



Kharazmi University



The Effect Of Swimming Aerobic Training On The Levels Of IL-6 And IL-10 In The Brain Tissue Of Female Mice With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Elmira Ahmadi¹ | Shahnaz Shahrbanian^{2*} | Mohamadreza Kordi³ | Reza Gharakhanlou⁴ | Gregory Pearcey⁵

1. Ph.D. student in Exercise Physiology, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University
2. Associate professor, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University
3. Professor in Exercise Physiology, Faculty of Health and Sport Science, University of Tehran.
4. Professor in Exercise Physiology, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University
5. Assistant professor in Kinesiology, Human Kinetics faculty, Memorial University, Canada



CrossMark

corresponding author: Shahnaz Shahrbanian, sh.shahrbanian@modares.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 6-6-2023

Revised: 2-1-2024

Accepted: 3-1-2024

Keywords:

Aerobic exercise, Interleukins, Inflammation, MS disease, Cytokines, Mental Fatigue.

How to Cite:

Elmira Ahmadi, Shahnaz Shahrbanian, Mohamadreza Kordi, Reza Gharakhanlou, Gregory Pearcey. **The effect of swimming aerobic training on the levels of IL-6 and IL-10 in the brain tissue of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Research In Sport Medicine and Technology*, 2024; 14(27): 55-74.

Fatigue is one of the most common symptoms among individuals with multiple sclerosis (MS). The imbalance of inflammatory cytokines in the brain causes mental fatigue. It is believed that aerobic exercise may moderate the level of inflammation of cytokines and thus reduce mental fatigue. This study was conducted to investigate the effect of swimming aerobic training on pro-inflammatory factors (interleukin 6) and anti-inflammatory factors (interleukin 10) to evaluate mental fatigue in the brains of female mice after EAE induction. In this research, 21 mice (8 weeks old, 18 to 20 grams) were divided into three groups: healthy control, EAE control, and EAE swimming aerobic exercise. The animals in the training group performed moderate-intensity swimming exercises for 4 weeks, with 5 sessions per week, each session lasting 30 minutes. The western blot method was used to analyze the research variables. The results showed no significant difference in the amount of IL-6 between the EAE group and the swimming training group, but the amount of IL-10 in the swimming training group showed a significant increase compared to the EAE group. The ratio of IL-10/IL-6 values between the swimming training group and the EAE group was also not significant. It seems that moderate-intensity swimming aerobic exercises, without changing the pro-inflammatory factor, along with increasing the anti-inflammatory factor IL-10, can lead to an improvement in the balance of the inflammatory index and a reduction in fatigue in the EAE group and the swimming exercise group.



Published by Kharazmi University, Tehran, Iran. Copyright(c) The author(s) This is an open access article under e: CC BY-NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



تأثیر تمرین هوازی شنا بر سطوح IL-6 و IL-10 در بافت مغز موش‌های ماده مبتلا به انسفالومیلیت

خودایمن تجربی

المیرا احمدی^۱، شهناز شهربانیان*^۲، محمدرضا کردی^۳، رضا قراخانلو^۴، گرگوری پیرسی^۵

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران.
۳. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۴. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران.
۵. استادیار دانشکده حرکت شناسی، دانشگاه مموریال نیوفاندلند و لابرادور، کانادا.

نویسنده مسئول: شهناز شهربانیان sh.shahrbanian@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله:

نوع مقاله: علمی-پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۶

ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳

واژه‌های کلیدی:

تمرین هوازی، اینترلوکین‌ها، التهاب، بیماری ام اس، سایتوکاین‌ها، خستگی ذهنی

ارجاع:

المیرا احمدی، شهناز شهربانیان، محمدرضا کردی، رضا قراخانلو، گرگوری پیرسی. تأثیر تمرین هوازی شنا بر سطوح IL-6 و IL-10 در بافت مغز موش‌های ماده مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی. پژوهش در طب ورزشی و فناوری. ۱۴۰۳: ۱۴(۲۷): ۷۴-۵۵

چکیده

خستگی از شکایات بیماران مالتیپل اسکلروزیس (MS) است. در بیماران MS تعادل سایتوکاین‌های التهابی در مغز برهم ریخته که یکی از رخدادهای آن خستگی ذهنی است و احتمالاً تمرینات هوازی میزان التهاب سایتوکاین‌ها را تعدیل کرده و از این طریق خستگی ذهنی را کاهش می‌دهد. مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر تمرین هوازی شنا بر فاکتور پیش التهابی (اینترلوکین ۶) و فاکتور ضدالتهابی (اینترلوکین ۱۰) برای ارزیابی خستگی ذهنی در مغز موش‌های ماده پس از القای EAE انجام شد. در این پژوهش ۲۱ موش (۸ هفته‌ای، ۱۸ تا ۲۰ گرم) به ۳ گروه کنترل سالم، کنترل EAE و فعالیت ورزشی هوازی شنا EAE تقسیم شدند و حیوانات در گروه تمرین طی ۴ هفته، هر هفته ۵ جلسه‌ی ۳۰ دقیقه‌ای به تمرینات شنا با شدت متوسط پرداختند. بررسی آزمایشگاهی متغیرهای پژوهش با روش وسترن بلات انجام شد. نتایج نشان داد در میزان IL-6 در میان گروه EAE و تمرین شنا تفاوت معناداری وجود نداشت اما میزان IL10 در گروه تمرین شنا نسبت به گروه EAE افزایش معنی داری نشان داد. با این حال نسبت مقادیر IL10/IL6 بین گروه تمرین شنا با EAE نیز معنادار نبود. بنظر می‌رسد تمرینات هوازی شنا با شدت متوسط، بدون تغییر در عامل پیش التهابی، همراه با سوق دادن به سمت عوامل ضدالتهابی، با افزایش IL10، می‌تواند بین گروه EAE و تمرین شنا منجر به بهبود تعادل شاخص التهابی و کاهش میزان خستگی ذهنی ناشی از خستگی سایتوکاینی گردد.

Extended Abstract

Fatigue is one of the most common and debilitating symptoms experienced by individuals with multiple sclerosis (MS), an autoimmune disorder characterized by demyelination and neurodegeneration in the central nervous system (CNS). This condition leads to a significant imbalance of inflammatory cytokines in the brain, contributing to mental fatigue. Recent research suggests that aerobic exercise may help moderate cytokine levels, potentially reducing inflammation and alleviating fatigue. This study aimed to investigate the effects of swimming aerobic training on the levels of pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) and anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) in female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an established animal model for MS.

Methods

Twenty-one female mice, aged 8 weeks and weighing between 18 to 20 grams, were used in this study. These mice were randomly assigned to one of three groups: healthy control (HC), EAE control (EAE-C), and EAE with swimming aerobic exercise (EAE-S). The EAE groups were induced with experimental autoimmune encephalomyelitis to simulate the pathology of MS. The EAE-S group underwent a moderate-intensity swimming exercise regimen, consisting of 30-minute sessions conducted five times per week over a four-week period.

