

بررسی تأثیر پیشگیرانه یک دوره تمرین مقاومتی همراه با تزریق ویتامین D3 بر تغییرات سطح کلوتو بافت مغز رت‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی

سیده فاطمه فاطمی، ضیاء فلاح محمدی*، حمید حسینی، وحید طالبی

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس یا به اختصار ام‌اس، بیماری مزمن دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد که با تخریب میلین اعصاب باعث اختلال هدایت جریان‌های عصبی و الکتریکی می‌شود. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر پیش‌درمان شش هفته تمرین ورزشی مقاومتی همراه با تزریق مکمل ویتامین D3 بر سطح کلوتو بافت مغز رت‌های ماده نژاد لوئیز مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۴۵ سر موش ماده ۴ هفته‌ای نژاد لوئیز با میانگین وزنی $111/3 \pm 1/60$ گرم بود، که به نه گروه؛ کنترل سالم، کنترل بیمار، حلال، تمرین مقاومتی سالم، تمرین مقاومتی بیمار، ویتامین D3 سالم، ویتامین D3 بیمار، ترکیبی سالم و ترکیبی بیمار تقسیم شدند. برنامه تمرینی شامل بالا رفتن از نردبان با وزنه‌های متصل به دم بود. علاوه بر این، در گروه‌های مکمل و ترکیبی، به مدت دو هفته، مقدار ۲ نانوگرم ویتامین D3 در $0/2$ میلی‌گرم روغن کنجد، یک روز در میان و به صورت درون صفاقی به هر حیوان تزریق شد. به منظور القاء EAE، به هر حیوان میزان $0/4$ میلی‌لیتر از محلول نخاع خوکچه هندی و ادجوانت به نسبت برابر، تزریق شد. سطح klotho به روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد، میانگین سطح کلوتو در بافت مغز آزمودنی‌های گروه کنترل بیمار در مقایسه با آزمودنی‌های گروه کنترل سالم تفاوت معنی‌داری داشت ($p=0/001$). سطح کلوتو در گروه تمرین مقاومتی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیمار داشت ($p=0/001$). همچنین افزایش میزان کلوتو گروه ویتامین D3، تمرین مقاومتی و گروه ترکیبی بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار معنی‌دار بود (به ترتیب $p=0/001$ و $p=0/006$)، اما تغییرات بین گروه‌های تمرین، مکمل و ترکیب تمرین مکمل معنی‌دار نبود ($p=0/23$).

نتیجه‌گیری: نتیجه این پژوهش نشان داد که پیش‌درمان با استفاده از تمرین مقاومتی و مکمل ویتامین D3 به تنهایی و در ترکیب باهم، توانست از کاهش سطح کلوتو در برابر القای EAE جلوگیری کند، در نتیجه احتمالاً این پروتکل دارای اثر حفاظتی در برابر EAE می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین مقاومتی، ویتامین D3، کلوتو، EAE.

* نویسنده مسئول: ضیاء فلاح محمدی، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: ziafalm@yahoo.com

مقدمه

برپایه شواهد بالینی شایع‌ترین عوارض این بیماری خستگی، ضعف جسمانی، گرفتگی عضلانی، لرزش، عدم تعادل، دید نامتقارن یا دوبینی و اختلال در راه رفتن می‌باشند. از سوی دیگر کاهش قدرت عضلانی یکی از اصلی‌ترین اختلالاتی است که فعالیت‌های روزمره بیماران مبتلا به ام‌اس را محدود می‌کند (۳). در بیماران مبتلا به ام‌اس، ظرفیت اکسایشی عضلات، کاهش می‌یابد و ممکن است این ظرفیت با افزایش سطح خستگی توصیف شده در این بیماران ارتباط داشته باشد. بنابراین تمرین‌های منظم ممکن است با افزایش ظرفیت اکسایشی عضلات، در کاهش خستگی بیماران ام‌اس مؤثر باشد. فعالیت منظم ورزشی به عنوان یک عامل غیردارویی برای درمان بیماری‌های ایمنی از جمله MS مؤثر است و باعث تنظیم سیستم ایمنی و محافظت عصبی در سیستم عصبی مرکزی و کاهش تخریب سلول‌های عصبی از طریق کاهش استرس‌های اکسایشی می‌شود (۶ و ۵).

انجام تمرین‌های مقاومتی، باعث فراخوانی واحدهای حرکتی و افزایش تواتر تخلیه الکتریکی نورون‌های حرکتی می‌شود. به دنبال این تغییرات میزان خستگی کاهش یافته و انرژی انجام فعالیت در افراد افزایش می‌یابد (۷). تمرین‌های قدرتی علاوه بر این که بر عملکرد عضلات تأثیرگذار است، بر توانایی

