیان MMP-2 و MMP-9 را نشان داده‌اند (۳۴-۳۲). برای مثال نشان داده شده‌است، سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α و IL-1β به‌عنوان تنظیم کننده‌های قوی بیانMMP-9 و MMP-2 عمل می‌کنند (۳۳, ۳۴) در حالی که اینترلوکین ۴ (IL-4) به‌عنوان تنظیم کننده‌های منفی MMP-9 و MMP-2 عمل می‌کند (۳۴). با وجود این، مطالعه‌ای نشان داده است، ۴ هفته تمرین استقامتی یا قدرتی تولید سیتوکین‌های پیش التهابی اینترفرون (IFN-γ)، اینترلوکین 17-(IL) و IL-1β را در نخاع موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی مهار می‌کند (۲۹). همچنین این مطالعه نشان داد، تمرین جسمانی منظم پیشرفت و علائم پاتولوژیک انسفالومیلیت خودایمن تجربی را کاهش می‌دهد (۲۹). بنابراین یکی از سازوکارهای پیشنهادی برای کاهش بیان MMP-9 و MMP-2 در مطالعه حاضر می‌تواند آثار سرکوب کننده تمرین ورزشی بر عوامل پیش التهابی باشد (۲۹, ۳۵, ۳۶). به‌علاوه اشاره شده‌است فعالیت ورزشی ممکن است با افزایش سازوکارهای ضد التهابی، عدم تعادل بین سایتوکین‌های Th1 (سلول‌های T کمکی نوع ۱) پیش التهابی و سایتوکین‌های Th2 ضد التهابی (مانند IL-4 و اینترلوکین ۱۰ (IL-10)) را خنثی کند و در نتیجه به بهبود نیم رخ التهابی در بیماران اسکلروزیس چندگانه کمک کند (۳۷). علاوه بر عوامل پیش التهابی، نشان داده‌شده‌است واکنش‌های ردوکس نیز بر فعالیت ماتریکس متالوپرتئیناز ها نقش دارند (۳۸, ۳۹). در واقع گزارش شده‌است رادیکال های آزاد، پراکسی نیتریت (ONOO-) و پروتئازها ماتریکس متالوپرتئیناز ها از جمله MMP-9 و MMP-2 را فعال می‌کنند (۴۰). از این رو، یکی دیگر از سازوکارهای پیشنهادی برای کاهش MMP-9 و MMP-2 در مطالعه حاضر می‌تواند تعدیلات استرس اکسایش ناشی از تمرین استقامتی باشد (۴۰). در این باره، نشان داده است، تمرین تداوم شدید، از CNS در برابر التهاب عصبی خود ایمن با کاهش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژنی[1](ROS) مشتق از میکروگلیال محافظت می‌کند (۴۱). به‌علاوه سوزا و همکاران در مدل انسفالومیلیت خودایمن تجربی نشان دادند فعالیت ورزشی به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، اکسایش پروتئین‌ها و سطوح NO همراه با افزایش سطوح گلوتاتیون، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و Nrf2 که یک فاکتور رونویسی مهم آنتی اکسیدانی است، منجر می‌شود (۲۹). جالب توجه است که به‌طور ویژه‌ای در بافت هیپوکمپ تأیید شده‌است پیام رسانی ناشی از عامل رشد عصبی مشتق از مغز[2](BDNF) می‌تواند با افزایش فعالیت Nrf2 بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را افزایش دهد (۴۲). از طرفی، BDNF یکی از نوروتروفین هایی است که به شدت توسط فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد و به‌نوعی مهم ترین سازوکار محافظتی ناشی از فعالیت ورزشی در بیماری های عصبی است (۴۰). همچنین گزارش شده است، سلول های عصبی به فعالیت ورزشی هوازی با فعال سازی مسیرهای پیام رسانی گوناگونی از جمله یون کلسیم، cAMP، پروتئین اتصالی عنصر پاسخ cAMP (CREB) و

1. Reactive oxygen species

2. Brain-derived neurotrophic factor

PGC-1a پاسخ می دهند (۴۰). این مسیرهای پیام رسانی می توانند بیوژنز میتوکندریایی و مقاومت در برابر استرس سلولی را تحریک کنند. این مسیرها با تنظیم دفاع آنتی اکسیدانی، اتوفاژی/میتوفاژی و ترمیم DNA با چالش های زیان باری چون استرس اکسایشی و التهاب نیز مقابله می کنند (۴۰). از آن جاییکه مطالعه حاضر نشانگرهای استرس اکسایشی یا پیش التهابی ارزیابی نشده اند، با توجه به این محدودیت، پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی تعامل این سازوکارها در ارتباط با بیان MMP-9 و MMP-2 ناشی از فعالیت ورزشی در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی بیشتر بررسی شود.