The EAE model is a widely used method to study MS due to its ability to replicate many aspects of human disease, including demyelination and CNS inflammation. In this study, the induction of EAE was performed using a standard protocol involving immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA), followed by pertussis toxin administration. This method reliably induces EAE, resulting in an autoimmune response against the CNS. At the end of the exercise period, brain tissues were harvested from the mice, and the levels of IL-6 and IL-10 were measured using the western blot method. Western blotting is a powerful technique for detecting specific proteins within a complex mixture, allowing for the quantification of cytokine levels in the brain tissue. In this study, protein extraction was performed on the harvested brain tissues, followed by electrophoresis, transfer to membranes, and probing

with specific antibodies against IL-6 and IL-10. Enhanced chemiluminescence (ECL) was used to visualize the protein bands, and densitometry was performed to quantify the relative protein levels.

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test to determine the significance of differences between the groups. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. This approach ensures that the observed differences in cytokine levels are not due to random variation but reflect genuine effects of the exercise intervention.

Results

The results indicated no significant difference in IL-6 levels between the EAE control group and the EAE swimming exercise group, suggesting that moderate-intensity swimming does not significantly affect the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in the brain. This finding is important as it suggests that the exercise regimen employed in this study does not exacerbate the inflammatory response associated with EAE.

However, there was a significant increase in the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the EAE-S group compared to the EAE-C group. IL-10 is a critical cytokine involved in regulating the immune response and promoting an anti-inflammatory environment. The increase in IL-10 levels observed in the EAE-S group suggests that swimming aerobic exercise may enhance the brain's ability to counteract inflammation, potentially providing a protective effect against the neuroinflammatory processes associated with MS.

Despite this increase in IL-10, the ratio of IL-10 to IL-6 did not show a significant difference between the EAE-S and EAE-C groups, indicating that while IL-10 levels rose, the relative balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines remained relatively unchanged. This finding highlights the complexity of the immune response in EAE and suggests that while exercise can enhance anti-inflammatory mechanisms, it may not be sufficient to completely shift the overall balance of cytokines.

Discussion

The findings suggest that while swimming aerobic exercise does not reduce IL-6 levels, it significantly increases IL-10 levels in the brain of EAE-induced mice. This increase in

IL-10 may help create a more anti-inflammatory environment in the CNS, which could potentially contribute to a reduction in neuroinflammation, and mental fatigue associated with MS. The mechanisms through which aerobic exercise influences cytokine levels are complex and involve multiple physiological pathways.

One potential mechanism is the modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Exercise has been shown to influence the HPA axis, leading to the release of endogenous glucocorticoids, which have potent anti-inflammatory effects. Additionally, exercise can enhance the production of neuroprotective agents such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which supports neuronal survival and function. These combined effects may contribute to the observed increase in IL-10 levels and the potential reduction in neuroinflammation.

Furthermore, regular physical activity has been associated with improved immune regulation, including the modulation of regulatory T cells (Tregs) and the production of anti-inflammatory cytokines. These adaptations may help create a more balanced immune response, reducing the likelihood of autoimmune attacks against the CNS in MS.

Implications for MS Management

These findings have important implications for the management of MS. Incorporating aerobic exercise, such as swimming, into the treatment plans for MS patients could serve as an effective adjunct therapy to reduce mental fatigue. Regular physical activity might improve overall quality of life for individuals with MS by promoting an anti-inflammatory environment within the CNS. It is crucial, however, to customize exercise programs to individual needs and capacities to ensure safety and effectiveness.

For MS patients, exercise programs should be designed with consideration of their physical limitations and disease progression. Moderate-intensity exercises, such as swimming, offer a low-impact option that can be easily adjusted to suit individual fitness levels. The buoyancy of water reduces the risk of joint stress and injury, making swimming a suitable exercise for individuals with varying degrees of mobility.

Healthcare providers should also consider the potential psychological benefits of regular physical activity. Exercise has been shown to improve mood, reduce anxiety and depression, and enhance cognitive function. These effects can be particularly beneficial

for MS patients, who often experience a range of psychological symptoms in addition to physical fatigue.

Future Directions

Future research should explore the long-term effects of different types and intensities of aerobic exercise on cytokine levels and fatigue in MS. Clinical trials involving MS patients are necessary to validate these findings and facilitate the translation of animal model research into human therapy. Further studies should also investigate the underlying mechanisms of exercise-induced cytokine modulation to optimize exercise interventions for managing MS-related symptoms.

Additionally, research should explore the potential synergistic effects of combining exercise with other therapeutic interventions, such as pharmacological treatments and dietary modifications. Understanding how these interventions interact could lead to more comprehensive and effective management strategies for MS.

Moreover, future studies should consider the heterogeneity of MS and the variability in disease progression and symptomatology among patients. Personalized exercise programs that account for individual differences in disease severity, fitness levels, and comorbid conditions may be necessary to maximize the benefits of physical activity for MS patients.

Conclusion

This study demonstrates that moderate-intensity swimming aerobic exercise significantly increases the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in a mouse model of MS without affecting IL-6 levels. These results suggest that aerobic exercise could help reduce mental fatigue in MS by fostering a more balanced inflammatory state in the brain. Additional research is required to confirm these effects in human subjects and to explore the optimal types and intensities of exercise for managing MS-related fatigue.

The potential for exercise to serve as a non-pharmacological intervention in MS management is promising. By promoting an anti-inflammatory environment within the CNS and enhancing overall physical and mental well-being, aerobic exercise may offer a valuable addition to the therapeutic toolkit for MS. The insights gained from this study

provide a foundation for future research and underscore the importance of integrating exercise into comprehensive MS care.

Keywords: Aerobic exercise, Interleukins, Inflammation, MS disease, Cytokines, Mental Fatigue

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) بیماری التهابی-خودایمنی است که در آن الیگودندروسیت‌ها و ماده سفید غلاف میلین، به اشتباه هدف حمله لنفوسیت‌های کمکی T در سیستم عصبی مرکزی ۲ (CNS) قرار می‌گیرند (۱). بیماری MS از طریق نفوذ سلول‌های ایمنی به داخل سد خونی-مغزی موجب التهاب، دمیلینه شدن و در نهایت اختلال در پیام‌رسانی مسیر عصبی می‌شود (۲).

خستگی از شایع‌ترین مشکلات بیمار MS است که مشکلات شناختی و جسمانی را به همراه دارد (۳). عوامل ایمنی، عصبی و غدد درون‌ریز نقش مسبب در شروع علائم خستگی بیمار MS دارند (۴). از انواع خستگی، خستگی ذهنی منجر به نقص عملکرد فیزیکی و شناختی می‌شود (۵، ۶) و دانش ضعیف پاتولوژیک و مکانیزم‌های مرتبط با آن، نیازمند توجه بیشتر محققان به صورت سلولی-مولکولی است (۷).

میان عوامل ایجاد خستگی ذهنی و افسردگی در MS هم‌پوشانی وجود دارد و عامل موثر مشترک بازخورد منفی در محور HPA است که در نهایت سبب ایجاد التهاب مضاعف در سیستم عصبی بیمار می‌گردد (۸). علت بیش‌فعالی در محور HPA، تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل IL-6 و همچنین کاهش سایتوکاین‌های ضد‌التهابی مثل IL-10 است (۸، ۹).