کلوتو (Klotho) ژنی است که با ساخت پروتئین همنام، کارکردهای مختلفی را به عهده دارد. در مغز، این پروتئین در شبکه کورونید متمرکز بوده و به عنوان یک عامل همورال در مایع مغزی نخاعی وجود دارد (۱). کلوتو نقش مؤثری در محافظت دستگاه عصبی در برابر استرس اکسایشی و دمی‌لیناسیون ایفا می‌کند (۲) و موجب بازسازی سلول‌های عصبی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های اکسایشی می‌شود (۱). با توجه به نتایج مطالعه‌های اخیر در خصوص اهمیت کلوتو در میلین‌سازی، به نظر می‌رسد ارزیابی میزان کلوتو در طول بیماری دمی‌لیناسیون مولتیپل اسکلروزیس (MS) (۱) حایز اهمیت باشد. مولتیپل اسکلروزیس یا به اختصار ام‌اس، بیماری مزمن دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد که با تخریب میلین اعصاب باعث اختلال هدایت جریان‌های عصبی و الکتریکی می‌شود. به دنبال این رویداد بخشی از عضلات بدن کارایی و توانایی خود را از دست می‌دهند (۳). نتایج مطالعه‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار سطح کلوتو مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس نسبت به افراد سالم بود، بنابراین رابطه منفی بین میزان علایم بیماری و سطوح کلوتو مایع مغزی نخاع (CSF) (۲) تعجب‌آور نیست و این کاهش میزان کلوتو با تشدید علایم بیماران مبتلا به ام‌اس ارتباط مستقیم دارد (۴).

1-Multiple Sclerosis
2-Cerebrospinal fluid

گفته می‌شود هر عاملی که مانع از ارتشاح سلولی به مغز گردد یا منجر به کاهش میزان ارتشاح گردد می‌تواند از پیشرفت بیماری جلوگیری کند (۱۵). از طرفی، ویتامین D3 (فرم فعال ویتامین D) در روند متابولیسم استخوان، تنظیم تکثیر و تمایز سلولی و همچنین تنظیم پاسخ‌های ایمنی، نقش مهمی دارد (۱۶ و ۱۷). این ویتامین موجب کنترل و کاهش علائم بیماری در مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس می‌شود. نقش ویتامین D3 به عنوان سرکوب کننده سیستم ایمنی، طی مطالعه‌های حیوانی که در آنها تجویز ویتامین D₃ سبب جلوگیری یا مهار چشمگیر بیماری‌های خودایمن شده است، نیز نشان می‌دهد که ویتامین D₃ اثر بازدارنده‌ای را در آغاز و پیشرفت EAE دارد (۱۸). با نگاهی به پژوهش‌های قبلی و بررسی مطالعه‌های پژوهشگران، مشاهده می‌شود که تاکنون تحقیقی در رابطه با اثر پیش‌درمان تمرین مقاومتی به همراه تزریق مکمل ویتامین D₃ بر سطوح کلوتو بافت مغز، انجام نشده است. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر پیشگیرانه یک دوره تمرین مقاومتی و تزریق ویتامین D₃ بر سطح کلوتو بافت مغز موش‌های صحرایی در برابر تخریب ناشی از القاء آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که بر روی ۴۵ سر موش ماده ۴ هفته‌ای نژاد لوئیز با میانگین وزنی

سیستم عصبی نیز مؤثر است (۸) و باعث افزایش گردش فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^(۱) می‌شود و شاید یکی از مکانیسم‌هایی است که از این طریق باعث افزایش سلامت مغز می‌شود (۹).

برای مطالعه بیشتر تنظیم مولکولی در طول دوره بیماری، به طور عمده از مدل تجربی آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE)^(۲) که یک مدل بیماری التهابی دمی‌لینه شدن سیستم عصبی مرکزی است و اغلب به بررسی تخریب میلین در سیستم عصبی مرکزی می‌پردازد، استفاده می‌شود (۱۰). فعالیت ورزشی باعث معکوس کردن روند افزایش سایتوکین‌های التهابی از جمله اینترلوکین ۱۷، TNF-a در سیستم عصبی مرکزی ناشی از القای EAE می‌شود (۱۱). نتایج تحقیق سوزا و همکاران نشان داد که ۵ جلسه تمرین مقاومتی در هفته به مدت ۴ هفته، باعث جلوگیری از گسترش EAE از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش میزان التهاب و تأخیر در بروز علائم بالینی در مقایسه با گروه کنترل EAE می‌شود (۱۲). بنسون و همکاران گزارش کردند که یک ساعت تمرین اختیاری در روز باعث کاهش نشانگرهای التهابی و علائم بالینی در موش‌های مبتلا به EAE می‌شود (۱۳). همچنین حسینی و همکاران بیان کردند که ۶ هفته تمرین مقاومتی پیش از القای مدل تجربی MS می‌تواند منجر به افزایش شاخص‌های پیش التهابی و افزایش شاخص‌های ضدالتهابی می‌شود (۱۴).