در مجموع یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد، ۴ هفته تمرین استقامتی در موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی می‌تواند بیان MMP-9 و MMP-2 را تا سطوح گروه کنترل سالم کاهش دهد. با این حال ۴ هفته تمرین مقاومتی تأثیر معناداری بر کاهش MMP-2 یا MMP-9 در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی ندارد. همچنین، به نظر می‌رسد ۴ هفته تمرین ورزشی برای ایجاد تغییرات بیان Timp-1 بافت عصبی در شرایط انسفالومیلیت خودایمن تجربی کافی نیست. از این رو، ممکن است دوره‌های طولانی‌تر تمرین ورزشی و نیز دست کاری متغیرهای مانند شدت، مدت و حجم تمرین بر پاسخ های سازشی ماتریکس متالوپرتئیناز و Timp تأثیر گذار باشد. در نهایت با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد تمرین استقامتی یک راهبرد غیردارویی مؤثر کاهش تخریب CNS ناشی از انسفالومیلیت خودایمن تجربی یا بیماری اسکلروزیس چندگانه باشد.

پیرو مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد که ایزوفرمهای دیگر متالوپروتیئناز که در اسکلروزیس چندگانه نقش دارند همانند MMP-3، MMP-7، MMP-12، MMP-14 و همچنین مهارکننده بافتی TIMP-2 مورد مطالعه قرار بگیرند. همچنین اندازه‌گیری بیان پروتئینی MMP-2 یا MMP-9 و Timp در مداخلات ورزشی در بیماری اسکلروزیس چندگانه پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری مصوب گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران است. لذا بدین وسیله از اساتید محترم دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران و همچنین همکاری اعضای شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد که زمینه تحقیق حاضر را فراهم کردند تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1. Veljkovic E, Xia W, Phillips B, Wong ET, Ho J, Oviedo A, et al. Chapter 3 - Multiple Sclerosis. In: Veljkovic E, Xia W, Phillips B, Wong ET, Ho J, Oviedo A, et al., editors. Nicotine and Other Tobacco Compounds in Neurodegenerative and Psychiatric Diseases: Academic Press; 2018. p. 25-30.
2. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2008;7(3):268-77.
3. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. Pharmacy and Therapeutics. 2012;37(3):175.
4. Compston A, Winedl H, Kieseier B. Coles. Multiple sclerosis Lancet. 2008;372:1502-17.

5. Lozinski BM, Yong VW. Exercise and the brain in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2022;28(8):1167-72.

6. 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.

7. Mirshafiey A, Asghari B, Ghalamfarsa G, Jadidi-Niaragh F, Azizi G. The significance of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis. Sultan Qaboos University Medical Journal. 2014;14(1):e13.

8. Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesionek D, Rejdak K, Stryjecka-Zimmer M, Stelmasiak Z. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis. Neurologia i neurochirurgia polska. 2005;39(1):63-7.

9. Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L, et al. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. Brain. 2001;124(9):1743-53.

10. Zimmer P, Bloch W, Schenk A, Oberste M, Riedel S, Kool J, et al. High-intensity interval exercise improves cognitive performance and reduces matrix metalloproteinases-2 serum levels in persons with multiple sclerosis: A randomized controlled trial. Multiple Sclerosis Journal. 2018;24(12):1635-44.

11. Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. Brain. 2003;126(12):2738-49.

12. Benešová Y, Vašků A, Novotná H, Litzman J, Štourač P, Beránek M, et al. Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2009;15(3):316-22.

13. Opdenakker G, Nelissen I, Van Damme J. Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2003;2(12):747-56.

14. Sang Q-X, Muroski M, Roycik M, Newcomer R, Van den Steen P, Opdenakker G, et al. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. Current pharmaceutical biotechnology. 2008;9(1):34-46.

15. Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashdeh H, Miller A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-β therapy in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis patients. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society. 2001;50(4):443-51.

16. Thorne M, Moore CS, Robertson GS. Lack of TIMP-1 increases severity of experimental autoimmune encephalomyelitis: Effects of darbepoetin alfa on TIMP-1 null and wild-type mice. Journal of neuroimmunology. 2009;211(1-2):92-100.

17. Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato M, Baldi E, Casetta I, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2006;12(3):294-301.

18. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 1996;55(12):1194-204.

19. Negaresh R, Motl RW, Mokhtarzade M, Dalgas U, Patel D, Shamsi MM, et al. Effects of exercise training on cytokines and adipokines in multiple sclerosis: a systematic review. Multiple sclerosis and related disorders. 2018;24:91-100.

20. Deckx N, Wens I, Nuyts AH, Hens N, De Winter BY, Koppen G, et al. 12 weeks of combined endurance and resistance training reduces innate markers of inflammation in a randomized controlled clinical trial in patients with multiple sclerosis. Mediators of inflammation. 2016;2016.

21. Proschinger S, Joisten N, Rademacher A, Schlagheck ML, Walzik D, Metcalfe AJ, et al. Influence of combined functional resistance and endurance exercise over 12 weeks on matrix metalloproteinase-2 serum concentration in persons with relapsing-remitting multiple sclerosis–a community-based randomized controlled trial. BMC neurology. 2019;19(1):1-10.

22. Zhang Y, Zhang P, Shen X, Tian S, Wu Y, Zhu Y, et al. Early Exercise Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemic Brain Injury via the Regulation of MMP-9 and Occludin in Rats. International Journal of Molecular Sciences. 2013;14(6):11096-112.

23. Lee J-M, Park J-M, Song MK, Oh YJ, Kim C-J, Kim Y-J. The ameliorative effects of exercise on cognitive impairment and white matter injury from blood-brain barrier disruption induced by chronic cerebral hypoperfusion in adolescent rats. Neuroscience letters. 2017;638:83-9.

24. 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.

25. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Musella A, Giudice TL, Mataluni G, et al. Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurobiology of disease. 2009;36(1):51-9.

26. 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.

27. Magalon K, Cantarella C, Monti G, Cayre M, Durbec P. Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models. European Journal of Neuroscience. 2007;25(3):761-71.

28. Segal JP, Bannerman CA, Silva JR, Haird CM, Baharnoori M, Gilron I, et al. Chronic mechanical hypersensitivity in experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by disease severity and neuroinflammation. Brain, Behavior, and Immunity. 2020;89:314-25.

29. 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.

30. Guo M, Cox B, Mahale S, Davis W, Carranza A, Hayes K, et al. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood–brain barrier dysfunction in stroke. Neuroscience. 2008;151(2):340-51.

31. Nishijima T, Kawakami M, Kita I. A bout of treadmill exercise increases matrix metalloproteinase-9 activity in the rat hippocampus. Neuroscience Letters. 2015;594:144-9.

32. Ries C, Petrides P. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. Biological Chemistry Hoppe-Seyler. 1995;376(6):345-55.

33. Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. Brain, behavior, and immunity. 2007;21(5):561-8.

34. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. Journal of cellular biochemistry. 1993;53(4):288-95.

35. Fernandes P, de Mendonça Oliveira L, Brüggemann TR, Sato MN, Olivo CR, Arantes-Costa FM. Physical exercise induces immunoregulation of TREG, M2, and pDCs in a lung allergic inflammation model. Frontiers in immunology. 2019;10:854.

36. Golzari Z, Shabkhiz F, Soudi S, Kordi MR, Hashemi SM. Combined exercise training reduces IFN-γ and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. International immunopharmacology. 2010;10(11):1415-9.

37. White LJ, Castellano V. Exercise and brain health--implications for multiple sclerosis: Part II--immune factors and stress hormones. Sports medicine. 2008;38(3):179-87.

38. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. Journal of neurology. 2004;251(3):261-8.

39. Valentin F, Bueb JL, Kieffer P, Tschirhart E, Atkinson J. Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells. Fundamental & clinical pharmacology. 2005;19(6):661-7.

40. Ojala JO, Sutinen EM. The role of interleukin-18, oxidative stress and metabolic syndrome in Alzheimer's disease. Journal of clinical medicine. 2017;6(5):55.

41. Zaychik Y, Fainstein N, Touloumi O, Goldberg Y, Hamdi L, Segal S, et al. High-intensity exercise training protects the brain against autoimmune neuroinflammation: regulation of microglial redox and pro-inflammatory functions. Frontiers in cellular neuroscience. 2021;15:640724.

42. Lee BD, Yoo J-M, Baek SY, Li FY, Sok D-E, Kim MR. 3,3′-Diindolylmethane Promotes BDNF and Antioxidant Enzyme Formation via TrkB/Akt Pathway Activation for Neuroprotection against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Hippocampal Neuronal Cells. Antioxidants. 2020;9(1):3.