افزایش میزان محیطی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی باعث فعال شدن آوران‌های اینتروسپتیو ۳ (به‌ویژه آوران واگ ۴) می‌شود که مسیر ارتباطی سیستم ایمنی-مغز است (۱۰). فعال شدن اعصاب آوران واگ می‌تواند باعث تغییر تعادل در فعالیت نواحی مغز، به خصوص قشرکمربندی قدامی ۵ (ACC) شده و در نهایت سبب ایجاد خستگی ذهنی شود (۱۰). در بیماران MS افزایش فعال‌سازی قشر حرکتی اولیه ۶ (M1) در هنگام اجرای فعالیت جسمانی ساده به دلیل بیش‌فعال شدن سیستم تسهیل عصبی به منظور جبران در اختلال حرکت و در نتیجه‌ی آن دمیلینه شدن در ناحیه‌ی پیشانی مغز به‌وجود می‌آید (۱۱، ۱۲).

در بررسی ناحیه‌ی ACC مغزی در تعدیل ایمنی نشان داده شده است که التهاب سیستمیک می‌تواند باعث افزایش میزان غلظت سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شود و با افزایش فعالیت عصبی، سبب بروز خستگی ناشی از التهاب شود (۱۳). در واقع ACC مغزی به طور جدی با خستگی ذهنی در ارتباط است (۱۴).

- 1 . Multiple Sclerosis
- 2 . Central Nervous System
- 3 . Afferent interoceptive fibers
- 4 . Nervus vague
- 5 . Anterior Cingulate Cortex
- 6 . Primary motor cortex

با توجه به التهابی بودن بیماری MS، میزان تعادل سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی به عنوان عامل تنظیم‌کننده اصلی سیستم‌ایمنی در بیماری MS به‌شمار می‌رود (۱۵). می‌توان با ایجاد تعامل میان مسیر دوپامینی-هیستامینی-استروژنی و کاهش انرژی مصرفی، سبب بهبود علائم خستگی در MS شد (۱۶).

اینترلوکین ۱۶ (IL-6) سایتوکاین پیش‌التهابی است که نشانگر فعالیت‌های بیولوژیک می‌باشد (۱۷). افزایش ظرفیت IL-6 در مایع مغزی نخاعی بیمار MS با کاهش ظرفیت نوروپلاستیستی همراه است (۱۸، ۱۹). کاهش IL-6 بهبود شرایط بالینی بسیار مهمی به همراه دارد (۲۰). IL-6 دوگانه عمل می‌کند و بررسی این فاکتور در جهت عملکرد التهابی بودن باید در زمان استراحت بیمار انجام شود (۲۱).

به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی هوازی بر فاکتورهای پیش‌التهابی و ضدالتهابی سبب ایجاد تغییر در شاخص‌های خستگی ذهنی ناشی از خستگی سایتوکاینی شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی شنا بر فاکتور التهابی و ضدالتهابی در بافت مغز موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی است.

روش پژوهش

حیوانات: این مطالعه بر روی ۲۱ سر موش ماده نژاد C57BL6، ۸ هفته‌ای (۱۸ تا ۲۰ گرم) که از انستیتو پاستور خریداری شده بود، در آزمایشگاه علوم رفتاری و شناختی سالاری در کرج انجام گرفت. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری پنج درصد تعیین شد. موش‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به سه گروه کنترل EAE (n=7)، کنترل سالم (n=7) و فعالیت هوازی + EAE (n=7) تقسیم شدند. هفته اول پس از انتقال موش‌ها با محیط آزمایشگاه سازگار شدند. هفته دوم گروه فعالیت ورزشی با پروتکل و ابزار تمرین آشنا شدند و سپس القای EAE انجام شد. معیار خروج موش‌ها به شکلی بود که اگر موش‌ها دو جلسه متوالی پروتکل‌های تمرینی را انجام نمی‌دادند از پژوهش خارج می‌شدند.

نحوه نگهداری حیوانات: حیوانات در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات (در گروه‌های ۷تایی) و در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (۱±۲۲ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری می‌شدند. آنها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و تمام پروتکل‌های آزمایشگاهی به تایید کارگروه اخلاق در کمیته‌ی پژوهش کارگروه اخلاق در پژوهشگاه تربیت بدنی رسید. شناسه کد اخلاق به شرح زیر است:

IR.SSRC.REC.1402. 084

نحوه القای EAE و ارزیابی بالینی: موش‌های C57BL/6 با ۵۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین^۲ (MOG35-55) که در محلول بافرشده با فسفات^۳ (PBS) حل شده است همچنین با ۱ میلی‌گرم بفر میلی‌لیتر دمای

1. Interleukin-6
2. Myelin oligodendrocytes glycoprotein
3. Phosphate-buffered saline

کامل فروند^۱ (CFA) ایمن سازی شدند. تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۲ (در روز تزریق و دو روز بعد از آن)، به صورت داخل صفاقی ۱۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین^۲ داشتند (۳۶). لازم به ذکر است گروه کنترل سالم، همزمان با باقی گروه ها تزریق سالین^۳ داشتند. برای ارزیابی وزن بدن (پارامتر سلامت)، حیوانات روزانه وزن کشی شده و علائم بالینی EAE، توسط دو ناظر مستقل بر اساس مقیاس زیر مورد ارزیابی قرار گرفته است: 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.

پروتکل فعالیت هوازی: گروه تمرین هوازی برنامه شنا را به مدت ۳۰ دقیقه ۵ روز در هفته در استخر شنای حیوانات [۱۰۰×۱۰۰×۸۰ سانتی متر (طول، عرض، ارتفاع)] با دمای ۱±۳۱ سانتی گراد و در طول ۴ هفته انجام دادند. موش‌های با استفاده از یک اسفنج و با وزن خود به ادامه شنا کردن به صورت آزادانه تشویق شدند (۳۷). با توجه به پیشینه، تمرین شنا با ۰ درصد وزن بدن نشان از شدت متوسط در مطالعات موش‌ها را به همراه دارد (۳۸). یوکسی و همکاران (۲۰۱۹) (۳۸) تاثیر دو نوع شنا با شدت بالا و شدت متوسط را در فاکتورهای التهابی موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی بررسی کردند و گزارش کردند تمرینات شنا برای موش‌ها بدون وزن اضافه و تنها با وزن بدن موش، متوسط تلقی می‌شود زیرا در این وضعیت که با اسفنج به شنا تشویق می‌شود تنها جهت زنده ماندن در آب پا میزند و میزان مسافت طی شده در پژوهش حاضر به همین علت بررسی نشد.

