

The Effect of Aerobic Swimming on Synaptic Protein Expression and Improvement of Cognitive Function in Multiple Sclerosis Mice Model

Soheila Banasadegh¹ , Shahnaz Shahrbanian² , Reza Gharakhanlou³ , Mohammad Reza Kordi⁴ 

1. Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: banasadegh@modares.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: sh.shahrbanian@modares.ac.ir
3. Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: ghara_re@modares.ac.ir
4. Department of Sports Physiology, Faculty of Health and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: mrkordi@ut.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
<p>Article type: Research</p> <p>Article history: Received: 10 July 2024 Received in revised form: 21 July 2024 Accepted: 22 August 2024 Published online: 2 December 2025</p> <p>Keywords: <i>EAE Induction, Synaptic Destruction, SNAP25, Mild Cognitive Impairment, Aerobic Exercise.</i></p>	<p>Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease of the CNS that impairs cognitive function during its progression. A notable alteration in the CNS of these patients is synaptic dysfunction, which precedes axonal and neural pathway demyelination. Previous research shows that physical activity is promising potential in the prevention and management of these conditions. This study aimed to examine the effects of swimming exercise on the levels of the presynaptic membrane protein SNAP25 in the brain tissue of female mice experiencing cognitive and inflammatory disorders, using the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model.</p> <p>Methods: A total of 21 C57BL/6 mice were divided into 3 groups with equal numbers: control, EAE without exercise, and EAE with aerobic swimming exercise. Clinical scores were recorded daily, and SNAP25 protein levels were measured by Western blot method after the 4-week exercise period.</p> <p>Results: The induction of EAE increased SNAP25 levels compared to the healthy control group, but swimming exercise reduced these levels by 27% (P-value=0.0003, F=42.92, EF=0.85). Additionally, clinical scores improved in the exercised mice with the disease.</p> <p>Conclusion: Aerobic swimming for four weeks by regulating the expression of SNAP25 in the brain tissue and modulating the release of neural mediators and nutritional factors in the synaptic area improves the symptoms of mild cognitive impairment and clinical symptoms in mice model of MS.</p>

Cite this article: Banasadegh Soheila, Shahrbanian.Shahnaz, Gharakhanlou Reza & Kordi Mohammad Reza. The Effect of Aerobic Swimming on Synaptic Protein Expression and Improvement of Cognitive Function in Multiple Sclerosis Mice Model. *Journal of Sport Biosciences*. 2024;17(3). 5-17.

DOI: <http://doi.org/10.22059/JSB.2024.379202.1638>.



Journal of Sport Biosciences by University of Tehran Press is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
| Web site: <https://jsb.ut.ac.ir/> | Email: jsb@ut.ac.ir.

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease that attacks the central nervous system, leading to synapse and myelin sheath destruction, especially in axons. Around three million people globally suffer from MS, with 45-70% experiencing cognitive impairments. Women are three times more likely to have MS, but men often show more severe cognitive and verbal memory issues. Cognitive decline in MS is linked to reduced visual-spatial learning, delayed recall, attention, and information processing speed, costing the U.S. healthcare system about \$82 billion annually. Studies indicate an increasing MS prevalence in central and northern Iran. Although the causes of MS are not fully understood, synaptic dysfunction before demyelination leads to cognitive impairment. Identifying biomarkers of synaptic destruction can help in prevention, early diagnosis, and treatment. One important synaptic destruction marker is the synaptic protein SNAP25, part of the SNARE complex, essential for neurotransmitter and neurotrophin release. SNAP25's role affects mental confusion, attention deficits, and speech disorders. Longitudinal studies on Alzheimer's disease show SNAP25 levels vary from a relative increase in mild cognitive impairment (MCI) to a decrease in advanced dementia stages. Physical activity, especially aerobic exercise, has beneficial effects, such as neural protection and enhanced synaptic learning. Swimming increases neurotrophin secretion with minimal adverse effects. In the EAE animal model, swimming impacts motor coordination, stress, and pressure less than treadmill exercise. Borras's 2021 study showed that swimming reduces SNAP25 levels, while running does not. Aerobic exercise increased SNAP25 in the hippocampus of diabetic mice, improving cognitive performance. Conflicting findings on exercise's effect on synaptic protein regulation warrant further examination of aerobic swimming exercise in the MS animal model. This study aims to investigate the four-week effects of swimming exercise on cognitive performance in MS patients, focusing on SNAP25 protein levels and clinical scores in female EAE model mice.

Methods

Twenty-one female C57BL/6 mice, aged 6-8 weeks, were divided into three groups: healthy control (7 mice), EAE (7 mice), and EAE with swimming exercise (EAE+SE, 7 mice). Mice were kept under a 12:12 light/dark cycle in standard conditions. EAE induction involved subcutaneous injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) and complete Freund's adjuvant (CFA), along with pertussis

toxin (PT). The control group received only saline. In order to measure myelin destruction of brain tissue, Luxal Fast Blue (LFB) staining was used. The EAE+SE group underwent a 4-week swimming program, swimming for 30 minutes every two days. The control group remained in a dry cage. The exercise continued until clinical symptoms appeared. Daily body weight and clinical signs were assessed using a clinical scoring system. Protein detection in brain tissue was performed using the Lowry method and SDS-PAGE electrophoresis. Immunoblotting involved transferring proteins to a PVDF membrane, incubating with antibodies, and visualizing bands. Protein concentration was measured, and SNAP25 levels were analyzed using Western blot. Data were analyzed using SPSS software. Descriptive and inferential statistics, including One-Way ANOVA and post-hoc Fisher's LSD test, were used to determine differences. Clinical scores and body weights changes were analyzed with the Kruskal-Wallis test. A significance level of 0.05 was considered.