1-Brain-derived neurotrophic factor
2-Encephalomyelitis Experimental Autoimmune

۱۱۱/۳±۱/۶۰ گرم بود. حیوانات پس از انتقال به محیط جدید، جهت سازگاری با این محیط، به مدت ۲ هفته با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و در شرایط ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. آزمودنی‌ها پس از آشنایی با محیط جدید وزن‌کشی شدند و سعی بر آن شد تا میانگین وزن بین گروه‌های مختلف تا حد ممکن به هم نزدیک باشد. سپس آزمودنی‌ها به طور تصادفی به ۹ گروه ۵ تایی تقسیم شدند؛ گروه کنترل سالم که هیچ تیماری را دریافت نکردند و برای تعیین مقادیر پایه در نظر گرفته شدند، گروه کنترل بیمار: گروهی که EAE به آن القاء شد (مخلوطی از ادجوانت و نخاع خوکچه هندی)، گروه حلال: که در طول فرآیند آزمایش فقط روغن کنجد دریافت کردند، گروه تمرین سالم: گروهی که تمرین مقاومتی انجام دادند، گروه تمرین بیمار: گروهی که ابتدا تمرین مقاومتی انجام دادند و سپس EAE به آن القاء شد، گروه مکمل سالم: گروهی که فقط محلول ویتامین D3 دریافت کردند، گروه مکمل بیمار: گروهی که ابتدا محلول ویتامین D دریافت کردند و سپس EAE به آن‌ها القاء شد، گروه ترکیبی سالم: گروهی که تمرین مقاومتی انجام دادند و ویتامین D3 دریافت کردند و گروه ترکیبی بیمار: گروهی که ابتدا تمرین مقاومتی انجام دادند و ویتامین D دریافت کردند، سپس EAE به آن‌ها القاء شد. در طی دوره پژوهش نیز حیوانات از غذای به صورت آزاد مصرف کردند. در ضمن آب مورد نیاز حیوانات آزادانه و از طریق بطری‌های ویژه

در دسترس قرار داده شد. در ضمن تمامی اصول راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات در این پژوهش رعایت شد.

تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان ۱ متری که با اضافه کردن وزنه به دم حیوانات انجام می‌گرفت. تمرین‌ها ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته بود. نردبان مورد استفاده ۲۶ پله داشت و در زاویه ۸۰ درجه قرار داده می‌شد. پیش از شروع برنامه اصلی تمرین، بالا رفتن از نردبان به حیوانات آموزش داده شد. به منظور تحریک حیوان، برای اجرای تمرین، تنها از لمس کردن و مالیدن دم استفاده شد. همچنین برای همسان‌سازی استرس ناشی از مواجهه با آزمون‌گر، حیوانات گروه کنترل به وسیله آزمون‌گر جابه‌جا و لمس می‌شدند. برنامه تمرینی در جدول ۱ آمده است.

شروع برنامه تمرینی با بار معادل ۵۰ درصد وزن بدن حیوانات بود. حیوانات در دو جلسه اول ۸ تا ۱۰ تکرار (بالا رفتن از نردبان) را با فواصل استراحت ۲ دقیقه‌ای انجام دادند. در جلسه سوم تمرین، از تکرار دوم به بعد در هر تکرار ۳۰ گرم وزنه به بار متصل به دم حیوان اضافه شد. از جلسه چهارم تا پایان برنامه تمرینی، تکرار اول با باری معادل ۵۰ درصد بیشترین وزنه حمل شده در جلسه قبل (ظرفیت حمل بیشینه) انجام می‌گرفت و در تکرارهای بعدی به ترتیب مقدار وزنه‌ها به ۷۵ و ۹۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت حمل بیشینه می‌رسید. پس از آن هر یک از تکرارهای پنجم تا هشتم ۳۰ گرم به وزنه قبلی اضافه می‌شد. بار پایانی

درجه سانتی‌گراد در دستگاه شیکر قرار داده شد تا به طور کامل هموژن شود. در نهایت نخاع هموژن شده و Complete Freund's adjuvant خریداری شده از شرکت سیگما (Sigma F5881, CFA) را با نسبت ۱ به ۱ مخلوط کرده و بعد از بیهوش کردن حیوان‌ها به وسیله کتامین زایلازین با نسبت ۵ به ۳، به هر حیوان مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول حاصل، در پایه دم حیوان، تزریق شد (۲۱) مدل EAE در ابتدای هفته هفتم القاء شد. مقیاس ارزیابی شدت بیماری شامل: ۰- عدم بروز بیماری، ۱- فلج شدن دم، ۲- اختلال در راه رفتن، ۳- فلج پاهای عقبی، ۴- فلجی چهار دست و پا و ۵- مرگ بود (۲۲). با توجه به طبقه‌بندی فوق، چنانچه به هر یک از حیوان‌ها امتیاز ناتوانی ۱ تا ۵ نسبت داده می‌شد، نشان‌دهنده ابتلای حیوان به EAE بود. هم‌چنین جهت یکسان‌سازی شرایط همه آزمودنی‌ها و با در نظر گرفتن اثرات استرسی احتمالی ناشی از تزریق در گروه‌های دریافت‌کننده دارو، به موش‌های گروه‌های کنترل، سالین (سدیم کلراید ۰/۹ درصد) به صورت زیر صفاقی تزریق شد.