جمع آوری نمونه‌ها: جهت حذف اثر حاد تمرین با توجه به فاکتورهای انتخابی، نمونه‌گیری ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی مداخله صورت گرفت. بدین ترتیب، در پایان مداخله، موش‌ها با تزریق کتامین (۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش) بیهوش و سپس در آزمایشگاه زیر نظر متخصص و روش مورد تایید، تشریح و بافت برداری شدند. برای انجام وسترن بلات ابتدا الکتروفورز ژل SDS با ولتاژ ۹۰ انجام شد. پروتئین‌ها بر روی ژل PAGE-SDS بر اساس اندازه تفکیک شدند. پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل با ولتاژ ۱۰۰ به مدت یک ساعت و نیم به کاغذ PVDF با منافذ ۰.۴۵ میکرومتر بصورت پیوسته و مرطوب منتقل شدند. پس از بریدن بخش متراکم کننده ژل، ۱۰ دقیقه در بافر قرار داده شدند. با کمک پنس کاغذ PVDF و چندین پد صافی دقیقاً هم اندازه ژل برش داده شدند. دو عدد اسفنج جهت قرارگیری در طرفین غشا و ژل ابتدا در بافر انتقال قرار داده شدند تا خیس گردند. ترتیب قرارگیری به شکلی بود که غشا به سمت قطب مثبت و ژل به سمت قطب منفی باشد. کاغذهای صافی به تعداد مساوی به همراه یک اسفنج در دو طرف غشا و ژل قرار داده شده و نهایتاً بالت قاب پالستیکی مربوطه محکم شدند و در تانک بالت که تا ارتفاع مناسب با بافر پر شده است، قرار گرفت. در این مرحله تانک وسترن بالتینگ در مخزنی از یخ قرار گرفت تا گرمای ناشی از جریان، در پروسه انتقال خللی ایجاد نکند. کاغذ PVDF در محلول

1. Complete Freund's adjuvant
2. Pertussis toxin
3. Saline

بالکر به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر در دمای محیط قرار گرفت. سپس شست و شو با TBST انجام شده و در ادامه کاغذ PVDF به مدت یک شبانه روز در آنتی بادی اولیه با رقت مناسب در یخچال قرار گرفت. روز بعد ۳ بار شست و شو با TBST انجام شد. سپس غشای PVDF در محلول آنتی بادی ثانویه با رقت مناسب به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. برای سنجش سطوح IL-6 و IL-10، دستگاه‌های مورد نیاز در این تکنیک از شرکت (Bio-Rad) بود.

روش آماری: برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک^۱ استفاده شد و برای بررسی همگن بودن واریانس‌ها از آزمون لون^۲ استفاده شد. در صورت تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای بررسی اختلاف در داده‌های بیوشیمیایی در بین گروه‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۵ و در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معناداری در میان‌وزن موش‌های گروه‌های مختلف در پژوهش حاضر وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱. تغییرات وزن موش‌ها بر حسب گرم (میانگین \pm انحراف استاندارد)

گروه‌ها	یک هفته قبل القا	روز القا	روز شروع علائم	دوره مزمن بیماری
کنترل	17/94 \pm 0/46	17/74 \pm ۶۰	19/70 \pm 0/91	20/33 \pm 0/95
EAE	17/58 \pm 0/39	17/71 \pm 0/47	18/20 \pm 0/59	17/81 \pm 0/65
تمرین شنا	17/80 \pm 0/69	17/71 \pm 0/47	17/68 \pm 1/10	18/96 \pm 1/78

تغییرات داده‌های مرتبط به نمرات بالینی حیوانات از روز شروع القای EAE تا ۲۸ روز پس از آن برای هر سه گروه (7 موش در هر گروه) به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد در جدول ۲ نشان داده شد. موش‌ها از روز ۱۳ بعد از القا، علائم بالینی نشان داده و این ارزیابی تا روز ۳۰ ادامه داشت (جدول ۲).

1. Shapiro Wilk
2. Leven

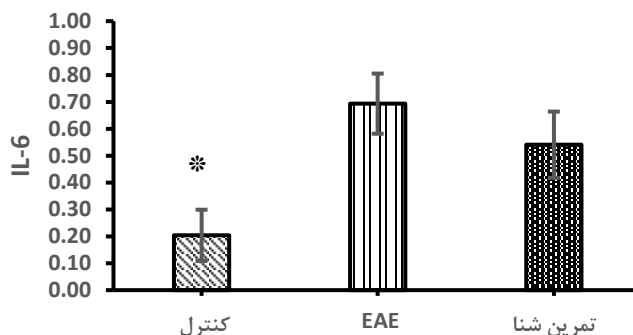
جدول ۲. تغییرات علائم بالینی موش ها از روز شروع علائم تا دوره ی مزمن بیماری (میانگین \pm انحراف استاندارد)

گروه‌ها	روز شروع علائم	دوره مزمن بیماری
کنترل	۰	۰
EAE	0/5 \pm 0/52	1/33 \pm 0/5
تمرین شنا	0/4 \pm 0/51	0/70 \pm 0/48

بر اساس آزمون شاپیروویلک، داده‌های حاصل از متغیرها در تمامی گروه‌ها، از توزیع طبیعی برخوردار بودند ($P > 0.05$). به همین ترتیب یافته‌های حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، در خصوص تحلیل داده‌های مربوط به IL-6 درون‌گروهی نشان داد که در میزان IL-6، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F_{1,18}=15/36$ ، $P = 0/004$ ، $\eta^2=0/83$) (نمودار ۱). بررسی تفاوت‌های درون‌گروهی با آزمون توکی، تفاوت معنی‌دار را بین مقادیر IL-6 گروه کنترل با گروه EAE ($P=0/004$) و نیز گروه تمرین شنا ($P=0/023$) نشان داد، اما بین دو گروه EAE و تمرین شنا ($P=0/28$) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۱).

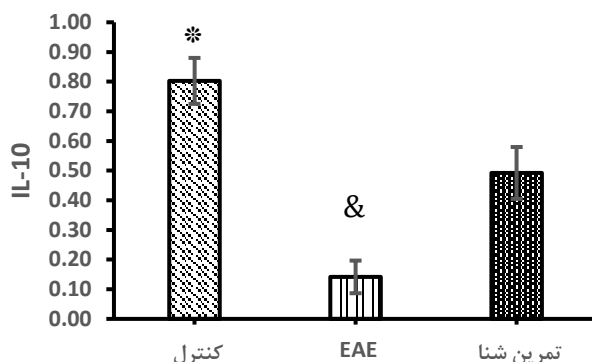
نمودار ۱. میانگین \pm انحراف استاندارد IL6 در سه گروه.

علامت * نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار گروه کنترل با گروه EAE و گروه تمرین شنا می‌باشد.



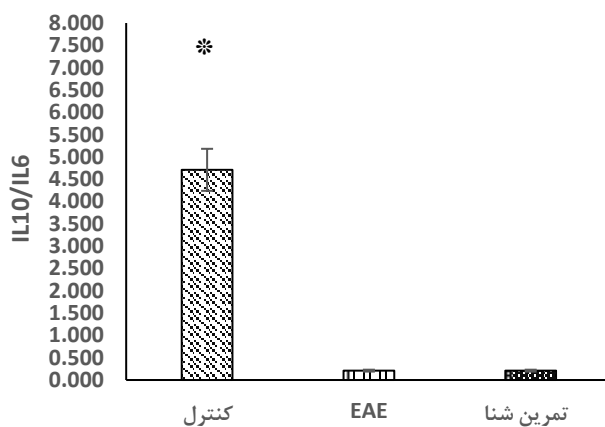
بر اساس یافته‌های حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، تحلیل داده‌های مربوط به IL-10 گروه‌های مختلف نشان داد که بین میزان IL-10 گروه‌های مختلف، در تحقیق تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F_{1,18}=58/97$) (نمودار ۲). بررسی تفاوت‌های درون‌گروهی با آزمون توکی، تفاوت معنی‌دار را بین مقادیر اینترلوکین-۱۰ گروه کنترل با گروه EAE ($P > 0/001$) و نیز گروه تمرین شنا ($P = 0/005$) نشان داد. همچنین بین دو گروه EAE و گروه تمرین شنا ($P = 0/003$) نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت (نمودار ۲).