Results

Weight changes among the groups showed no significant differences. Clinical changes were more pronounced in the EAE group than the EAE+EX group. SNAP25 levels varied significantly among the groups, with the control group showing lower levels compared to the EAE and EAE+ EX groups. SNAP25 levels in the swimming exercise group were higher than in the EAE group.

Conclusion

Aerobic swimming did not significantly affect mice's weight. Clinical scores indicated better motor health in the exercise group. SNAP25 levels increased after EAE induction but were reduced by 30% after four weeks of swimming exercise. SNAP25, crucial for neurotransmission, is also linked to immune cells in MS. The study found that aerobic swimming reduced SNAP25 levels, contrasting with some research but aligning with others. The regulatory roles of these proteins and exercise's effect on oxidative stress may explain these findings. Aerobic exercise showed benefits in reducing cognitive and motor dysfunction, supporting the importance of exercise in managing MS. Further research on specific brain regions and other synaptic proteins is suggested. Four weeks of aerobic swimming significantly regulated SNAP25 levels and improved clinical scores in MS models, suggesting exercise's potential in mitigating cognitive disorders by regulating inflammatory responses and synaptic proteins.



Journal of Sport Biosciences

Online ISSN: 2676-4148

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines: (IR.SSRC.REC.1401.152)

Funding: In this research, ethical principles were followed for all participants and the practice and test process.

Authors' contribution: The authors declared no conflict of interest.

Conflict of interest: --

Acknowledgments: The authors thank all the participants who helped and supported us in this research.



تأثیر شنای هوازی بر بیان پروتئین سیناپسی و بهبود عملکرد شناختی در موش‌های مدل مالتیپل اسکلروزیس

سهیلا بناصادق^۱ ، شهناز شهربانیان^۲ ، رضا قراخانلو^۳ ، محمدرضا کردی^۴ 

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، رایانامه: banasadegh@modares.ac.ir

۲. دانشیار گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، رایانامه: sh.shahrbanian@modares.ac.ir

۳. استاد گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، رایانامه: ghara_re@modares.ac.ir

۴. استادگروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، رایانامه: mrkordi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: پژوهشی	مقدمه: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی خودایمنی است که بر عملکرد شناختی در طول توسعه بیماری اثر دارد. یکی از تغییرات مهم در سیستم اعصاب مرکزی این بیماران اختلال سیناپسی است که پیش از دمیلینه شدن اکسون‌ها و مسیرهای عصبی رخ می‌دهد. پژوهش‌های پیشین نشان‌دهنده این نکته است که فعالیت بدنی در پیشگیری و درمان چنین شرایطی امیدوارکننده است. تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات حاصل از ورزش شنا بر پروتئین سیناپتوزومی SNAP25 بافت مغز دخیل در اختلالات شناختی و التهابی MS انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۰	روش پژوهش: از ۲۱ موش سوری C57BL/6 در سه گروه به تعداد مساوی کنترل، آنفالومیلیت خودایمنی تجربی بدون تمرین و با چهار هفته شنای هوازی استفاده شد. نمرات بالینی روزانه و سطح پروتئین SNAP25 پس از چهار هفته تمرین با روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۳۱	یافته‌ها: القای EAE سطح SNAP25 را نسبت به گروه کنترل سالم افزایش داد، اما ورزش شنا توانست آن را ۲۷٪ در کاهش دهد نمرات بالینی نیز در پی انجام ورزش در موش‌های بیمار بهبود یافت.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱	نتیجه‌گیری: ورزش منظم روزانه با تنظیم بیان SNAP25 در بافت مغز، احتمالاً رهایش واسطه‌های عصبی و عوامل تروفیک در ناحیه سیناپس را در شرایط التهابی تعدیل می‌کند و موجب بهبود علائم اختلال شناختی می‌شود.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲	
کلیدواژه‌ها: اختلال شناختی خفیف، القای EAE، تخریب سیناپسی، snap25 ورزش هوازی.	

استناد: بناصادق، سهیلا؛ شهربانیان، شهناز؛ قراخانلو، رضا و کردی، محمدرضا. تأثیر شنای هوازی بر بیان پروتئین سیناپسی و بهبود عملکرد شناختی در موش‌های مدل

مالتیپل اسکلروزیس. نشریه علوم زیستی ورزشی. ۱۴۰۳؛ ۱۷(۳): ۵-۱۷.

DOI: <http://doi.org/10.22059/JSB.2024.379202.1638>.

دسترسی به این نشریه علمی، رایگان است و حق مالکیت فکری خود را بر اساس لایسنس کرییتیو کامنز (CC BY-NC 4.0) به نویسندگان واگذار کرده است. آدرس نشریه: <https://jsb.ut.ac.ir/> | ایمیل: jsb@ut.ac.ir



مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خودایمنی است که سیستم عصبی مرکزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به تخریب سیناپس‌ها و غلاف میلین، به‌ویژه در اکسون‌ها منجر می‌شود [۱]. نزدیک به سه میلیون مورد در سراسر جهان شناسایی شده است که تقریباً ۴۵ تا ۷۰ درصد از افراد مبتلا در طول پیشرفت بیماری دچار اختلالات شناختی می‌شوند [۲]. درحالی‌که شیوع تقریباً در زنان سه برابر بیشتر است [۳]، اختلالات شناختی در مردان شدیدتر به‌نظر می‌رسد که نشان‌دهنده مشکلات حافظه شناختی و کلامی اولیه در ام‌اس است. همان‌طور که در منحنی‌های شناختی که برای ارزیابی پیشرفت بیماری و شناسایی افراد در معرض خطر استفاده می‌شود، زوال شناختی اغلب با کاهش یادگیری بصری-فضایی، تأخیر در یادآوری، توجه و سرعت پردازش اطلاعات مرتبط است. از این‌رو از منحنی‌های صدک شناختی می‌توان برای ارزیابی الگوی پیشرفت و شناسایی بیماران در معرض خطر استفاده کرد [۴]. هزینه سالانه مراقبت‌های بهداشتی برای بیماران ام‌اس در ایالات متحده حدود ۸۲ میلیارد دلار برآورد شده است [۵]. تحقیقات مختلف از استان‌های مرکزی و شمالی ایران روند رو به افزایش شیوع ام‌اس را گزارش کرده‌اند [۶]. اگرچه عوامل متعددی به‌عنوان علل بالقوه بیماری در نظر گرفته می‌شوند، اما هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. اختلال اولیه سیناپسی قبل از دمیلینه شدن در مسیرهای عصبی به اختلال شناختی در بیماران ام‌اس منجر می‌شود و با پیشرفت بیماری علائم شناختی، حرکتی و حسی گسترش می‌یابد [۷]. بنابراین شناسایی بیومارکرهای تخریب سیناپسی به پیشگیری، تشخیص زودهنگام و پاسخ درمانی این بیماران کمک می‌کند [۸].

یکی از نشانگرهای مهم تخریب سیناپسی در اختلالات روانپزشکی و بیماری‌های عصبی، پروتئین سیناپسی SNAP25 است که جزء مهم مجموعه SNARE است. این ترکیب وزیکول‌های ترشحی را با غشای پیش‌سیناپسی القا می‌کند و آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی مختلف و نوروتروفین‌ها را در شکاف سیناپسی تسهیل می‌کند [۹]. نقش ساختاری و عملکردی SNAP25 در کنار سایر عوامل ممکن است به‌طور شایان توجهی بر آشفستگی ذهنی، کمبود توجه و اختلالات گفتاری در این بیماران تأثیر بگذارد [۱۰]. مطالعات طولی روی بیماران آلزایمر نشان می‌دهد که سطوح SNAP25 در مایع مغزی نخاعی ممکن است از افزایش نسبی در اختلال شناختی خفیف (MCI) تا کاهش در مراحل پیشرفته زوال عقل متفاوت باشد [۱۱].

تخریب تدریجی میلین و در نتیجه اختلال عملکرد حرکتی ممکن است فعالیت بدنی را در برخی بیماران محدود کند [۱۲-۱۵]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ورزش بدنی تأثیرات مفید متعددی از جمله حفاظت عصبی، افزایش یادگیری سیناپسی و انعطاف‌پذیری در سیستم عصبی مرکزی دارد [۱۶-۱۸]. در میان تمرینات هوازی، شنا نشان داده است که ترشح نوروتروفین را در بافت مغز از طریق وزیکول‌های متراکم سیناپسی افزایش می‌دهد، با حداقل تأثیرات نامطلوب بر مهارت‌های حرکتی بیماران. شدت و مدت ورزش متناسب با تحمل بیمار می‌تواند آثار مثبت ورزش را افزایش دهد [۱۹]. در مدل حیوانی انسفالیت خودایمن تجربی EAE، مشخص شده است که شنا تأثیر کمتری بر هماهنگی حرکتی، استرس و فشار در مقایسه با ورزش روی تردمیل دارد و تأثیرات متعادل‌تری ایجاد می‌کند [۲۰].

نتایج تحقیق بوراس (۲۰۲۱) در زمینه مقایسه تأثیرات دیدن و تمرینات شنا بر پروتئین‌های وزیکول عصبی عضلانی NMJ در ورزشکاران، نشان داد که شنا سطوح SNAP25 را کاهش می‌دهد، درحالی‌که دیدن تغییرات شایان توجهی ایجاد نمی‌کند. نتایج وی نشان داد که ورزش با تقویت سازوکارهای محافظتی عصبی، کنترل حرکتی و شناختی را بهبود می‌بخشد [۲۱]. علاوه بر این، پژوهش‌های انجام‌گرفته روی ورزش‌های هوازی و اختلالات شناختی مرتبط با دیابت نشان داده است که ورزش سبب افزایش این پروتئین در هیپوکامپ موش‌های دیابتی می‌شود و عملکرد شناختی را بهبود می‌بخشد [۲۲]. با توجه به یافته‌های متناقض در مورد تأثیرات ورزش بر تنظیم

پروتئین سیناپسی و پاسخ‌های متنوع پروتئین‌های ساختاری به عملکرد سیناپسی در بیماری‌های روانی و عصبی، هدف ما بررسی تأثیر ورزش شنای هوازی در مدل حیوانی ام‌اس بود.

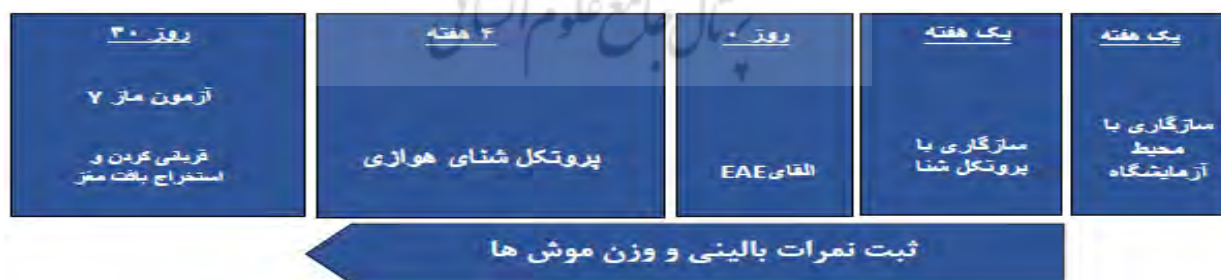
هدف از این تحقیق بررسی تأثیر چهار هفته ورزش شنا بر عوامل عملکرد شناختی بیماران ام‌اس است. به‌نظر می‌رسد ورزش شنای هوازی سطح پروتئین SNAP25 را تعدیل می‌کند و نمرات بالینی را در موش‌های ماده مدل EAE کاهش می‌دهد.