تمام گروه‌ها دو هفته بعد از القاء EAE (در روز چهاردهم) در پی ظهور علائم بیماری، در شرایط استراحتی با کتامین و زایلازین با نسبت ۲ به ۵ بی‌هوش، سپس بافت مغز حیوان جدا و پس از شست و شو بلافاصله در مایع نیتروژن قرار داده شد و سپس تا زمان هموژنیزه شدن در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نخیره‌سازی شد. جهت سنجش غلظت klotho بافت مغز، ابتدا بافت مغز با استفاده از مایع

به عنوان ظرفیت حمل بیشینه آن جلسه در نظر گرفته می‌شد. چنانچه با افزایش وزنه‌های ۳۰ گرمی حیوان قادر به بالا رفتن از نردبان نبود، تکرارها با بار قبلی تا ۸ تکرار ادامه می‌یافت (۱۹).

ویتامین D₃ از شرکت دارویی کایمن (آلمان) تهیه شد. مقدار ۲ نانوگرم ویتامین D₃ در ۰/۲ میلی‌لیتر روغن کنجد حل شده و در هفته یک روز در میان با سرنگ انسولینی به صورت درون صفاقی، در پایه دم به هر حیوان تزریق شد. به منظور جلوگیری از عفونت، محل تزریق قبل و بعد از تزریق به وسیله پنبه‌ای آغشته به الکل ضد عفونی شد. انتخاب دوز تزریقی ویتامین در این مطالعه براساس مطالعه‌های مشابهی بود که از این ویتامین جهت پیشگیری و حفاظت عصبی در برابر آثار سم عصبی القاء‌کننده بیماری MS در مدل‌های حیوانی استفاده شده است. تزریق ویتامین D₃ در ۲ هفته پایانی و از هفته چهارم تمرین، هم‌زمان با انجام تمرین مقاومتی صورت گرفت (۲۰).

به منظور القاء EAE در حیوان‌ها از مخلوطی از نخاع خوکچه و Complete Freund's adjuvant استفاده شد که ۲۴ ساعت پس از آخرین مرحله تمرین و تزریق ویتامین D₃ صورت گرفت. ۵ خوکچه به وسیله کلروفورم بیهوش و نخاع آن‌ها برای انجام مراحل بعدی آزمایش خارج شد. پس از خارج کردن نخاع و منتقل کردن آن به داخل میکروتیوب، سریعاً فریز شد. سپس بافت در هاون کوبیده و به منظور هموژن کردن، به نسبت برابر با سالین مخلوط و در دمای ۴

نیتروژن پودر شده و سپس مقادیر مورد نیاز طبق روش اندازه‌گیری کیت Klotho ساخت کمپانی Zellbio chemical (company, German) اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کالموگروف اسمیرنوف، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

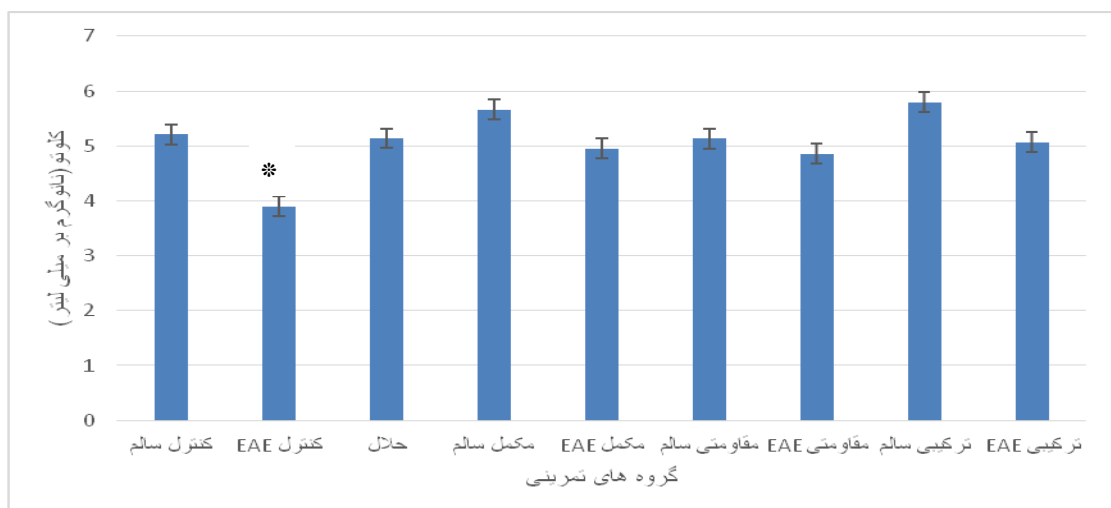
یافته‌ها

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که مقدار پروتئین کلوتو در مغز

آزمودنی‌های کنترل بیمار در مقایسه با آزمودنی‌های کنترل سالم کاهش یافت ($p=0/001$). تغییرات سطح کلوتو در گروه‌های مکمل سالم، تمرین سالم و ترکیب سالم نسبت به گروه کنترل سالم معنی‌دار نبود ($p=0/33$)، اما تغییرات کلوتو در گروه‌های تمرینی، مکمل و ترکیبی سالم نسبت به گروه کنترل بیمار معنی‌دار بود ($p=0/001$). سطح این پروتئین در گروه مکمل بیمار، تمرین بیمار و گروه ترکیب بیمار نسبت به گروه کنترل بیمار ($p=0/001$) افزایش معنی‌داری داشت، اما تغییرات بین گروه‌های تمرین، مکمل و ترکیبی بیمار معنی‌دار نبود ($p=0/68$) (نمودار ۱).