نمودار 2. میانگین \pm انحراف استاندارد IL10 در سه گروه. علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه کنترل با گروه EAE و گروه تمرین شنا است. علامت & نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های EAE و گروه تمرین شنا است.



بر اساس یافته‌های حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، تحلیل داده‌های مربوط به مقادیر نسبت IL-10 و IL-6 گروه‌های مختلف نشان داد که بین مقادیر نسبت IL10/IL6 گروه‌های مختلف، در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F_{1,18} = 7/2, P = 0/3, \eta^2 = 0/10$) (نمودار 3). بررسی تفاوت‌های درون گروهی با آزمون توکی، تفاوت معنی‌دار را بین مقادیر نسبت IL10/IL6 گروه کنترل با گروه EAE ($P > 0/002$) نشان داد. اما بین دو گروه EAE و گروه تمرین شنا ($P = 0/008$) و گروه کنترل با تمرین شنا ($P = 0.05$) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار 3).

نمودار 3. میانگین \pm انحراف استاندارد IL10/IL6 در سه گروه. علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه کنترل با گروه EAE است.



بحث

تحقیق حاضر به بررسی تأثیر تمرین هوازی شنا بر سطوح سایتوکاین پیش التهابی IL-6 و سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 به عنوان فاکتورهای مرتبط با خستگی ذهنی ناشی از خستگی سایتوکاینی در بافت مغز موش های ماده مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی پرداخت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد موش ها پس از القا EAE از روز ۱۳ بعد از القا، علائم بالینی را تجربه کردند و ارزیابی علائم بالینی تا روز ۳۰ پس از القا ادامه یافت. در بین وزن موش های گروه های مختلف در پژوهش حاضر تفاوت معناداری دیده نشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، EAE منجر به افزایش سطح IL-6 و کاهش سطح IL-10 در موش های مدل نسبت به موش های سالم شدند و همچنین تمرین هوازی شنا به طرز معناداری سبب افزایش سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 در همه گروه ها شد. در سایتوکاین التهابی IL-6 تفاوت معناداری در سه گروه وجود داشت، اما تفاوت سطوح IL-6 و نسبت مقادیر IL10/IL6 در بین گروه تمرین شنا و EAE معنادار نبود. در واقع تمرینات شنا با شدت متوسط در جهت کاهش علائم پیش التهابی EAE، در پژوهش حاضر تأثیرگذار نبود.

مطالعات نشان داده اند، تمرین هوازی شنا بر تعدیل فاکتورهای التهابی در شرایط مختلف افراد تأثیرگذار است (۳۹). نقش تمرین هوازی شنا نسبت به سایر تمرینات برای بهبود علائم بیماری MS به عنوان روش درمانی غیرتهاجمی برای کاهش التهاب تایید شده است (۴۰).

اختلال ایمنی ایجاد شده سلول های Th^1 ، سبب تولید سایتوکاین های پیش التهابی مثل IL-6، IL-17، IL-18 شده و نقش اساسی در پیشرفت بیماری MS دارد (۴۱، ۴۲)، به طور کل خستگی در بیماری MS یک احساس ذهنی تلقی می شود که با میزان التهاب ارتباط مستقیم دارد (۱۰). سایتوکاین های پیش التهابی بعد از اتصال به سلول هدف، به عنوان مولکول پیام رسان سلولی، فعالیت زیستی سلول را به خطر می اندازند و از طریق مسدود کردن اعصاب واگ، سبب ایجاد التهاب بیشتر در نواحی خاص مغز می شوند (۱۰، ۴۳). در بیماری MS، افزایش سطح گیرنده های سایتوکاین های پیش التهابی و همچنین افزایش سطح پاسخ دهنی گیرنده ها، سبب ترویج التهاب در بیمار می شود (۴۴)، فرضیات ثابت می کند که قشر جلویی مغز^۱ (ACC) یک ساختار عصبی مهم در ارتباط با خستگی ذهنی در بیمار MS است که قابلیت بررسی بیشتر دارد (۱۰).

تغییرات IL-6 در ایجاد آسیب دیدگی در CNS حائز اهمیت است (۳۹). بررسی فاکتور IL-6 در جهت التهابی بودن باید در زمان استراحت و پس از فعالیت ورزشی صورت گیرد. این که چه مدت زمان برای استراحت و کاهش میزان IL-6 مفید، ناشی از ورزش مورد نیاز است هنوز مشخص نیست. با وجود کاهش معنی دار IL-6 در گروه های پژوهش حاضر، اما با توجه به عدم معنی داری تفاوت IL-6 در بین گروه های تمرین شنا و EAE، می توان عنوان کرد احتمالاً در تحقیق حاضر مدت زمان ۴۸ ساعت ریکاوری، جهت استراحت در موش های EAE کافی نبوده باشد، زیرا کاهش در IL-6

1 . Anterior Cingulate Cortex

نتیجه‌ی تمرین طولانی مدت، می‌تواند منعکس‌کننده‌ی تغییرات سوخت و ساز در بیماران MS باشد (۴۵). از طرفی تمرینات هوازی به تنهایی منجر به افزایش التهاب و سایتوکاین پیش التهابی می‌شوند که نیازمند دوره‌ی ریکاوری طولانی مدت تر است زیرا طبق مطالعات دوره‌ی ریکاوری پس از تمرینات به صورت طولانی تر سبب کاهش معنادار عوامل پیش التهابی در بین گروه‌ها می‌شود (۴۶). اسکولز و همکاران (۲۰۰۴) یکی از عوامل عدم تاثیرگذاری تمرین هوازی بر بیماران MS را تعداد کم نمونه عنوان کردند (۴۷)، بنظر می‌رسد در پژوهش حاضر نیز این موضوع حائز اهمیت بوده و قابل چشم‌پوشی نیست.

سطح IL-6 در حالت استراحت در بیماران MS نسبت به افراد عادی بالاتر است و همچنین ارتباط معناداری میان افزایش میزان IL-6 و افزایش علائم خستگی در بیماران MS وجود دارد (۴۸). افزایش تولید IL-6 سبب افزایش سایر عوامل پیش التهابی نیز می‌گردد (۲۶). همچنین ارتباط منفی میان افزایش سطح IL-6 و کاهش عوامل رشد عصبی وجود دارد (۴۹). تلاش دارو درمانی و فعالیت ورزشی در این جهت است که با ایجاد تغییر در پیام‌رسانی دستگاه سمپاتیک، تاثیر ضدالتهابی ایجاد کند (۴۴). اهمیت کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی مثل IL-6 نشان از سازگاری بدن به تمرینات ورزشی جهت ایجاد محیط ضدالتهابی است (۳۵).