روش‌شناسی پژوهش

حیوانات آزمایشگاهی: ۲۱ موش ماده C57BL/6 با سن شش تا هشت هفته و وزن ۱۶ تا ۲۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای سازگاری با محیط جدید، حیوانات به مدت دو هفته تحت چرخه نور/تاریکی ۱۲:۱۲ در مرکز حیوانات قرار گرفتند. پس از آن، موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه کنترل سالم یا شم (C، ۷ موش)، آنفالومیلیت خودایمنی تجربی (EAE، ۷ موش)، و القای EAE با ورزش شنا (EAE+SE، ۷ موش) تقسیم شدند. تمام موش‌ها در طول آزمایش در شرایط استاندارد (21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد با دسترسی آزاد به غذا و آب) نگهداری شدند.

القای EAE: فرایند القای EAE در مؤسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری (تهران، ایران) انجام شد. موش‌ها با تزریق زیرجلدی ۵۰ میکروگرم گلیکوپروتئین الیگودندروسیت میلین (MOG35-55) محلول در سالین بافر فسفات (PBS) و امولسیون شده با حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (1mg CFA) ایمن شدند. علاوه بر این، ۱۰۰ نانوگرم سم سیاه‌سرفه (PTX) تزریق شد. گروه کنترل فقط سالین دریافت کردند [۲۳].

پروتکل تمرین: گروه EAE+EX در یک برنامه چهارهفته‌ای شنای استقامتی هر دو روز یک بار پس از القای EAE شرکت کردند. آنها هر روز به مدت ۳۰ دقیقه در استخری با دمای 1 ± 31 درجه سانتی‌گراد، به ابعاد $80 \times 60 \times 100$ سانتی‌متر، بدون محدودیت خاصی شنا کردند [۲۴]. در همین حال، گروه کنترل در قفس خشک باقی ماندند. تمرین به مدت ۲۸ روز تا شروع علائم بالینی ادامه یافت. روند انجام مراحل در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. مراحل مختلف تحقیق

ارزیابی علائم بالینی: وزن روزانه بدن حیوانات به‌عنوان یک شاخص سلامتی ارزیابی شد. علائم بالینی EAE نیز توسط دو ناظر مستقل ارزیابی شدن و یک سیستم امتیازدهی بالینی برای ارزیابی اختلالات حرکتی در مدل EAE با توجه به مقیاس زیر استفاده شد: امتیاز = ۰

بدون بیماری. امتیاز ۱ = کاهش وزن و ضعف در دم. نمره ۲ = ضعف در اندام عقبی. امتیاز ۳ = فلج کامل اندام عقبی. امتیاز ۴ = فلج اندام عقبی همراه با ضعف یا فلج در اندام جلویی. و امتیاز ۵ = مرگ حیوان [۱۹].

ارزیابی مولکولی:

تشخیص پروتئین به روش لوری: بافت مغز لیز، در دمای ۴ درجه، سرعت ۷۰۰۰ دور بر دقیقه، مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی با NaOH دو نرمال و بافر مخلوط A، B و C به ترتیب به نسبت های $A:100\mu l, B:1\mu l, C:1\mu l$ مخلوط شد. پس از انکوباسیون، محلول به صفحات الیزا منتقل شد و غلظت پروتئین با استفاده از ELISA Reader در ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت پروتئین با استفاده از رابطه $C = 0.0143x + 0.0123$ محاسبه شد که در آن x مقدار جذب است.

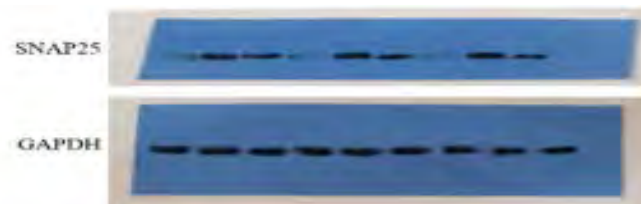
جداسازی کل پروتئین ها بر اساس اندازه مولکولی به روش الکتروفورز ژل SDS-PAGE: لیزات سلولی یا بافتی روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شد و الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت انجام گرفت. سپس ژل با Coomassie Blue به مدت دو ساعت در دمای اتاق رنگ آمیزی شد. پروتئین های روی ژل بر اساس وزن مولکولی با استفاده از نردبان استاندارد جدا شدند. برای مرحله ایمنوبلاتینگ پروتئین های جدا شده توسط SDS-PAGE با استفاده از روش ECL به غشای PVDF منتقل شدند. غشا با آنتی بادی های اولیه و ثانویه انکوبه شد و پروتئین هدف به صورت نواری روی غشا با بستر مناسب مشاهده شد.

برای وسترن بلات، پروتئین ها به غشای PVDF در ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت و نیم پس از الکتروفورز SDS-PAGE در ۹۰ ولت منتقل شدند. غشا با TBST شسته شد، یک شبه با آنتی بادی های اولیه انکوبه شد، سه بار با TBST شسته شد و سپس در محلول آنتی بادی ثانویه به مدت دو ساعت در یک شیکر در دمای اتاق انکوبه شد.