جدول ۱: برنامه تمرینی گروه‌های تمرینی و ترکیبی

شاخص	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
تکرار	۱۰-۸	۱۰-۸	۱۰-۸	۱۰-۸	۱۰-۸	۱۰-۸
شدت تمرین	با ۵۰ درصد وزن بدن شروع و از تکرار ۵ تا ۸ تا ۳۰ گرم به وزنه اضافه شد.					



نمودار ۱: میانگین سطح کلوتو گروه‌های مختلف تحقیق

* تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌های پژوهش

بحث

EAE مدل حیوانی بیماری ام اس، الگویی برای تعامل زیان آور بین سلول‌های سیستم ایمنی و سیستم عصبی است (۱۸). در این راستا بررسی تأثیر پیشگیرانه تمرین مقاومتی به همراه مصرف ویتامین D3 می‌تواند گزینه مناسب و کم هزینه‌ای در ارتقای افزایش سطح سلامت جامعه باشد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی ۶ هفته تمرین مقاومتی به همراه ۲ هفته مصرف ویتامین D₃ بر سطح کلوتو مغز موش‌های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی انجام گردید.

همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است، القاء EAE باعث کاهش سطح کلوتو در گروه کنترل شد. تزریق درون صفاقی ویتامین D₃ و تمرین مقاومتی هر یک به تنهایی و در ترکیب با هم از کاهش سطح کلوتو در موش‌های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی جلوگیری کرد. بر اساس جست و جوی محققین تا کنون پژوهشی در رابطه با تأثیر ورزش و مکمل ویتامین D₃ و همچنین اثر تعاملی این دو مداخله بر سطح klotho در بیماران مبتلا به ام اس انجام نشده است. سایر مطالعه‌ها هم که به تأثیر بررسی بر سطح klotho پرداخته‌اند بسیار محدود است. به طور مثال احمدی و همکاران بیان کردند که بین تغییرات کلوتو و پاتوفیزیولوژی ام اس ارتباط وجود دارد (۲۳)، چرا که نقش مهمی در میلین‌سازی، تنظیم سیستم ردوکتاز و ترشح سیتوکین‌های التهابی دارد، همچنین از طریق فعالیت‌های مختلفی باعث افزایش بیان FOXO می‌شود که نقش ضد استرس

اکسایشی دارد (۲۴). هم‌سو با نتایج حاضر، ماتسوبارا و همکاران، نشان دادند که ۱۲ هفته پیاده‌روی با شدت متوسط باعث افزایش سطح کلوتو در بیماران قلبی عروقی می‌شود که از این طریق باعث سرکوب التهاب و کاهش استرس اکسایشی و مهار سیگنال ونت (سیگنالی که باعث افزایش التهاب و افزایش آپوپتوز در بافت‌ها می‌شود) می‌گردد (۲۵). ساگیو و همکاران نیز با بررسی ۱۲ هفته تمرین هوازی بر روی ترمیل به مدت ۵ روز در هفته بیان کردند که این فعالیت ورزشی از طریق تأثیر بر سطح کلوتو، باعث کاهش عوامل ایجاد کننده اختلال در عملکرد، مانند آپوپتوز سلولی و افزایش تولید نیتریک اکساید می‌شود (۲۶). انواع مختلف فعالیت ورزشی ممکن است ترمیم اعصاب محیطی را با افزایش بیان فاکتور نروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^(۱)، نوروتروفین^(۲)، (NT-3)^(۳) و گیرنده ترپومیوزین کیناز (Trk-B)^(۴) در نخاع تحت تأثیر قرار دهد و انتشار مستمر BDNF باعث افزایش رشد فیبر عصبی و میلین‌سازی مجدد بعد از آسیب عصب سیاتیک در موش‌ها می‌شود. الگوی تنظیم این عوامل رشد با توجه به نوع تمرین متفاوت است (۲۷). تمرین ورزشی دارای اثرات سودمندی بر MS از طریق تنظیم سیستم ایمنی و فاکتورهای نوروتروفیک مثل فاکتور رشد عصبی (NGF)^(۵) و فاکتور رشد شبه انسولینی است که باعث کاهش

1-Brain-derived Neurotrophic Factor
2-Neurotrophin-3
3-Tropomyosin Receptor Kinase B
4-Nerve Growth Factor
5-Nerve Growth Factor