برای تایید نتایج پژوهش حاضر، نونس و همکاران (۲۰۰۸)، با ۸ هفته تمرین شنا به مدت ۶۰ دقیقه و ۵ جلسه در هفته، بهبود و کاهش شاخص‌های پیش التهابی رادر بیماران MS گزارش کردند (۵۰). مطالعات مشابه نیز طی ۸ هفته و از هفته‌ی ۴ به بعد همزمان با افزایش IL-10، کاهش IL-6 را گزارش کردند و علائم خستگی در بیماران را بهبود بخشیدند (۳۹)، در واقع شدت تمرین باید به حدی باشد تا IL-6 را تحریک کند (۵۱). با این حال، در مطالعه‌ی حاضر تفاوت معناداری در سطح IL-6 بین دو گروه تمرین شنا و EAE مشاهده نشد که احتمالاً نشان از کافی نبودن طول مدت زمان تمرین و یا ازدیاد تعداد جلسات تمرین در شرایط EAE می‌باشد، زیرا در مطالعات مشابه ۳ جلسه در هفته برای کاهش IL-6 کافی گزارش شده است (۵۲). در برخی مطالعات تنها کاهش شاخص پیش التهابی را برای کاهش علائم در بیماری MS کافی گزارش کردند، زیرا عنوان کردند کاهش یا عدم تغییر فاکتور ضدالتهابی در این فرآیند به معنی تشدید علائم بیماری نیست (۵۳).

سایتوکاین‌های ضد التهابی مثل IL-10، $TGF\alpha$ ، $IFN\gamma$ جهت کاهش میزان التهاب و بهبود علائم بیماری MS تولید می‌شوند (۵۴، ۵۵). بر اساس مطالعات، بیماران MS با کمبود IL-10 مواجه هستند (۵۶). طبق برخی مطالعات تولید IL-10 در کاهش شدت علائم بیماری موثر است (۵۷) و رشد افزایش میزان IL-10 در بیماران MS نشان از بهبود روند بیماری می‌باشد (۵۷). IL-10 همچنین تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی را سرکوب می‌کند و بیان HLA را توسط مونوسیت کاهش می‌دهد (۵۸). از جمله عملکردهای درمانی در بیماری MS افزایش میزان IL-10 جهت مقابله با سایتوکاین‌های پیش التهابی مثل IL-6 و $TNF-\alpha$ است (۵۹)، همچنین میزان IL-10 با آمادگی جسمانی بیمار ارتباط مستقیم دارد (۶۰) که

افزایش آن منجر به افزایش میلین زایی در بیماران MS می‌شود (۴۰). طبق مطالعات فعالیت ورزشی هوازی با شدت کم تا متوسط و همچنین متناسب با توانایی بیمار MS به گونه‌ای که باعث تشدید علائم بیماری مثل گرما و خستگی نشود، موجب افزایش سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 می‌شود (۵۰). همسو با نتایج پژوهش حاضر، IL-10 پس از ۴ هفته تمرین هوازی شنا، در گروه تمرین شنا نسبت به گروه کنترل بیماران MS معنی دار بوده است که شاهدهی برای تایید مدت زمان کافی و نوع تمرین صحیح در کاهش فاکتورهای التهابی و بهبود علائم خستگی ذهنی در بیماران MS می‌تواند باشد (۵۰). هسن و همکاران (۲۰۰۳) عدم تغییر IL-10 طی ۸ هفته تمرین هوازی در بیماران MS را گزارش کردند و علت را طولانی بودن مدت زمان تمرین دانستند (۲۶، ۵۱). می‌توان نتیجه گرفت اگرچه مدت زمان ۴ هفته در ایجاد تغییر فاکتور پیش التهابی کافی نبود اما برای فاکتورهای ضدالتهابی و بهبود علائم خستگی ذهنی کافی به نظر می‌رسد.

فعالیت هوازی در کنار دارو درمانی با هدف کنترل عوامل التهابی منجر به بهبود شرایط بالینی در بیماران MS می‌شود (۶۱). برخی مطالعات نشان دادند که در بیماری MS، تعداد سلول‌های Treg که از افزایش عملکرد سیستم ایمنی جلوگیری می‌کنند، طبیعی هستند ولی از نظر عملکرد دارای نقص هستند، به طوری که قدرت سرکوب کمتری برای سایتوکاین‌های پیش‌التهابی دارند (۶۲). پس از این سو، ارتقا فعالیت سایتوکاین‌های ضد التهابی از جانب Th2 و سلول‌های Tregs می‌تواند راهبرد درمان بیماری MS باشد (۴۲) که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد.

یکی دیگر از مواردی که در کاهش میزان التهاب در مغز و در اثر ورزش تأثیرگذار است، تعدیل عملکرد HPA و افزایش پروتئین شوک حرارتی^۱ (HSP) است که نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی و التهابی دارد که می‌توان از مزایای اجرای فعالیت ورزشی هوازی در بیماران MS و تولید سایتوکاین‌های ضدالتهابی مثل IL-10 معرفی کرد (۶۳).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، می‌توان گزارش کرد تمرینات هوازی شنا از نظر درمانی در افراد MS می‌تواند یکی از عوامل جهت افزایش سطح فاکتور ضدالتهابی IL-10 باشد که از این جهت سبب کاهش میزان خستگی ذهنی در ناحیه ACC مغزی بیماران MS از نظر سلولی - مولکولی است و احتمالاً می‌تواند با دارودرمانی جهت افزایش سایتوکاین ضدالتهابی و بهبود شرایط سد خونی - مغزی بیمار MS رقابت کند، اما به نظر می‌رسد شرایط تمرین هوازی شنا در پژوهش حاضر، برای کاهش میزان فاکتور پیش التهابی مثل IL-6 در شرایط EAE مؤثر نبوده است.

از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم بررسی تأثیر انواع تمرینات بود، در این تحقیق تنها تأثیر تمرین هوازی در فاکتورهای التهابی در موش‌های EAE مورد بررسی قرار گرفت، احتمال داشت در صورت بررسی تمرین مقاومتی یا زندگی در محیط غنی شده بتوان در مقایسه با انواع تمرین، نتیجه متفاوتی به دست آورد؛ لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده انواع تمرینات مقاومتی، هم‌زمان یا زندگی در محیط غنی شده مورد بررسی قرار گیرد و نتایج با یکدیگر مقایسه شود. از دیگر

1 . Heat shock protein

محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به تعداد کم نمونه نیز اشاره کرد که توان گزارش نتیجه تحقیق را کاهش می‌دهد، بنابراین پیشنهاد می‌شود تعداد نمونه مورد بررسی در تحقیقات آینده افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی با توجه به نتایج پژوهش حاضر، تمرینات هوازی با شدت کم تا متوسط، طی ۴ هفته، اگرچه بر عامل ضد التهابی IL-10 به عنوان شاخص خستگی ذهنی ناشی از خستگی سایتوکاینی EAE موثر است، اما بر عامل پیش التهابی IL-6 و نسبت مقایر IL10/IL6 در EAE موثر نبوده است، همچنین طبق نتایج مطالعات همسو، به نظر می‌رسد تعداد جلسات ۵ نوبت در هفته برای شرایط EAE طولانی می‌باشد (۵۰). بنابراین تمرینات شنا با شدت و مدت در پژوهش حاضر، توانست عامل موثری در کاهش سایتوکاین ضد التهابی باشد، اگرچه در فاکتور پیش التهابی و نسبت سایتوکاینی موثر عمل نکرد.

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر حاصل بخشی از نتایج رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه تربیت مدرس است.

تعارض منافع: تعارض منافع وجود ندارد.