جدول ۱. محلول های ایمنوبلاتینگ

اجزا	محلول
متشکل از تریس باز، گلیسین، SDS و آب مقطر ($pH = 8.3$)	بافر شروع
متشکل از تریس باز، گلیسین، متانول ۲۰ درصد و آب مقطر	بافر انتقال
متشکل از TBS10X، Tween 20 و آب مقطر ($pH = 7.5$)	TBST
متشکل از NaCl، تریس HCl و آب مقطر ($pH = 7.5$)	TBST10X
متشکل از TBS10X، skim milk، Tween 20، گلیسرول و آب مقطر	بافر مسدودکننده

ظهور باندها: نوارهایی روی فیلم اشعه ایکس با ریختن نسبت مساوی از دو محلول کیت ECL روی کاغذ PVDF داخل پوشش پلاستیکی در داخل یک کاست به مدت چهار دقیقه ایجاد شد. فیلم اشعه ایکس روی کاغذ قرار داده شد، در کاست مهر و موم شد و به مدت چهار دقیقه در تماس با مواد باقی ماند. سپس فیلم در یک محلول ظاهری ساخته شد تا زمانی که نوارها ظاهر شدند، در محلول تثبیت ثابت شده و با آب مقطر شسته شدند. نسبت تمام پروتئین ها به پروتئین GAPDH در یک نمونه با استفاده از نرم افزار Image J برای تجزیه و تحلیل آماری محاسبه شد. پروتئین کنترل داخلی GAPDH به عنوان کنترل داخلی مقادیر پروتئین های هدف استفاده شد. تصویر وسترن بلات پروتئین های SNAP25 و GAPDH در بافت مغز موش در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. تصویر ظهور نوارها بر روی فیلم اشعه X

استخراج پروتئین: ۳۰ روز پس از القای EAE، موش‌ها قربانی شده و بافت‌های مغزی آنها جمع‌آوری شد. استخراج پروتئین از بافت‌های مغز با استفاده از بافر لیز انجام گرفت و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاوی پروتئین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

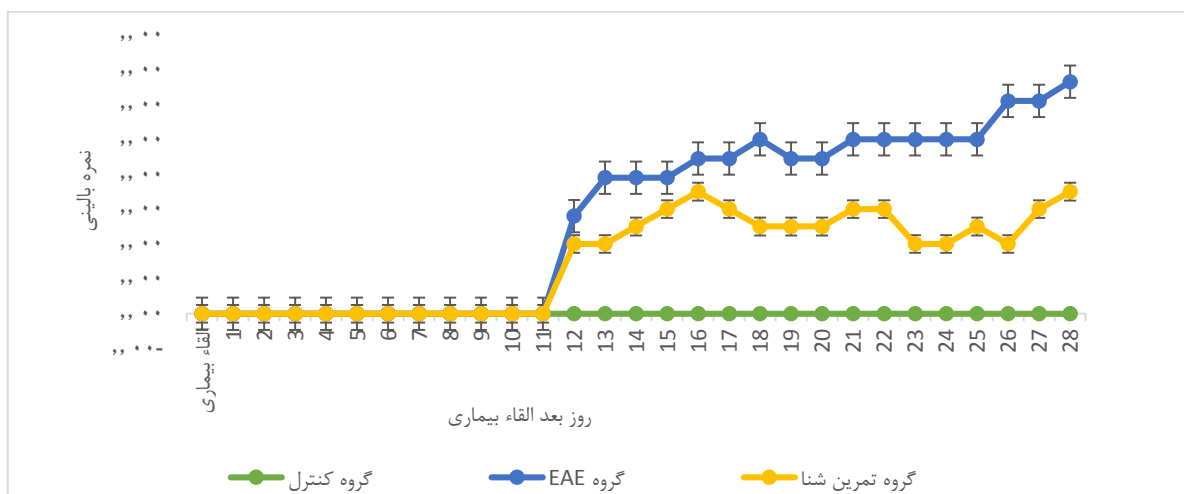
تجزیه و تحلیل وسترن بلات: برای تعیین سطح SNAP25 در بافت‌های مغز از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. مقادیر مساوی از پروتئین‌های استخراج‌شده بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE بارگذاری شد. پس از الکتروفورز، باندهای پروتئینی به غشای PVDF منتقل شدند و سپس در محلول مسدودکننده (شیر خشک بدون چربی رقیق‌شده در TBST) به مدت ۷۵ دقیقه غوطه‌ور شد. غشا با آنتی‌بادی اولیه علیه SNAP25 سانتا کروز، (ایالات متحده آمریکا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سه بار با TBST شسته شد و با آنتی‌بادی ثانویه خرگوش در غلظت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۷۵ دقیقه تیمار شد. GAPDH به‌عنوان کنترل بارگذاری استفاده شد.

روش آماری

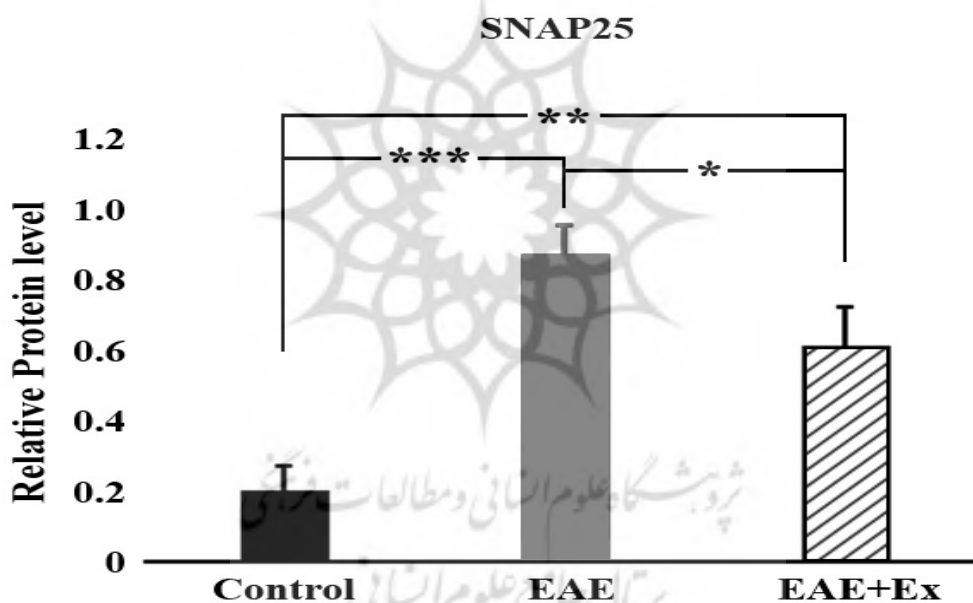
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ تجزیه و تحلیل شد. آمار توصیفی شامل میانگین، انحراف استاندارد، حداقل و حداکثر مقادیر ارائه شد. برای آمار استنباطی، با توجه به نرمال بودن داده‌ها، از آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) برای تعیین تفاوت در میانگین‌های گروهی و آزمون تعقیبی فیشر LSD برای مقایسه بین جفت گروه‌ها استفاده شد. نمرات بالینی به دلیل نرمال نبودن داده‌ها، با استفاده از آزمون کروسکال-والیس تجزیه و تحلیل شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهشی

تغییرات بالینی در هر دو گروه EAE و EAE+EX از روز یازدهم پس از القا شروع شد و تا روز بیست‌وهشتم ادامه یافت. این تغییرات در گروه EAE نسبت به گروه تمرین شنا بارزتر بود.



شکل ۳. تغییرات نمرات بالینی موش‌ها در سه گروه کنترل، القای EAE و تمرین شنا طی چهار هفته



شکل ۴. مقایسه مقادیر SNAP25 در گروه‌های مختلف تحقیق. سطوح مختلف SNAP25 در بافت مغز موش در سه گروه پژوهش

اثر بین گروهی معنادار ($F=42/9, P<0/001$) شده و بیان می‌دارد سطح نسبی این پروتئین در گروه کنترل کمترین مقدار را داشته و به‌طور معناداری با گروه EAE ($R^2=13/0, P<0/001$) و نیز گروه EAE+EX ($R^2=8/1, P<0/003$) متفاوت است. همچنین سطح SNAP25 در گروه با تمرین شنا به‌طور معناداری بیشتر از گروه EAE است ($R^2=4/9, P<0/029$).

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر ورزش شنا بر مقادیر SNAP25 سیناپتوزومی و نمرات بالینی سه گروه موش ماده مرتبط با اختلال شناختی در اماس انجام گرفت. نتایج نشان داد که چهار هفته تمرین شنا اثر کاهشی بر میزان SNAP25 داشته، در عین حال نمرات بالینی در اثر ورزش بهبود یافته است.

نمرات بالینی موش‌ها در دو گروه القای EAE با و بدون تمرین شنا پس از ۱۱ روز از القای بیماری از یکدیگر متمایز شده‌اند، به طوری که گروه همراه با تمرین هوازی شنا نمره کمتر یعنی سلامت حرکتی بهتر داشته‌اند. این روند در کل روزهای بین یازدهم و بیست‌وهشتم تداوم داشته و همیشه نمره بالینی گروه بیمار بدون تمرین بالاتر بوده است. در روز انتهایی چهار هفته تمرین، مشکلات حرکتی گروه موش‌های بیمار بدون تمرین تقریباً دو برابر گروه دارای تمرین شنا بود که بیانگر اثر مثبت فعالیت هوازی شنا بر علائم حرکتی نمونه‌هاست. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اختلال سیناپسی قبل از دمیلینه شدن اکسون‌ها و مسیرهای ارتباطی ماده سفید مغز و بروز علائم حرکتی رخ می‌دهد [۷]. ورزش هوازی بر علائم اختلال شناختی و حرکتی حیوان مؤثر بوده است. در تحقیق بوراس و همکاران، ورزش استقامتی شنا در مقایسه با دویدن با کاهش SNAP25 در اتصال عصبی عضلانی و بهبود حرکتی موش‌ها همراه بود [۲۵].

SNAP25 (پروتئین ۲۵ مرتبط با سیناپتوزومی) پروتئینی است که با تسهیل ادغام و زیکول‌های سیناپسی با غشای پیش‌سیناپسی، که گامی کلیدی در آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی است، نقش مهمی در انتقال عصبی ایفا می‌کند. در حالی که SNAP25 در درجه اول با عملکرد عصبی و انتقال عصبی مرتبط است، در زمینه بیماری‌های عصبی، از جمله اماس نیز بررسی شده است. رابطه دقیق بین SNAP25 و MS پیچیده است و تحقیقات در مورد این موضوع خاص ممکن است به اندازه تحقیقات در مورد سایر جنبه‌های اماس گسترده نباشد؛ اما توجه به این نکته مهم است که التهاب عصبی، اختلال عملکرد سیناپسی و اختلال در تنظیم سیستم ایمنی از ویژگی‌های کلیدی اماس هستند. SNAP25 افزون بر در سلول‌های عصبی، در سلول‌های ایمنی، به ویژه سلول‌های T نیز بیان می‌شود. تحقیق سیولوند و همکاران (۲۰۰۹) بیان SNAP25 را در سلول‌های ایمنی، از جمله سلول‌های T نشان داده و ارتباط بالقوه آن را با شرایط عصبی التهابی، مانند MS مورد بحث قرار داد [۲۴]. در تحقیق حاضر پس از القای EAE مقدار این پروتئین در مغز موش‌ها بیش از چهار برابر افزایش یافت، اما چهار هفته تمرین هوازی شنا موجب شد حدود ۳۰ درصد از سطح SNAP25 کاهش یابد. پژوهش‌ها در زمینه آثار ورزش هوازی بر سطح SNAP25 چندان زیاد نیست و نتایج نیز متناقض است. نیکوخصلت و همکاران (۲۰۲۰) با اعمال رژیم تمرین هوازی دویدن روی تردمیل در موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو نشان دادند سطح این پروتئین در هیپوکمپ افزایش داشته است [۲۲]. خوست-بوراس و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داده بودند موش‌ها با تمرین شنا به سطح پایین‌تری از دویدن و هر دو به سطح کمتری از گروه کنترل بدون تمرین بدنی رسیده بودند [۲۱]. نا و همکاران (۲۰۲۰) نیز پس از اعمال تمرین مشاهده کردند که سطح SNAP25 با افزایش بیش از سه‌برابری همراه بوده است [۲۶] که نتیجه دو پژوهش اخیر با یافته‌های حاضر در تناقض است. برای مثال برخی تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که پروتئین‌های SNAREs در بیماری‌های مخرب عصبی مانند آلزایمر افزایش داشته است که می‌تواند مرتبط با بدتاشدگی و تجمع پروتئین SNAP25 و در نتیجه اختلال در ره‌ایش نوروترنسمیترها و نوروتروفین‌ها و عملکرد سیناپسی باشد [۲۷]. علت این تفاوت ممکن است از نقش‌های چندگانه این پروتئین‌های تنظیمی نشأت گرفته باشد. برای مثال برخی تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین‌های SNAREs در بیماری‌های مخرب عصبی مانند آلزایمر افزایش داشته است [۲۸] و این افزایش در اوایل تخریب عصبی و شروع علائم خفیف اختلال شناختی بوده که از آن برای تشخیص تفکیکی گروه‌های مختلف اختلالات شناختی در بیماری‌های تخریب عصبی استفاده شده است [۲۹].