تخریب سلول‌های عصبی و گسترش محافظت نورونی می‌شود (۲۸ و ۲۹). تمرین مقاومتی در جلسه‌های پایپی، نقش ضدالتهابی از طریق تنظیم افزایشی برخی سایتوکین‌ها در بلند مدت دارد و باعث کاهش عامل نکروز توموری آلفا (TNF-a)^(۱) و افزایش سنتز پروتئین در عضله می‌شود چرا که سطح بالای TNF-a با کاهش سنتز پروتئین در ارتباط است (۳۰). نتایج حاصل از تحقیق دی سالس و همکاران نشان داد که تمرین مقاومتی پیشرونده باعث کاهش غلظت سایتوکین‌های التهابی در افراد مبتلا به ام‌اس می‌شود (۳۱). تمرین مقاومتی منجر به کاهش شاخص‌های استرس اکسایشی از جمله مالون‌دی‌آلدهید و هیدروژن پراکسید در بیماران پارکینسونی شده و فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسید را افزایش می‌دهد. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا حدودی مسئول کاهش MAD و H2O2 است، بدین صورت که GPX به طور مستقیم با استفاده از گلوکاتایون به عنوان دهنده الکترون، کاهش H2O2 را کاتالیز می‌کند (۳۲)، از سوی دیگر (SOD) باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید می‌شود که در حفظ سلامت مغز بسیار حایز اهمیت است (۳۳). گونه‌های فعال اکسیژن در ایجاد و بدخیمی بیماری‌هایی نظیر؛ سرطان، دیابت، نقرس و بیماری‌هایی نظیر؛ پارکینسون و ام‌اس مؤثرند. با توجه به این که نیتریک اکساید به عنوان یک رادیکال آزاد در پاتوژنز خیلی از بیماری‌ها از جمله مولتیپل اسکلروزیس دخالت دارد، این فرضیه مطرح می‌شود که ویتامین D₃ از طریق مهار تولید

نیتریک اکساید سبب مهار بیماری می‌گردد (۳۴). نتایج تحقیق شاردل و همکاران نشان داد، که ویتامین دی و کلوتو از طریق مکانیزم‌های مختلف، از جمله مهار سیگنال انسولین بر فاکتور رشد شبه انسولینی نقش مهمی در سلامت داشته و نیز باعث حفظ عملکرد اندوتلیال و محافظت در برابر بیماری قلبی - عروقی و تنظیم کانال‌های یونی و افزایش باز جذب کلسیم و دفع پتاسیم می‌شود. علاوه بر این نقش آنتی‌اکسیدانی از طریق تنظیم افزایشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد (۳۵). اگرچه ویتامین D₃ تنظیم کننده سیستم ایمنی است، اما پاسخ‌های ایمنی از جمله پاسخ‌های ایمنی به بسیاری از بیماری‌های عفونی در موجودات سرکوب نمی‌شود (۳۶). نتایج مطالعه فورستر و همکاران نشان داد که درمان با 1,25D₃ باعث تحریک بیان mRNA کلوتو می‌شود و این نشان دهنده این است که 1,25D₃ قادر به افزایش جریان کلوتو است (۳۷). نتایج تحقیق‌های اسپاچ و همکاران بر روی اثر محافظتی ویتامین D بر آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی نشان داد، با توجه به این که این بیماری با ارتشاح سلولی به داخل بافت همراه است، ویتامین D₃ با القاء آپوپتوز سلول‌های ارتشاح یافته به بافت مغزی، در تعدیل پاسخ‌های ایمنی نقش دارد و از این طریق باعث تأخیر در شروع بیماری و کاهش شدت بیماری می‌شود (۳۸). ویتامین D₃ از طریق القاء آپوپتوز در سلول‌های التهابی از پیشرفت بیماری EAE

1-Tumor Necrosis Factor Alpha

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسایشی دارد (۴۲ و ۴۱). به دلیل عدم دسترسی به اطلاعات لازم، هنوز سازوکارهایی که تمرین مقاومتی و ویتامین D از طریق آن موجب افزایش سطح کلوتو در مغز می‌شود مشخص نیست. به طور خلاصه و با توجه به این که تحقیق کنونی اولین پژوهشی است که تأثیر تمرین مقاومتی و مصرف ویتامین D₃ بر سطح کلوتو را در مدل تجربی بیماری ام‌اس قرار داده است، لذا نتایج نشان دهنده این مطلب می‌باشد که تمرین و مکمل و ترکیب تمرین و مکمل از کاهش سطح کلوتو جلوگیری کرده در نتیجه می‌تواند یک راهکار محافظتی در برابر اثرات سم عصبی تولیدکننده مدل تجربی بیماری ام‌اس محسوب شود، از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به فعالیت رت‌های مطالعه حاضر در قفس در طول شبانه روزی اشاره کرد که می‌توان با نصب دوربین به سطح فعالیت آنها پی برد. برای نتیجه‌گیری قاطع در این رابطه، انجام مطالعه‌های بیشتر با استفاده از پروتکل‌های با شدت و مدت‌های مختلف در مرحله پیش از تزریق با هدف حفاظتی و در مرحله پس از آن با هدف درمانی، ضرورت دارد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه بابلسر می‌باشد، که با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه مازندران انجام شد. لذا از تمامی افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری رسانده‌اند قدر دانی می‌کنیم.