References

1. Reynolds ER, Ashbaugh AD, Hockenberry BJ, McGrew CA. Multiple sclerosis and exercise: a literature review. *Current sports medicine reports*. 2018;17(1):31-5. (DOI: 10.1249/JSR.0000000000000446)
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545-58. (doi.org/10.1038/nri3871)
3. Schreurs KM, de Ridder DT, Bensing JM. Fatigue in multiple sclerosis: reciprocal relationships with physical disabilities and depression. *Journal of psychosomatic research*. 2002;53(3):775-81. (doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00326-4)
4. Heesen C, Nawrath L, Reich C, Bauer N, Schulz K, Gold S. Fatigue in multiple sclerosis: an example of cytokine mediated sickness behaviour? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2006;77(1):34-9. (doi.org/10.1136/jnnp.2005.065805)
5. Mackworth NH. The breakdown of vigilance during prolonged visual search. *Quarterly journal of experimental psychology*. 1948;1(1):6-21. (doi.org/10.1080/17470214808416738)
6. Qi P, Ru H, Gao L, Zhang X, Zhou T, Tian Y, et al. Neural mechanisms of mental fatigue revisited: New insights from the brain connectome. *Engineering*. 2019;5(2):276-86. (doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.025)
7. Gentile A, Fresegna D, Federici M, Musella A, Rizzo FR, Sepman H, et al. Dopaminergic dysfunction is associated with IL-1 β -dependent mood alterations in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiology of disease*. 2015;74:347-58. (doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.022)
8. Fassbender K, Schmidt R, Mößner R, Kischka U, Kühnen J, Schwartz A, Hennerici M. Mood disorders and dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis: association with cerebral inflammation. *Archives of neurology*. 1998;55(1):66-72. (doi:10.1001/archneur.55.1.66)
9. Grasser A, Möller A, Backmund H, Yassouridis A, Holsboer F. Heterogeneity of hypothalamic-pituitary-adrenal system response to a combined dexamethasone-CRH test in multiple sclerosis. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 1996;104(01):31-7. (DOI: 10.1055/s-0029-1211419)
10. Hanken K, Eling P, Hildebrandt H. The representation of inflammatory signals in the brain—a model for subjective fatigue in multiple sclerosis. *Frontiers in neurology*. 2014;5:264. (doi.org/10.3389/fneur.2014.00264)

11. Kuratsune H, Yamaguti K, Lindh G, Evengård B, Hagberg G, Matsumura K, et al. Brain regions involved in fatigue sensation: reduced acetylcarnitine uptake into the brain. *Neuroimage*. 2002;17(3):1256-65. (doi.org/10.1006/nimg.2002.1260)
12. Siessmeier T, Nix W, Hardt J, Schreckenberger M, Egle U, Bartenstein P. Observer independent analysis of cerebral glucose metabolism in patients with chronic fatigue syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2003;74(7):922-8. (doi.org/10.1006/nimg.2002.1260)
13. Harrison NA, Brydon L, Walker C, Gray MA, Steptoe A, Dolan RJ, Critchley HD. Neural origins of human sickness in interoceptive responses to inflammation. *Biological psychiatry*. 2009;66(5):415-22. (doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.007)
14. Nishino S. Hypothalamus, hypocretins/orexin, and vigilance control. *Handbook of Clinical Neurology*. 2011;99:765-82. (doi.org/10.1016/B978-0-444-52007-4.00006-0)
15. Farrokhi M, Masoudifar A, Peykanpour F. Interleukin 17 and 10 in relapsing remitting multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;378:63. (doi.org/10.1016/j.jns.2017.04.044)
16. Langeskov-Christensen M, Bisson EJ, Finlayson ML, Dalgas U. Potential pathophysiological pathways that can explain the positive effects of exercise on fatigue in multiple sclerosis: a scoping review. *Journal of the neurological sciences*. 2017;373:307-20. (doi.org/10.1016/j.jns.2017.01.002)
17. Fan J-X. Mechanism of Farfarae Flos in Qingfei Paidu Decoction against COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2020;2317.۲۰-
18. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature reviews immunology*. 2011;11(9):607-15. (doi.org/10.1038/nri3041)
19. Mee-Inta O, Zhao Z-W, Kuo Y-M. Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation. *Cells*. 2019;8(7):691. (doi.org/10.3390/cells8070691)
20. White LJ, Castellano V, Mc Coy SC. Cytokine responses to resistance training in people with multiple sclerosis. *Journal of sports sciences*. 2006;24(8):911-4. (doi.org/10.1080/02640410500357036)
21. Frisullo G, Angelucci F, Mirabella M, Caggiula M, Patanella K, Nociti V, et al. Leptin enhances the release of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from relapsing multiple sclerosis patients. *Journal of clinical immunology*. 2004;24:287-93. (doi.org/10.1023/B:JOCI.0000025450.48267.a5)
22. Farrar JD, Murphy KM. Type I interferons and T helper development. *Immunology today*. 2000;21(10):484-9. ([doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01710-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01710-2))
23. Fehrenbach E, Niess AM, Voelker K, Northoff H, Mooren FC. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med*. 2005;26:552-7. ([DOI: 10.1055/s-2004-830334](https://doi.org/10.1055/s-2004-830334))
24. Majdinasab N, Nakhostin-Mortazavi A, Bahadoram M, Pouretezad M, Afraz P. Effect of Aquatic Therapy on Functional Balance in Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized Controlled Trial. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2016.۶-۱۳۰:
25. 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. (doi.org/10.1155/2016/6789276)
26. Mokhtarzade M, Ranjbar R, Majdinasab N, Patel D, Molanouri Shamsi M. Effect of aerobic interval training on serum IL-10, TNF α , and adipokines levels in women with multiple sclerosis: possible relations with fatigue and quality of life. *Endocrine*. 2017;57:262-71. (doi.org/10.1007/s12020-017-1337-y)
27. Hoseini SM, Falah Mohammadi Z, Talebi V. Preventive effect six weeks of swimming training on the levels of cytokines and brain-derived neurotrophic rat model of EAE. *Journal of Sport Biosciences*. 2020;12(1.۶۰-۰۲):((doi.org/10.22059/jsb.2019.246687.1223)
28. Lutz SE, Lengfeld J, Agalliu D. Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: recent advances in animal models and human clinical trials. *Regenerative medicine*. 2014;9(2):129-32. (doi.org/10.2217/rme.14.1)
29. Jacquet T, Poulin-Charronnat B, Bard P, Perra J, Lepers R. Physical activity and music to counteract mental fatigue. *Neuroscience*. 2021;478:75-88. (doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.09.019)
30. Einstein O, Katz A, Ben-Hur T. Physical exercise therapy for autoimmune neuroinflammation: Application of knowledge from animal models to patient care. *Autoimmunity Reviews*. 2022;21(4):103033. (doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103033)