این توجیه در حمایت از یافته‌های تحقیق حاضر است. همچنین اثر انجام چهار هفته ورزش هوازی بر استرس اکسیداتیو که عامل بدتاشدگی و تجمع پروتئین‌هاست، موجب تنظیم منفی آن شده است [۲۷] که می‌تواند توجیهی برای افزایش بیان و در عین حال عملکرد نابجای پروتئین باشد.

به‌طور خلاصه، نتایج این پژوهش نشان داد که چهار هفته ورزش می‌تواند به‌طور چشمگیری سطوح SNAP25 مربوط به عملکرد شناختی را تنظیم کند. ورزش هوازی نیز وضعیت بالینی افراد را بهبود بخشد. افزایش سطح SNAP25 در روز ۳۰ پس از القای EAE ممکن است نشان‌دهنده استعدادهای ابتلا به اختلالات شناختی خفیف باشد که توسط ورزش شنای هوازی تعدیل شده است. بنابراین، ورزش می‌تواند تا حدی اختلالات شناختی را با تنظیم پاسخ‌های التهابی و تعدیل پروتئین‌های تاولی در سیناپس‌های عصبی کاهش دهد.

تحقیق حاضر با محدودیت‌هایی روبه‌رو بوده است. نحو برداشت نمونه مغزی می‌تواند بر نتیجه اثرگذار باشد. تحقیقات پیشین از هیپوکمپ و یا مخچه برداشت کرده‌اند، اما در این پژوهش از کل بافت مغز موش‌ها نمونه‌برداری شده بود که برداشت مناطق خاص مغزی می‌تواند موضوعی برای بررسی‌های آینده باشد. نوع پروتئین بررسی شده در این تحقیق به پروتئین پیش‌سیناپسی محدود بود. پروتئین‌های دیگری نظیر پروتئین دانسیتهٔ پس‌سیناپسی PSD95 و نوروگرانین نیز می‌توانند در تکمیل بحث‌های مشابه کمک‌کننده باشند.

References

- [1]. Faissner S, Gold R. Progressive multiple sclerosis: latest therapeutic developments and future directions. *Ther Adv Neurol Disord*. 2019;905-922. 10.1038/s41573-019-0035-2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31598138/>
- [2]. Gilmour H, Ramage-Morin PL, Wong SL. Multiple sclerosis: Prevalence and impact. *Health Rep*. 2018;29(1):3-8. PMID: 29341025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29341025/>
- [3]. Schwarz K, Schmitz F. Synapse dysfunctions in multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(2):1639. 10.3390/ijms24021639. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9862173/>
- [4]. Javadi AHS, Shafikhani AA, Beizapour N. Evaluation of the determinants of cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Middle East Current Psychiatry*. 2022;29(1):1-7. 10.1186/s43045-022-00262-5. <https://mecp.springeropen.com/articles/10.1186/s43045-022-00262-5>
- [5]. Bebo B, Cintina I, LaRocca N, Ritter L, Talente B, Hartung D, et al. The economic burden of multiple sclerosis in the United States: estimate of direct and indirect costs. *Neurology*. 2022;98(18):e1810-e7. 10.1212/WNL.0000000000200150. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35418457/>
- [6]. Etemadifar M, Ghourchian S, Sabeti F, Akbari M, Etemadifar F, Salari M. The higher prevalence of multiple sclerosis among Iranian Georgians; new clues to the role of genetic factors. *Revue Neurologique*. 2020;176(1-2):113-7. 10.1016/j.neurol.2019.04.004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31182312/>
- [7]. Bellingacci L, Mancini A, Gaetani L, Tozzi A, Parnetti L, Di Filippo M. Synaptic dysfunction in multiple sclerosis: a red thread from inflammation to network disconnection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(18):9753. 10.3390/ijms22189753. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34575917/>
- [8]. Nakhzari Khodakheir J, Haghighi A, Hamedinia MR, Ahmadi A. The effects of combined exercise training with aerobic dominant and coenzyme Q10 supplementation on muscular function in patient with multiple sclerosis. *Internal Medicine Today*. 2018;24(4):286-93. <http://imtj.gmu.ac.ir/article-1-2974-en.html>. http://jams.arakmu.ac.ir/browse.php?a_id=5633&sid=1&slc_lang=en
- [9]. Achiron A, Polliack M, Rao S, Barak Y, Lavie M, Appelboim N, et al. Cognitive patterns and progression in multiple sclerosis: construction and validation of percentile curves. *Journal of neurology*,