جلوگیری کرده و به عنوان تنظیم کننده عوامل نسخه‌برداری عمل می‌کند و با مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی (اینترلوکین ۶ و اینترفرون گاما) باعث کاهش شدت بیماری می‌گردد (۳۹). نتایج مطالعه وانگ و همکاران مبین این مطلب است که 1,25(OH)2D₃ با تنظیم مثبت ژن سلول‌های خاصی که نقش نگهداری و حفظ سلول‌های CNS را دارند، باعث درمان EAE می‌شود و با تأثیر مستقیم بر سلول‌های T و کاهش میزان التهاب باعث جلوگیری از آسیب‌های عصبی و جلوگیری از پیشرفت EAE می‌شود (۴۰). از طرفی داده‌های حاصل از بررسی تأثیر هم‌زمان تمرین مقاومتی و مصرف مکمل ویتامین D بر سطح کلوتو در رت‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار این متغیر نسبت به گروه کنترل بود. به عبارت دیگر استفاده از این دو تیمار می‌تواند موجب هم‌افزایی آثار آنها روی سطح کلوتوی مغز شده و در نتیجه در برابر تأثیرهای اکسایشی ناشی از القای EAE روی مغز حفاظت عصبی ایجاد می‌کند. احتمالاً تمرین مقاومتی به نسبت شدید، به عنوان عامل مؤثر در پیشگیری از ابتلای افراد به این بیماری عمل می‌کند. تمرین‌های مقاومتی اگر از شدت و مدت کافی برخوردار باشد می‌تواند در پیشگیری از ابتلا به MS مؤثر باشد (۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ها نشان از تأثیر مشترک این دو تیمار یعنی تمرین مقاومتی و ویتامین D بر افزایش

REFERENCES:

- 1.Chen CD, Li H, Liang J, Hixson K, Zeldich E, Abraham CR. The anti-aging and tumor suppressor protein klotho enhances differentiation of a human oligodendrocytic hybrid cell line. *Journal of Molecular Neuroscience* 2015; 55(1): 76-90.
- 2.Chen CD, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, et al. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *Journal of Neuroscience* 2013; 33(5): 1927-39.
- 3.Soltani M, Hejazi SM, Noorian A, Zendedel A, Ashkanifar F. The effect of aerobic training on the improvement of expanded disability status scale(EDSS) in multiple sclerosis patients. *Journal of Medical Science of Islamic Azad University of Mashhad* Spring 2009; 5(17):15-20.
- 4.Semba RD, Moghekar AR, Hu J, Sun K, Turner R, Ferrucci L, et al. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 2014; 37: 540-58.
- 5.Tuon T, Valvassori S, Dal Pont G, Paganini C, Pozzi B, Luciano T, et al. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin* 2014; 106: 108-12.
- 6.Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2004; 286(3): R505-11.
- 7.Karpatkin HI. Multiple sclerosis and exercise: a review of the evidence. *International Journal of MS Care* 2005; 7(2): 36-41.
- 8.Illha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 2008; 22(4): 355-66.
- 9.Yarrow JF, White LJ, McCoy SC, Borst SE. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Neuroscience Letters* 2010; 479(2): 161-5.
- 10.Einstein O, Fainstein N, Touloumi O, Lagoudaki R, Hanya E, Grigoriadis N, Katz A, Ben-Hur T. Exercise training attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunomodulation rather than direct neuroprotection. *Experimental neurology* 2018; 299(1): 56-64.
- 11.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.
- 12.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.
- 13.Benson C, Paylor JW, Tenorio G, Winship I, Baker G, Kerr BJ. Voluntary wheel running delays disease onset and reduces pain hypersensitivity in early experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Experimental Neurology* 2015; 271: 279-90.
- 14.Hosseini SM, Fallah MZ, Feizi F. The effect of high-intensity resistance exercise period on the levels of interleukin-10 (il-10), tumor necrosis factor-alpha (tnf- α), and brain-derived neurotrophic factor (bdnf) in the brain of lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Esfahan Medical School (IUMS)* 2017; 35(422): 270-7.
- 15.Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology* 2009; 66(6): 739-53.
- 16.Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993; 82(4): 1300-7.
- 17.Cantorna MT. Vitamin D, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012; 523(1): 103-6.
- 18.Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2010; 68(2): 193-203.
- 19.Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *J Exercise Physiol Online* 2003; 6(2): 80-7.
- 20.Sherlin DG, Verma R. Vitamin D ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. *Neurotoxicology and teratology* 2001; 23(2): 197-201.
- 21.Pazhoohan S, Satarian L, Asghari AA, Salimi M, Kiani S, Mani AR, et al. Valproic Acid attenuates disease symptoms and increases endogenous myelin repair by recruiting neural stem

- cells and oligodendrocyte progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurodegenerative Diseases* 2013; 13(1): 45-52.
22. Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG 35–55 peptide in C57BL6/J strain of mice. *Journal of Autoimmunity* 2003; 20(1): 51-61.
23. Ahmadi M, Aleagha MSE, Harirchian MH, Yarani R, Tavakoli F, Siroos B. Multiple sclerosis influences on the augmentation of serum Klotho concentration. *Journal of the Neurological Sciences* 2016; 362: 69-72.
24. Acar A, Cevik MU, Evliyaoglu O, Uzar E, Tamam Y, Arıkanoglu A, et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Belgica* 2012; 112(3): 275-80.
25. Matsubara T, Miyaki A, Akazawa N, Choi Y, Ra SG, Tanahashi K, et al. Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2014; 306(3): H348-55.
26. Saghiv M, Sherve C, Ben-Sira D, Sagiv M, Goldhammer E. Aerobic training effect on blood s-klotho levels in coronary artery disease patients. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology* 2016; 7:1-4.
27. He XH, Zang Y, Chen X, Pang RP, Xu JT, Zhou X, et al. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1. 3 and Nav1. 8 in DRG neurons following motor fiber injury. *PAIN* 2010; 151(2): 266-79.
28. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences* 2002; 25(6): 295-301.
29. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences* 2007; 30(9): 464-72.
30. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury. *Sports Medicine* 2008; 38(11): 947-69.
31. De Salles B, Simao R, Fleck S, Dias I, Kraemer-Aguiar L, Bouskela E. Effects of resistance training on cytokines. *International Journal of Sports Medicine* 2010; 31(07): 441-50.
32. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian Journal of Applied Physiology* 2004; 29(3): 245-63.
33. Nonato L, Rocha-Vieira E, Tossige-Gomes R, Soares A, Soares B, Freitas D, et al. Swimming training attenuates oxidative damage and increases enzymatic but not non-enzymatic antioxidant defenses in the rat brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2016; 49(10): 1-5.
34. Shirazi HA, Rasouli J, Ciric B, Wei D, Rostami A, Zhang GX. Dihydroxyvitamin D 3 suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis through both immunomodulation and oligodendrocyte maturation. *Experimental and Molecular Pathology* 2017; 102(3): 515-21.
35. Shardell M, Semba RD, Kalyani RR, Hicks GE, Bandinelli S, Ferrucci L. Serum 25-hydroxyvitamin D, plasma klotho, and lower-extremity physical performance among older adults: findings from the InCHIANTI study. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2015; 70(9): 1156-62.
36. Cantorna MT. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutrition Reviews* 2008; 66(2): S135-8.
36. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 414(3): 557-62.
38. Spach KM, Hayes CE. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *The Journal of Immunology* 2005; 175(6): 4119-26.
39. Gill D, Tan PH. Induction of pathogenic cytotoxic T lymphocyte tolerance by dendritic cells: a novel therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2010; 14(8): 797-824.
40. Wang Y, Marling SJ, Zhu JG, Severson KS, DeLuca HF. Development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice requires vitamin D and the vitamin D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109(22): 8501-4.
41. Bloomer RJ, Schilling BK, Karlage RE, Ledoux MS, Pfeiffer RF, Callegari J. Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2008; 40(8): 1385-9.
42. Wrzosek M, Łukaszkiwicz J, Wrzosek M, Jakubczyk A, Matsumoto H, Piątkiewicz P, et al. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacological Reports* 2013; 65(2): 271-8.

The Preventive effect of one Course of Resistance Training with Injections of Vitamin D₃ on the Levels of Klotho in the Brain Tissue of Female Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Fatemi SF, Mohammadi ZF^{*}, Hoseini H, Talebi V

¹Department of Sport Physiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: 4 Feb 2018 Accepted: 5 Sep 2018

Abstract

Background & Aim: This study aimed to determine the pretreatment effect of 6-week resistance exercise with injections of vitamin D₃ supplementation on the levels of klotho in female Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.

Methods: The present experimental study was conducted on 45 female Lewis rats with an average weight of 111.3 ± 1.60 grams which were randomly divided into 9 groups (n=5 per group), including, healthy control, EAE control, sham, Resistance training, EAE resistance training, vitamin D₃, EAE vitamin D₃, combination, EAE combination. The resistance-training program included climbing a ladder with tail-loaded weights. In addition, vitamin D₃ groups received vitamin D₃ supplementation (2ng/0.2mg sesame oil/every two days) intraperitoneal for 2 weeks. To induce EAE model, to each animal in 4.0 ml of solution guinea pig spinal cord and equally adjuvant and, was injected klotho levels were measured by ELISA. For data analysis, both one-way ANOVA and Tukey test were used with a significance level of p≤0/05.

Results: The results of this study indicated that the mean serum levels of klotho in the brain tissue of control group were significantly different from control group (p=0/001). Klotho levels in the resistance training group were significantly higher than the control group (p=0/001). In addition, there was a significant increase in klotho in supplementation and combination patient group compared to the control group (Respectively P=0/001; P=0/006). Furthermore, the difference between the training, supplementation and combination groups was not significant (p≥0/05).

Conclusion: The result of the present study revealed that pretreatment with the resistance training and injection of vitamin D₃, alone and in combined together was able to prevent the reduction of klotho's levels against EAE induction. As a result, this protocol is likely to have a protective effect against MS.

Key Words: resistance-training, vitamin D₃, klotho, experimental autoimmune encephalomyelitis.

Corresponding author: Zia Fallah Mohammadi, University of Mazandaran, Faculty of Sport Sciences, Babolsar, Iran
Email: ziafalm@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Fatemi SF, Mohammadi ZF^{*}, Hoseini H, Talebi V. The Preventive effect of one Course of Resistance Training with Injections of Vitamin D₃ on the Levels of Klotho in the Brain Tissue of Female Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Armaghane-danesh 2018; 23(4): 401-412