31. Souza PS, Gonçalves ED, Pedrosa 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. (doi.org/10.1007/s12035-016-0014-0)
32. Mostert S, Kesselring J. Effects of a short-term exercise training program on aerobic fitness, fatigue, health perception and activity level of subjects with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2002;8(2):161-8. (doi.org/10.1191/1352458502ms779oa)
33. Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*. 1999;400(6743):418-9. (doi.org/10.1038/22682)
34. Motl RW, Snook EM, Schapiro RT. Symptoms and physical activity behavior in individuals with multiple sclerosis. *Research in nursing & health*. 2008;31(5):466-75. (doi.org/10.1002/nur.20274)
35. Vatandoust M, Motamedi P, Rajabi H, Ghadiri A, Nasirzadeh A, Vatandoust F, Yazdanpanah E, The Effect Of Four-Week Aerobic Activity In Water On Clinical Signs And TNF- α And IL-10 Cytokines In Animal Model Of Multiple Sclerosis (MS). 2018
36. Segal JP, Bannerman CA, Silva JR, Haird CM, Baharnoori M, Gilron I, Ghasemlou N. Chronic mechanical hypersensitivity in experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by disease severity and neuroinflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020;89:314-25. (doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.010)
37. 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. (doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577172)
38. Xie Y, Li Z, Wang Y, Xue X, Ma W, Zhang Y, Wang J. Effects of moderate-versus high-intensity swimming training on inflammatory and CD4+ T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Journal of neuroimmunology*. 2019;328:60-7. (doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.12.005)
39. Bezheh N, Soltani M, Khaleghzade H. Effects of aerobic training in water on IL-6 and IL-10 in patients with Multiple Sclerosis. *Evidence Based Care*. 2014;4(2):63-72.
40. Martire S, Navone ND, Montarolo F, Perga S, Bertolotto A. A gene expression study denies the ability of 25 candidate biomarkers to predict the interferon-beta treatment response in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2016;292:34-9. (doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.010)
41. Chen Y-C, Chen S-D, Miao L, Liu Z-G, Li W, Zhao Z-X, et al. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2012;243(1-2):56-60. (doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.12.008)
42. Etesam Z, Nemati M, Jafarzadeh A. The role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2016;15(3):257-80.
43. Moseley T, Haudenschild D, Rose L, Reddi A. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(2):155-74. ([doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00002-9))
44. Pullen PR, Nagamia SH, Mehta PK, Thompson WR, Benardot D, Hammoud R, et al. Effects of yoga on inflammation and exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2008;14(5):407-13. (doi.org/10.1016/j.cardfail.2007.12.007)
45. Castellano V, Patel DI, White LJ. Cytokine responses to acute and chronic exercise in multiple sclerosis. *Journal of Applied Physiology*. 2008;104(6):1697-702. (doi.org/10.1152/jappphysiol.00954.2007)
46. Cerqueira É, Marinho DA, Neiva HP, Lourenço O. Inflammatory effects of high and moderate intensity exercise—a systematic review. *Frontiers in physiology*. 2020;10:1550. (doi.org/10.1152/jappphysiol.00954.2007)
47. Schulz K-H, Gold SM, Witte J, Bartsch K, Lang UE, Hellweg R, et al. Impact of aerobic training on immune-endocrine parameters, neurotrophic factors, quality of life and coordinative function in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2004;225(1-2):11-8. (doi.org/10.1016/j.jns.2004.06.009)
48. Stringer EA, Baker KS, Carroll IR, Montoya JG, Chu L, Maecker HT, Younger JW. Daily cytokine fluctuations, driven by leptin, are associated with fatigue severity in chronic fatigue syndrome: evidence of inflammatory pathology. *Journal of translational medicine*. 2013;11(1):1-11. (doi.org/10.1186/1479-5876-11-93)

49. Lindquist S, Hassinger S, Lindquist JA, Sailer M. The balance of pro-inflammatory and trophic factors in multiple sclerosis patients: effects of acute relapse and immunomodulatory treatment. *Multiple Sclerosis Journal*. 2011;17(7):851-66. (doi.org/10.1177/1352458511399797)
50. Hooshmandi, Z., Koushki -Jahromi, M. Effect of Aerobic Exercise on Anti Inflammatory Cytokine(Interlukin- 10), Free Radical(Nitric Oxide), Fatigue and Quality of Life in Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Applied Exercise Physiology*, 2017; 13(25): 51-62. doi: 10.22080/jaep.2017.1587
51. Heesen C, Gold SM, Hartmann S, Mladek M, Reer R, Braumann K-M, et al. Endocrine and cytokine responses to standardized physical stress in multiple sclerosis. *Brain, behavior, and immunity*. 2003;17(6):473-81. ([doi. rg/10.1016/S0889-1591\(03\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(03)00077-1))
52. Kargarfard M, Etemadifar M, Baker P, Mehrabi M, Hayatbakhsh R. Effect of aquatic exercise training on fatigue and health-related quality of life in patients with multiple sclerosis. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2012;93(10):1701-8) .doi. rg/10.1016/j.apmr.2012.05.006
53. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*. 2000. (doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1055)
54. Avandi SM, Zahedi M. The effects of eight weeks' yoga training on serum levels of IL-17 in women with multiple sclerosis. *Journal of Sport and Exercise Physiology*. 2019;12(2):81-92. ([10.52547/JOEPPA.12.2.81](https://doi.org/10.52547/JOEPPA.12.2.81))
55. Hannestad J, Subramanyam K, DellaGioia N, Planeta-Wilson B, Weinzimmer D, Pittman B, Carson RE. Glucose metabolism in the insula and cingulate is affected by systemic inflammation in humans. *Journal of Nuclear Medicine*. 2012;53(4):601-7. (doi.org/10.2967/jnumed.111.097014)
56. Lim S-Y, Constantinescu CS. TNF- α : A paradigm of paradox and complexity in multiple sclerosis and its animal models. *The open autoimmunity journal*. 2010;2(1). (10. 174/1876894601002010160(
57. Abtahi Froushani SM, Delerezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. The Effects of Atorvastatin on the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and its Role in the Response of T-Helper Lymphocytes. *Journal of Isfahan Medical School*. 2012;30)188.
58. Bansi J, Bloch W, Gamper U, Kesselring J. Training in MS: influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013;19(5):613-21. (doi.org/10.1177/1352458512458605)
59. Gervasoni E, Cattaneo D, Jonsdottir J. Effect of treadmill training on fatigue in multiple sclerosis: a pilot study. *International journal of rehabilitation research*. 2014;37(1):54-60. ([DOI: 10.1097/MRR.0000000000000034](https://doi.org/10.1097/MRR.0000000000000034))
60. Shamsi MM, Chekachak S, Soudi S, Quinn L, Ranjbar K, Chenari J, et al .Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- α ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine*. 2017;90:100-8. (doi.org/10.1016/j.cyto.2016.11.005)
61. Vatandoust M, Zare-Banaadkouki A. The Effect of 4 Weeks of Voluntary Aerobic Activity along with Interferon Beta on Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Interleukin 10 (IL-10) in Mice Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Isfahan Medical School*. 2022;39(651):906-13. ([10.22122/JIMS.V39I651.14035](https://doi.org/10.22122/JIMS.V39I651.14035))
62. Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators of inflammation*. 2013;2013. (doi.org/10.1155/2013/963748)
63. Chobineh S, Moham G. The effect of four weeks of physical activity in the enriched environment on inflammatory and anti-inflammatory factors in the dorsal horn of the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2022;9(2):138-48. ([10.22049/JAHSSP.2022.27886.1481](https://doi.org/10.22049/JAHSSP.2022.27886.1481))