- neurosurgery, and psychiatry. 2005;76(5):744. 10.1136/jnnp.2004.045518.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15834042/>
- [10]. Öhrfelt A, Brinkmalm A, Dumurgier J, Zetterberg H, Bouaziz-Amar E, Hugon J, et al. A novel ELISA for the measurement of cerebrospinal fluid SNAP-25 in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2019;420:136-44. 10.1016/j.neuroscience.2018.11.038.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30528858/>
- [11]. Motl RW, Gosney J. Effect of exercise training on quality of life in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2008;14(1):129-35. 10.1177/1352458507080464.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881388/>
- [12]. Motl RW, McAuley E, Snook EM. Physical activity and multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2005;11(4):459-63. <https://doi.org/10.1191/1352458505ms1188oa>.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16042230/>
- [13]. Motl RW, Pilutti LA. Is physical exercise a multiple sclerosis disease modifying treatment? *Expert review of neurotherapeutics*. 2016;16(8):951-60. 10.1080/14737175.2016.1193008.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27219279/>
- [14]. Motl RW, Sandroff BM, Kwakkel G, Dalgas U, Feinstein A, Heesen C, et al. Exercise in patients with multiple sclerosis. *The lancet neurology*. 2017;16(10):848-56. 10.1016/S1474-4422(17)30281-8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28920890/>
- [15]. Pilutti LA, Platta ME, Motl RW, Latimer-Cheung AE. The safety of exercise training in multiple sclerosis: a systematic review. *Journal of the neurological sciences*. 2014;343(1-2):3-7. 10.1016/j.jns.2014.05.016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24880538/>
- [16]. Pinho RA, Aguiar Jr AS, Radák Z. Effects of resistance exercise on cerebral redox regulation and cognition: an interplay between muscle and brain. *Antioxidants*. 2019;8(11):529. 10.3390/antiox8110529. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31698763/>
- [17]. Correale L, Buzzachera CF, Liberali G, Codrons E, Mallucci G, Vandoni M, et al. Effects of combined endurance and resistance training in women with multiple sclerosis: a randomized controlled study. *Frontiers in Neurology*. 2021;12:698460. 10.3389/fneur.2021.698460.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34421801/>
- [18]. Dalgas U, Stenager E. Exercise and disease progression in multiple sclerosis: can exercise slow down the progression of multiple sclerosis? *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2012;5(2):81-95. 10.1177/1756285611430719. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302199/>
- [19]. 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. 10.1016/j.jneuroim.2020.577172. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32028123/>
- [20]. Emadi S, Hemati Farsani Z, Dehestani Ardakani M. Effects of preconditioning or following exercise on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review in animal models of multiple sclerosis. *Journal of Exercise & Organ Cross Talk*. 2023;3(1):43-52. 10.22034/JEOCT.2023.379278.1062.
https://www.jeoct.com/article_168876.html
- [21]. Just-Borràs L, Cilleros-Mañé V, Hurtado E, Biondi O, Charbonnier F, Tomàs M, et al. Running and swimming differently adapt the BDNF/TrkB pathway to a slow molecular pattern at the NMJ. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4577. 10.3390/ijms22094577.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8123836/>
- [22]. Nikukheslat SD, Karimi P, Sadri I. Effect of Aerobic Training on Synaptic Integrity Proteins in Hippocampus and Prefrontal Cortex of Type II Diabetic Rats. *Medical Journal of Tabriz University of*

- Medical Sciences. 2020;42(2):160-7. 10.34172/mj.2020.032. <https://mj.tbzmed.ac.ir/Article/27138>
- [23]. 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. 10.1016/j.bbi.2020.07.010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32688029/>
- [24]. Zeraati M, Najdi N, Mosaferi B, Salari A-A. Environmental enrichment alters neurobehavioral development following maternal immune activation in mice offspring with epilepsy. *Behavioural brain research*. 2021;399:112998. 10.1016/j.bbr.2020.112998. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33197458/>
- [25]. Just-Borràs L, Hurtado E, Cilleros-Mañé V, Biondi O, Charbonnier F, Tomàs M, et al. Running and swimming prevent the deregulation of the BDNF/TrkB neurotrophic signalling at the neuromuscular junction in mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(15):3027-40. 10.1007/s00018-019-03337-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31646358/>
- [26]. Na J, Lee E, Im SI, Kim Y-j, Kim SY, Kim BJ. Exercise training improves adipocyte accumulation and muscle fibrosis by TGF- β 1 and α -SMA reduction after botulinum toxin type A administration in mice. 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-17126/v1>. <https://europepmc.org/article/ppr/ppr122938>
- [27]. Ochneva A, Zorkina Y, Abramova O, Pavlova O, Ushakova V, Morozova A, et al. Protein Misfolding and aggregation in the brain: Common Pathogenetic pathways in neurodegenerative and mental disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(22):14498. 10.3390/ijms232214498. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9695177/>
- [28]. Kivisäkk P, Carlyle BC, Sweeney T, Quinn JP, Ramirez CE, Trombetta BA, et al. Increased levels of the synaptic proteins PSD-95, SNAP-25, and neurogranin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2022;14(1):1-11. 10.1186/s13195-022-01002-x. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35461266/>
- [29]. Zhang H, Therriault J, Kang MS, Ng KP, Pascoal TA, Rosa-Neto P, et al. Cerebrospinal fluid synaptosomal-associated protein 25 is a key player in synaptic degeneration in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*. 2018;10:1-11. 10.1186/s13195-018-0407-6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115118/>

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی