

Effect of Physical Activity on the Gene Expression of Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 and Arylalkylamine N-acetyltransferase in the Cerebellum of Female Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Samira Emadi¹, Shahnaz Shahrbanian², Mohammadreza Kordi³, Mahdieh Molanouri Shamsi⁴

1. Ph.D Student of Exercise Physiology, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1300-6757.

2. Associate Professor, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel: 021-82883652, Email: sh.shahrbanian@modares.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-3104-7584.

3. Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6507-6634.

4. Associate Professor, Department of Sport Science, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4665-5363.

ABSTRACT

Background and Aim: Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is associated with an overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and exacerbation of clinical symptoms. This study aimed to investigate the effect of physical activity on the gene expression of IDO1 and arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in the cerebellum of the mice with EAE.

Materials and Methods: 30 C57BL/6 mice were randomly divided into three groups of 10: healthy control, EAE control, and physical activity in the enriched environment. Mice were placed in an enriched environment after induction of EAE with MOG₃₅₋₅₅ for 4 weeks and then the cerebellum tissue was dissected and the expression of IDO1 and AANAT genes were measured by real time-PCR method in all three groups. Analysis of variance test was used for data analysis at a significance level of less than 0.05.

Results: The group with physical activity in an enriched environment showed significant reduction in the gene expression of IDO1 ($P = 0.02$) and AANAT ($P = 0.04$) genes, and also significantly reduced the clinical score ($P = 0.001$) compared to the EAE group.

Conclusion: Changing the environment and lifestyle in the enriched environment can prevent the progression of the autoimmune diseases such as MS, through downregulation of the expression of the IDO1 and AANAT genes.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1, Arylalkylamine N-acetyltransferase, Multiple sclerosis, Physical activity

Received: May 2, 2023

Accepted: Feb 15, 2023

How to cite the article: Samira Emadi, Shahnaz Shahrbanian, Mohammadreza Kordi, Mahdieh Molanouri Shamsi. Effect of Physical Activity on the Gene Expression of Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 and Arylalkylamine N-acetyltransferase in the Cerebellum of Female Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. SJKU 2024;29(2):12-23.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

تأثیر فعالیت بدنی بر بیان ژن ایندول آمین ۲، ۳-دی اکسیژنازا ۱ و آریل آلکیل آمین N- استیل ترانسفراز در مخچه موش‌های ماده مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

سمیرا عمادی^۱، شهناز شهربانیان^۲، محمدرضا کردی^۳، مهدیه مالنوری شمس^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. کد ارکید: ۶۷۵۷-۱۳۰۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰.

۲. دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: sh.shahrbanian@modares.ac.ir.

تلفن: ۸۲۸۸۳۶۵۲-۰۲۱، کد ارکید: ۷۵۸۴-۳۱۰۴-۰۰۰۳-۰۰۰۰.

۳. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۶۶۳۴-۶۵۰۷-۰۰۰۲.

۴. دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. کد ارکید: ۵۳۶۳-۴۶۶۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰.

چکیده

زمینه و هدف: القاء آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) با افزایش بیش از حد بیان ایندول آمین ۲، ۳-دی اکسیژنازا ۱ (IDO1) و تشدید علائم بالینی همراه است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان ژن IDO1 و آریل آلکیلامین N-استیل ترانسفراز (AANAT) در مخچه موش‌های مبتلا به EAE انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۰ موش C57BL/6 به طور تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی کنترل سالم، کنترل EAE و فعالیت در محیط غنی شده تقسیم شدند. پس از القاء EAE با MOG₃₅₋₅₅ به مدت ۴ هفته در محیط غنی شده قرار گرفتند و سپس بافت مخچه تشریح شد و بیان ژن‌های IDO1 و AANAT به روش Real Time-PCR در هر سه گروه اندازه‌گیری شد. از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: فعالیت در محیط غنی شده در مقایسه با گروه کنترل EAE بیان ژن IDO1 را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P = ۰/۰۲$)، بیان ژن AANAT را نیز به طور معنی‌داری کاهش داد ($P = ۰/۰۴$) و همچنین نمره بالینی را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P = ۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: تغییر محیط و سبک زندگی فعال در محیطی غنی شده می‌تواند از طریق تنظیم کاهشی بیان ژن‌های IDO1 و AANAT از پیشرفت بیماری اتو ایمن MS پیشگیری کند.

کلمات کلیدی: ایندول آمین ۲، ۳-دی اکسیژنازا ۱، آریل آلکیلامین N-استیل ترانسفراز، مالتیپل اسکلروزیس، فعالیت ورزشی

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۲/۱۲ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۸/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۲۴

مقدمه

مثالی اسکلروزیس (Multiple Sclerosis, MS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عصبی در بزرگسالان است که عمدتاً باعث میلین‌زدایی و تخریب سلول‌های سیستم اعصاب مرکزی می‌شود (۱). میزان شیوع این بیماری در جمعیت کلی جهان ۱/۰ درصد است (۲). بر طبق نتایج یک مطالعه متاآنالیز میزان شیوع و بروز بیماری MS در ایران به ترتیب ۲۹/۳ و ۳/۴ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است (۳)؛ بنابراین ایران جزو مناطق پرخطر از نظر ابتلاء به MS در جهان محسوب می‌شود. MS بین سنین ۲۰ الی ۴۰ سالگی بروز می‌کند و میزان شیوع آن در زنان تقریباً دو برابر بیشتر از مردان است (۱). علت‌شناسی این بیماری هنوز ناشناخته است؛ ولی عوامل ژنتیکی و محیطی به عنوان ریسک فاکتورهای اصلی در استعداد ابتلاء به این بیماری نقش دارند (۴).

انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) شبیه‌ترین مدل حیوانی بیماری MS به نمونه‌های انسانی است که به عنوان یک بیماری ناشی از عملکرد سلول‌های ایمنی تعریف می‌شود (۵). این سلول‌های ایمنی برای عملکرد بهینه به اسیدهای آمینه نیاز دارند. دسترسی مداوم سلول‌های ایمنی به اسیدهای آمینه به حفظ هومئوستاز سیستم ایمنی کمک کرده و از خود ایمنی پیشگیری می‌کند (۶). با التهاب، فعالیت سلول‌های ایمنی بیشتر می‌شود و تجزیه اسیدهای آمینه به منظور تأمین انرژی و نیازهای آنابولیک بیشتر افزایش می‌یابد (۶). تریپتوفان اسید آمینه ضروری در پستانداران است که نقش حیاتی در کنترل پاسخ ایمنی و سرکوب سیستم ایمنی در مدل‌های MS دارد. مسیر اصلی تجزیه تریپتوفان، کینورین است که توسط دو آنزیم ایندول آمین ۳،۲-دی اکسیژناز (-2,3-indoleamine dioxygenase¹, IDO¹) و تریپتوفان ۳،۲-دی اکسیژناز (tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO) تجزیه

می‌شود (۷). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که IDO1 و نه TDO در سرکوب سیستم ایمنی در برابر التهاب ایجاد شده به واسطه سلول‌های ایمنی نقش دارد (۸). IDO1 در سیستم اعصاب مرکزی بیان می‌شود و تبدیل سلول‌های T تنظیمی به سلول‌های T کمکی نوع ۱۷ را سرکوب می‌کند و تولید سایتوکاین‌های التهابی را مهار می‌کند (۹). تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که بیان بیش از حد IDO1 با افزایش تولید نورو توتوکسین‌ها همراه است و باعث تشدید شدت علائم EAE می‌شود (۱۰).

تریپتوفان علاوه بر مسیر کینورین، از طریق یک مسیر دیگر متابولیزه می‌شود و N-استیل سروتونین (N-acetylserotonin, NAS) را تولید می‌کند (۱۱). آریل آلکیلامین N-استیل ترانسفراز (acetyltransferase, AANAT) آنزیم سنتزکننده NAS است که به عنوان یک تنظیم کننده مثبت آنزیم IDO1 شناسایی شده است و عملکرد IDO1 را در سلول‌های دندریتیک به شدت تقویت می‌کند (۱۲). بیان ژن AANAT و به دنبال آن سنتز NAS در هسته سوپراکساماتیک هیپوتالاموس تحت ساعت شبانه‌روزی کنترل می‌شود. در تاریکی، هسته سوپراکساماتیک از طریق نوروهای سمپاتیک سیگنال‌هایی را به غده صنوبری می‌فرستد تا نوراپی نفرین را آزاد کند، سپس نوراپی نفرین گیرنده‌های آدرنرژیک را فعال می‌کند تا Ca^{2+} و cAMP داخل سلولی را افزایش دهد و به دنبال آن فسفوریلاسیون cAMP پروتئین اتصال دهنده عنصر پاسخ (CREB) را فعال می‌کند. CREB فسفریله شده از طریق CREB در قسمت پروموتور AANAT بیان ژن AANAT را فعال می‌کند. همچنین فسفوریلاسیون پروتئین AANAT را تحریک می‌کند و اتصال آن با پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ را تقویت می‌کند و آنزیم را فعال می‌کند و آن را از تخریب محافظت می‌کند. بر این اساس تغییر در بیان و فعالیت AANAT در سطوح NAS نقش دارد (۱۱).

IDO1 و AANAT در سلول‌های دندریتیک بیان می‌شوند و بر هم خوردن هومئوستاز ژن‌های تنظیم‌کننده ایمنی در سلول‌های دندریتیک در پاتوژنز بیماری MS نقش دارند (۱۵-۱۳). سلول‌های دندریتیک در بافت پارانشیم مغزی که شامل مخچه است در پاسخ به شرایط اتو ایمن فعالیت بیش‌ازحد دارند (۱۴). مخچه نیز از شایع‌ترین نواحی در بیماری MS است که مورد حمله قرار می‌گیرد. آسیب به مخچه می‌تواند منجر به بروز اختلالی در وضعیت بدن و عدم تعادل در ایستادن و راه رفتن و افزایش دفعات سقوط در طی جابه‌جایی شود و کیفیت زندگی بیماران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶).

اگرچه MS یک بیماری برگشت‌ناپذیر است که با اختلال حرکتی مزمن همراه است؛ اما راهکارهای درمانی برای کاهش تأثیر بیماری و بهبود کیفیت زندگی بیماران مورد توجه است. همچنین با توجه به افزایش رو به رشد تعداد مبتلایان به بیماری MS و نبود درمان دارویی با تأثیر قطعی و بالا بودن هزینه‌های درمان (۱۷)، به نظر می‌رسد روش‌های غیر دارویی از جمله انجام مداخلات ورزشی در تنظیم سیستم ایمنی و بهبود عملکرد جسمانی بیماران MS مؤثر باشد (۱۸). فعالیت ورزشی همانند مداخلات دارویی از طریق کاهش در تولید سلول‌های Th1 منجر به تغییر در تعادل نسبت Th2/Th1 و کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود علائم ثانویه از جمله درد و خستگی در بیماران مبتلا به MS می‌شود (۱۹). همچنین پژوهش‌ها بر روی مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند فعالیت ورزشی منجر به کاهش نفوذ سایتوکاین‌های التهابی و تخریب غلاف میلین و افزایش یکپارچگی سد خونی مغزی می‌شود (۲۰). تاکنون تحقیقات محدودی به بررسی تغییرات IDO1 در سیستم عصبی مرکزی به واسطه انجام فعالیت‌های ورزشی پرداخته‌اند. Liu و همکاران (۲۰۱۳) کاهش سطوح IDO1 را پس از تمرین هوازی منظم در مغز مدل‌های موش افسرده گزارش کردند (۲۱). Souza و همکاران (۲۰۱۷) همچنین نشان دادند سطوح IDO1 در مغز مدل‌های حیوانی بیماری عصبی

آلزایمر پس از تمرین هوازی منظم تعدیل می‌شود (۲۲). محیط غنی‌سازی شده نوعی فعالیت اختیاری است و شامل قفس‌های بزرگی است که پذیراتر بودن سیستم عصبی مرکزی برای درمان‌های دارویی نسبت به روش‌های تمرینی اجباری را به واسطه فراهم کردن تعامل اجتماعی با قرار دادن گروه بزرگی از موش‌ها درون هر قفس، مجهز کردن قفس‌ها به ویل رانینگ برای انجام فعالیت ورزشی و نیز فعالیت‌های حسی و شناختی با فراهم کردن تونل‌ها و فضاهای مختلف جهت ارتباط برقرار کردن موش‌ها به صورت همزمان فراهم می‌کند (۲۳). تاکنون هیچ مداخله ورزشی به بررسی تغییرات سطوح IDO1 در مغز مدل‌های حیوانی بیماری MS به عنوان یک عامل مؤثر در پاتوژنز این بیماری نپرداخته است و از آنجایی که تنظیم بیان ژن‌های سیستم ایمنی با انتخاب نوع مناسب فعالیت ورزشی می‌تواند نقش مهمی در کنترل علائم بالینی و پیشرفت بیماری داشته باشد، هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر زندگی در محیط غنی‌سازی شده بر علائم بالینی و بیان ژن‌های IDO1 و AANAT در بافت مخچه موش‌های ماده به EAE بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است. به منظور انجام این پژوهش تجربی، ۳۰ سر موش ماده با نژاد C57BL/6 و سن ۸ هفته و وزن 18 ± 2 گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و به مرکز اختلالات رفتاری و شناختی سالاری منتقل شد. به منظور سازگاری با شرایط جدید موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت چرخه تاریکی و روشنایی، دمای 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵ درصد به مدت یک هفته نگهداری شدند و به طور آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موش‌ها به طور تصادفی در ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و در نهایت، ۱۰ میلی‌لیتر الیگودندروسیت گلیکوپروتئین (MOG₃₅₋₅₅) (کنترل

بیمار (EAE)، ۲) تزریق سالین (کنترل سالم) و ۳) پس از القاء با MOG35-55 در محیط غنی شده قرار گرفتند (فعالیت در محیط غنی شده + EAE). با استناد به مطالعات پیشین در زمینه بررسی تأثیر فعالیت ورزشی در دوره مزمن بیماری در موش‌های مبتلا به EAE، ۳ گروه انتخاب شد (۲۴، ۲۲). کلیه اصول اخلاقی پژوهش حاضر مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت گردید و طرح تحقیق و کلیه مراحل آن توسط کارگروه اخلاق در پژوهش پژوهشگاه علوم ورزشی با شماره IR.SSRC.REC-1401-151 تأیید شد.

القاء MS به موش‌های ماده با نژاد C57BL/6 در مؤسسه اختلالات شناختی و رفتاری سالاری (کرج، ایران) انجام شد. مقدار ۵۰ میکروگرم پپتید MOG₃₅₋₅₅ با درجه خلوص ۹۵ درصد در ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline, PBS) و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ادجوانت فروند کامل (CFA) مخلوط شد و در ناحیه هر دو پهلو موش به صورت زیر جلدی تزریق شد. مقدار ۱۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه در حجم ۲۰۰ میکرولیتر PBS پپتید MOG₃₅₋₅₅ در همان روز و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۲۴، ۲۵). شروع بیماری و شدت بیماری بر اساس مقیاس پنجگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مقیاس نمره ۰ (بدون علائم بالینی و عدم بروز بیماری)، نمره ۱ (شروع بیماری، شل شدن دم)، نمره ۲ (شل شدن دم و ضعف اندام پشتی)، نمره ۳ (فلج اندام پشتی)، نمره ۴ (فلج کامل اندام پشتی و ضعف و یا فلج اندام جلویی) و نمره ۵ (مرگ) را نشان داد (۲۶). با توجه به مقیاس درجه‌بندی شده، چنانچه به هر یک از موش‌ها امتیاز ناتوانی ۱ تا ۵ داده می‌شد نشان دهنده ابتلا حیوان به بیماری بود. مطالعات پیشین جهت ارزیابی اختلالات نورولوژیک و تأیید مدل القاء EAE انجام شده، تنها از سیستم امتیازبندی بالینی EAE استفاده کردند (۲۸-۲۷، ۲۴، ۲۲). در اولین روز تا ۲۸ روز پس از القاء بیماری، علائم بالینی توسط دو ناظر بر اساس مقیاس درجه‌بندی فوق ثبت گردید.

موش‌ها پس از القاء EAE برای زندگی به قفسی با ابعاد (ارتفاع) ۱ متر × (عرض) ۱ متر × (طول) ۱ متر منتقل شدند. این قفس مجهز به ۳ ویل رانینگ، نردبان، اسباب بازی، بطری‌های آب، لوله‌های پلاستیکی و ظروف غذا بود و به مدت ۴ هفته در این قفس زندگی می‌کردند (۲۹). با استفاده از یک برد کامپیوتری، فعالیت موش‌ها و تعداد دورهای ویل‌رانینگ در قفس غنی شده ثبت شد. موش‌ها پس از ۲۸ روز فعالیت در محیط غنی شده با ترکیب کتامین هیدروکلراید (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس، حیوانات کشته شدند و مغز آن‌ها در نیتروژن مایع منجمد و تحت دمای منفی ۷۰ درجه سلیسیوس تا زمان اندازه‌گیری بیان ژن IDO1 و AANAT نگهداری شد.

به منظور بررسی کمی میزان mRNA ژن‌های مورد مطالعه از روش آزمایشگاهی Real time-PCR استفاده شد (۳۰). به منظور استخراج RNA، بافت مخچه با استفاده از دستگاه هموژنایزر به طور کامل هموژن شد و سپس مقدار مشخصی ترایزول (۱ میلی‌لیتر ترایزول به ازای ۵۰ الی ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت) اضافه گردید تا لیزات سلولی به دست آید. به ازای ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شده در مرحله اول، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه شد و ۱۵ ثانیه تکان داده شد تا مخلوط شوند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند و بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با دور ۱۲۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند. فاز شفاف رویی حاوی RNA جدا شد و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید. به میکروتیوب‌های حاوی فاز شفاف رویی ایزوپروپانول اضافه شد (۵۰۰ میکرولیتر به ازای ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه) و دو مرتبه میکروتیوب‌ها سر و ته شدند تا محتویات میکروتیوب‌ها مخلوط شوند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای فریزر منفی ۲۰ درجه انکوبه شوند. به منظور رسوب RNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با دور ۱۲۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند. سپس

اجزای مختلف PCR (۵ میکرولیتر سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فورواد، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر ریورز، ۳ میکرولیتر آب) تهیه شد و پس از میکس کردن و اسپین در مقادیر ۹ میکرولیتری داخل میکروتیوب‌های مخصوص دستگاه توزیع شد و در هر ویال یک میکرولیتر از نمونه cDNA مورد نظر اضافه گردید (حجم نهایی هر واکنش PCR ۱۰ میکرولیتر است). میکروتیوب‌های آماده حاوی واکنش PCR پس از میکس و ورتکس در دستگاه قرار داده شد و برنامه دمایی بررسی بیان ژن به ترتیب در طی مراحل دناتوراسیون اولیه، تکثیر، منحنی و کولینگ در دما و مدت زمان مشخص انجام شد. با این روش میزان بیان mRNA ژن‌های IDO1 و AANAT با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ سایبرگرین و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی است (CT) نسبت به CT مربوط به ژن GAPDH، به عنوان ژن کنترل با استفاده از روش $(2^{-\Delta\Delta CT})$ محاسبه شد. توالی mRNA کد دهنده هر ژن از پایگاه داده NCBI به دست آمد. طراحی پرایمر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار ژن رانر انجام شد. توالی پرایمر فورواد و ریورز هر یک از ژن‌های مورد مطالعه و ژن کنترل در جدول ۱ آورده شده است.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ تجزیه و تحلیل شدند. آزمون شاپیروویلک جهت بررسی چگونگی توزیع داده‌ها و آزمون لون جهت بررسی همگنی واریانس داده‌ها استفاده شد. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه ولش استفاده شد. با توجه به معنی‌دار شدن تفاوت بین گروه‌ها و با توجه به اینکه همگنی واریانس‌ها برقرار نبود از آزمون تعقیبی Games Howell استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس اندازه مکرر یک‌طرفه برای بررسی تغییرات نمره بالینی در طول دوره ۲۸ روزه استفاده شد. داده‌ها در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

محلول رویی تخلیه شد و رسوب‌ها با اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شدند به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به هر میکروتیوب اضافه شد و چند ثانیه ورتکس انجام شد تا رسوب کاملاً در اتانول شسته شود و ناخالصی‌ها جدا شدند. سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۷۵۰۰ RPM انجام شد. محیط رویی تخلیه شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستمال کاغذی استریل وارونه قرار داده شدند تا رسوب نیمه خشک شده و الکل تبخیر شود. پس از نیمه خشک شدن رسوب، مقدار ۲۰ الی ۳۰ میکرولیتر آب دپس یا عاری از RNase به هر میکروتیوب اضافه شده تا رسوب RNA در آن حل شود. برای حل شدن رسوب میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نمونه‌های استخراج شده در دمای منفی ۲۰ قرار داده شدند. جهت سنتز cDNA از کیت Easy cDNA synthesis (شرکت پارس، ایران) استفاده شد. در ابتدا تمام مواد کیت از دمای منفی ۲۰ درجه و نمونه‌های RNA از دمای منفی ۷۰ درجه خارج و پس از آب شدن به روی یخ منتقل شدند. تمامی مواد قبل از استفاده ورتکس کوتاه و اسپین شدند. جهت تهیه میکس RT، مواد لازم برای ساخت cDNA شامل بافر RT (۵ میکرولیتر)، آنزیم RT، پرایمر Oligo dT (۱ میکرولیتر) و آب دپس (۳ میکرولیتر) با یکدیگر مخلوط شده و سپس در حجم‌های ۹ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتر توزیع شدند. میکروتیوب‌های آماده شده حاوی RTm مخلوط و نمونه RNA در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد و برنامه دمایی مربوطه اجرا شد. نمونه‌های cDNA آماده شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت بررسی کمی تغییرات بیان ژن، ابتدا تمامی مواد لازم از فریزر در آورده شد و کمی ورتکس و سپس اسپین شدند و بر روی یخ نگهداری شدند. سپس برای هر ژن مخلوطی از

جدول ۱. توالی پرایمر ژن های مورد مطالعه. * نشان دهنده ژن کنترل است.

ژن	توالی پرایمر
IDO1	Forward: GCATCAAGACCCGAAAGCAC Reversed: CACGAAGTCACGCATCCTCT
AANAT	Forward: GATGGGGAAGCAGGAACAGA Reversed: CATTAACAAGTCCCGGCTCC
GAPDH *	Forward: GTTGTCTCCTGCGACTTCA Reversed: GGTGGTCCAGGGTTTCTTA

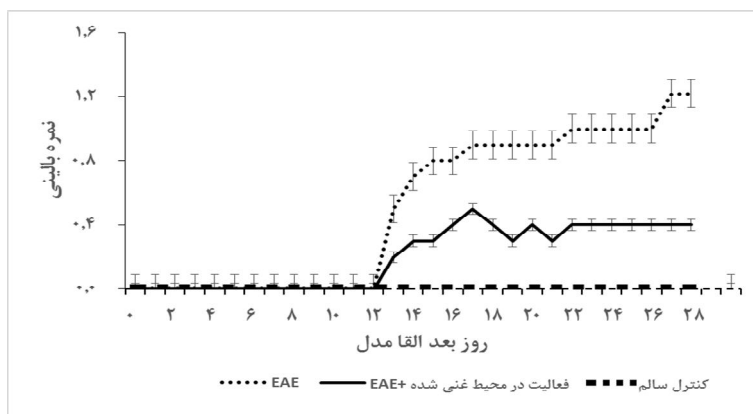
یافته ها

هر گروه (F = ۱۱۸۰/۱۵، P = ۰/۰۰۱). در مقابل، حیواناتی که در محیط غنی شده قرار گرفتند در روز ۱۳ ام شروع به نشان دادن علائم اولیه کردند (نمره بالینی = ۰/۲) و با اینکه تأخیری در بروز علائم بالینی را نشان ندادند؛ اما محافظت در برابر القاء بیماری و کاهش شدت نمره بالینی را نشان دادند به طوری که اوج نمره ۱۷ روز بعد القاء (نمره بالینی = ۰/۵) به دست آمد و ۳۰ روز بعد القاء نمره بالینی به ۰/۵ کاهش یافت (F = ۲۱/۲۸، P = ۰/۰۰۱). شکل ۱.

آمار توصیفی نمره بالینی و وزن بدن حیوانات برای هر یک از گروه های مورد مطالعه قبل از اعمال مداخله تمرینی، در روز مشهود شدن علائم بالینی (۱۲ روز بعد القاء) و در دوره مزمن بیماری (۲۸ روز بعد القاء) در جدول ۲ نشان داده شده است. علائم بالینی مانند شل شدن دم و راه رفتن ناشیانه ۱۳ روز بعد از القاء EAE ظاهر شد (نمره بالینی = ۰/۵). ظهور علائم بالینی روند افزایشی نشان داد به طوری که در ۲۸ روز بعد القاء به اوج خود رسید (نمره بالینی = ۱/۳، ۱۰ موش در

جدول ۲. آماره های توصیفی مربوط به نمره رفتاری و وزن بدن حیوانات در گروه های مورد مطالعه. EAE: گروه کنترل بیمار

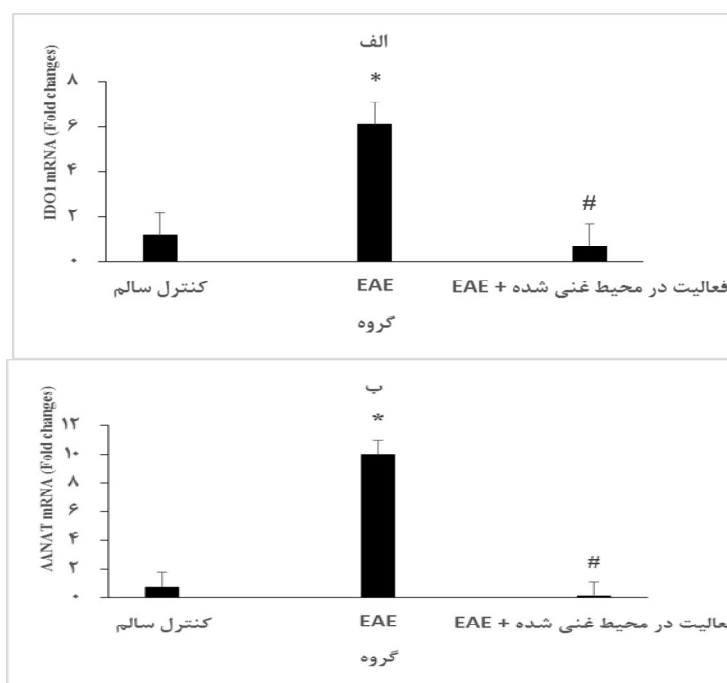
گروه ها	متغیرها	شروع علائم بالینی	دوره مزمن بیماری
		انحراف استاندارد ± میانگین	انحراف استاندارد ± میانگین
EAE	نمره بالینی	۰/۵۶ ± ۰/۵۳	۱/۳۳ ± ۰/۵۵
	وزن بدن (گرم)	۱۸/۲۰ ± ۰/۵۹	۱۷/۸۱ ± ۰/۶۵
EAE + محیط غنی سازی شده	نمره بالینی	۰/۲۰ ± ۰/۴۲	۰/۵۲ ± ۰/۵
	وزن بدن (گرم)	۱۹/۸۲ ± ۰/۹۳	۲۲/۱۹ ± ۰/۹۱
کنترل سالم	وزن بدن (گرم)	۱۹/۷۰ ± ۰/۹۱	۲۰/۳۳ ± ۰/۹۵
	نمره بالینی	-----	-----



شکل ۱. سیر پیشرفت بیماری طی ۲۸ روز بعد القاء مدل. EAE: گروه کنترل بیمار.

در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت بود ($F = ۵/۷۹$ و $P = ۰/۰۰۹$). به طوری که افزایش معنی‌دار بیان ژن AANAT در گروه کنترل بیمار EAE در مقایسه با گروه کنترل سالم در بافت مخچه مشاهده شد ($P = ۰/۰۵$) و فعالیت در محیط غنی شده بیان ژن AANAT را در مقایسه با گروه کنترل بیمار EAE به طور معنی‌داری کاهش داد ($P = ۰/۰۴$). شکل ۲.ب.

بیان ژن IDO1 در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت بود ($F = ۱۶/۵۵$ و $P = ۰/۰۱$). به طوری که افزایش معنی‌دار بیان ژن IDO1 در گروه کنترل بیمار EAE در مقایسه با گروه کنترل سالم در بافت مخچه مشاهده شد ($P = ۰/۰۳۳$) و در حالی که فعالیت در محیط غنی شده بیان ژن IDO1 را در مقایسه با گروه کنترل بیمار EAE به طور معنی‌داری کاهش داد ($P = ۰/۰۲۵$). شکل ۲.الف. همچنین بیان ژن AANAT



شکل ۲. الف) بیان ژن ایندول آمین ۲،۳-دی اکسیژنازا ۱ (IDO1). ب) بیان ژن آرل آلکیل آمین N-استیل ترانسفراز (AANAT) در بافت مخچه. EAE: گروه کنترل بیمار. * نشان دهنده $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل سالم است. # نشان دهنده $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل بیمار است.

بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان ژن‌های IDO1 و AANAT در بافت مخچه موش‌های ماده مبتلا به EAE انجام شد. مطالعه حاضر نشان داد فعالیت بدنی در محیط غنی‌سازی شده بیان ژن‌های IDO1 و AANAT را در مخچه موش‌های ماده مبتلا به EAE به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و نمره بالینی و وزن بدن حیوانات با فعالیت در محیط غنی‌سازی شده بهبود می‌یابد. مطالعه حاضر نشان داد که القاء EAE باعث بروز علائم بالینی می‌شود که بر اساس مقیاس درجه‌بندی شده نمره بالینی تعیین شد. مطابق با پیشینه تحقیقات، القاء EAE در موش‌ها با بروز علائم بالینی همراه است (۲۵)؛ بنابراین، یافته‌های ما با موفقیت اختلالات حرکتی مشاهده شده در بیماران مبتلا به MS (۳۱) و مدل‌های موش MS (۲۵) را تأیید می‌کند. سبک زندگی فعال در محیط غنی‌سازی شده از افزایش بروز علائم بالینی مشاهده شده در حیوانات پیشگیری کرد و در مقابله با اثرات مضر القاء EAE مفید بود. مطالعات ورزشی عمدتاً با تمرکز بر روی خواص تعدیل‌کننده ایمنی به بررسی مکانیسم‌های احتمالی اصلی مداخلات پس از القاء بیماری پرداختند. دویدن اختیاری روی چرخ دوار با کاهش شدت بیماری همراه است؛ اما نتایج متضادی درباره عملکرد تعدیل‌کننده سیستم ایمنی بیان شده است. Paul و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که فعالیت اختیاری می‌تواند نفوذ سلول‌های ایمنی به نخاع موش‌های مبتلا به EAE را کاهش دهد و همچنین فعالیت عصبی غیرطبیعی در نخاع را کاهش دهد و علائم ثانویه بالینی در موش‌های مبتلا به EAE را کاهش دهد (۱۴). Mifflin و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند فعالیت اختیاری در کاهش علائم بالینی و التهاب سیستم عصبی مرکزی در موش‌های نر مؤثر بود؛ اما تأثیر کمی بر موش‌های ماده مبتلا به EAE داشت (۳۲). برعکس، گروهی دیگر علیرغم بهبود دوره بیماری، هیچ تغییری در نفوذ سلول‌های ایمنی در سیستم عصبی مرکزی موش‌های مبتلا به EAE به دنبال

فعالیت روی چرخ دوار که بعد از القاء EAE آغاز شد، گزارش نکردند (۳۳). یافته‌های مطالعه حاضر این یافته‌های قبلی را که فعالیت بدنی توسعه EAE را در موش‌های C57BL/6 کاهش می‌دهد حمایت می‌کند. این بهبودها در نمره بالینی ناشی از بیماری به تنظیم فاکتورهای مؤثر در سیستم ایمنی و مهار تولید شاخص‌های التهابی در سیستم عصبی مرکزی نسبت داده می‌شود (۲۲).

تریپتوفان اسید آمینه ضروری است که تجزیه آن در شرایط پاتولوژیک EAE افزایش می‌یابد و توسط دو مسیر جداگانه متابولیزه می‌شود. تریپتوفان عمدتاً توسط آنزیم کلیدی IDO1 به کینورنن متابولیزه می‌شود. شواهد نشان می‌دهند که IDO1 نقش حیاتی در پاتوزن EAE دارد (۸). در مطالعه حاضر، القاء EAE باعث افزایش بیان ژن IDO1 در بافت مخچه شد؛ ولی زندگی در محیط غنی‌سازی شده بیان ژن IDO1 را در مغز موش‌ها کاهش داد. نتایج ما با مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد که محققان در آن گزارش کردند ۴ هفته تمرین شنا به طور منظم سطوح شاخص‌های التهابی اینترفرون گاما (γ -IFN) و فاکتور نکروز توموری آلفا (α -TNF) را کاهش می‌دهد و متعاقباً IDO1 را در ناحیه قشر مغزی رت‌ها کاهش می‌دهد و افسردگی ناشی از استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی را بهبود می‌بخشد (۲۱). همچنین در مطالعه Souza و همکاران (۲۰۱۷) بیان شده است که سطوح شاخص‌های التهابی و IDO1 در ناحیه قشر جلو مغزی و هیپوکمپ مدل‌های موش بیماری عصبی آلزایمر پس از ۸ هفته تمرین شنا کاهش می‌یابد (۳۴). از آنجائی که بیان ژن IDO1 توسط سایتوکاین‌های پیش التهابی همانند γ -IFN و α -TNF تحریک می‌شود (۳۵) به نظر می‌رسد سبک زندگی فعال و زندگی در محیط غنی‌سازی شده با تعدیل سطوح عوامل التهابی در مغز منجر به تنظیم کاهشی بیان ژن IDO1 در مغز موش‌های EAE شده باشد و احتمالاً اثر محافظتی در مغز داشته باشد؛ زیرا بر اساس پیشینه تحقیقات IDO1 به صورت یک شمشیر دو لبه عمل می‌کند

بدن حیوانات می‌شود. غیر دارویی بودن این مداخله و بالطبع هزینه کمتر و عدم عوارض جانبی آن از نقاط قوت مطالعه حاضر است. عدم اندازه‌گیری سایتوکاین‌های التهابی و NAS از محدودیت‌های مطالعه حاضر است. به کارگیری دیگر مدل‌های مداخلات فیزیکی و ورزشی همانند فعالیت‌های بدنی مداوم هوازی، قدرتی، تمرین در آب و بررسی تغییرات متغیرهای وابسته این پژوهش از پیشنهادهایی است که می‌توان به آن اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

سبک زندگی فعال و زندگی در محیط غنی شده بیان ژن‌های دخیل در ایمنی همانند IDO1 و AANAT را تنظیم می‌کند و شدت علائم بالینی را کاهش می‌دهد و در نتیجه نشان دهنده یک مداخله مهم غیر دارویی برای بهبود علائم بالینی بیماری‌های ناشی از سیستم ایمنی مانند MS است.

تشکر و قدردانی

این مقاله ماحصل بخشی از یافته‌های رساله‌ی دانشجوی دکتری در گروه علوم ورزشی دانشکده علوم انسانی دانشگاه تربیت مدرس است (کد اخلاق: IR.SSRC.REC-1401-151) که در سال ۱۴۰۱ در موسسه اختلالات رفتاری و شناختی سالاری و شرکت هیستون پاسارگارد انجام شد. بخشی از هزینه‌های این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و بخشی دیگر توسط نویسنده اول تأمین شده است. نویسندگان این پژوهش اعلام می‌کنند که هیچ گونه تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند. بر خود لازم می‌دانیم از همکاری صمیمانه تمامی کسانی که ما را در مراحل مختلف اجرای این پژوهش یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری نماییم.

به طوری که افزایش IDO1 در مدل EAE منجر به کاهش روند التهاب عصبی و بهبود EAE می‌شود و به عنوان یک پاسخ خود محافظتی عمل می‌کند (۳۶) در حالی که بیان بیش از حد IDO1 منجر به تولید بیشتر متابولیت‌های نوروتوکسیک نسبت به متابولیت پروتکتیو می‌شود و اثرات تخریبی در سیستم عصبی مرکزی به همراه دارد (۱۰).

تریپتوفان از طریق یک مسیر متابولیکی دیگر نیز متابولیزه می‌شود که به طور متوالی سروتونین، NAS و ملاتونین تولید می‌کند. بیان ژن AANAT، به واسطه افزایش نورآدرنالین از طریق مکانیسم cAMP افزایش می‌یابد. قرار گرفتن در معرض نور با کاهش cAMP منجر به دفسفوریلایسیون و پروتئولیز پروتئین AANAT می‌شود که این تجزیه بلافاصله منجر به کاهش NAS می‌شود (۱۱). در مطالعه حاضر برنامه تمرینی حیوانات در چرخه بیداری انجام می‌شد و کشتار حیوانات در بین ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر انجام شد به نظر می‌رسد قرار گرفتن حیوانات در چرخه بیداری و در معرض روشنایی روز در این بازه زمانی علت کاهش بیان ژن AANAT باشد. مطالعاتی نیز به بررسی تغییرات سطوح نوراپی نفرین پس از فعالیت‌های ورزشی پرداخته‌اند. به عنوان مثال Dunn و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که سطوح نوراپی نفرین در مغز رت‌ها پس از ۸ هفته تمرین هوازی دوییدن روی تردمیل و یا ویل رانینگ افزایش می‌یابد (۳۷). سطوح کاتکلامین‌ها با تحریک محور HPA و سیستم عصب سمپاتیک در طی ورزش در سطح فیزیولوژیک افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی با تعدیل افزایش غلظت نورآدرنالین باعث تنظیم کاهشی بیان ژن ANNAT شده باشند.

از یافته‌های کاربردی مطالعه حاضر می‌توان به سبک زندگی فعال و فعالیت در محیط غنی‌سازی شده در بیماری MS اشاره نمود. فعالیت در محیط غنی‌سازی شده با تنظیم ژن‌های دخیل در پاتوژنز بیماری MS از پیشرفت بیماری MS پیشگیری می‌کند و باعث بهبود وضعیت بیماری و وزن

منابع

1. Bert A, Luchicchi A, Schenk GJ, Killestein J, Geurts JJ. Multiple sclerosis and drug discovery: A work of translation. *EBioMedicine*. 2021;68:103-392.
2. Khftan P, Vameghi R, Khankeh HR, Fathi M, Arshi M, Gholami Jam F. Exploring therapeutic problems in women with Multiple Sclerosis: A qualitative study. *JQRHS*. 2020;6(1):13-21.
3. Azami M, YektaKooshali MH, Shohani M, Khorshidi A, Mahmudi L. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2019;14(4):e0219466.
4. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(9):1905-22.
5. Martin R, McFarland HF, Boggs J. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1995;32(2):121-82.
6. Correale J. Immunosuppressive amino-acid catabolizing enzymes in multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2021;11:600428.
7. Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(8):609-20.
8. Yan Y, Zhang G-X, Gran B, Fallarino F, Yu S, Li H, et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2010;185(10):5953-61.
9. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, et al. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol*. 2009;183(4):2475-83.
10. Heyes MP, Saito K, Chen CY, Proescholdt MG, Nowak Jr TS, Li J, et al. Species heterogeneity between gerbils and rats: quinolinate production by microglia and astrocytes and accumulations in response to ischemic brain injury and systemic immune activation. *J Neurochem*. 1997;69(4):1519-29.
11. Tosini G, Ye K, Iuvone PM. N-acetylserotonin: neuroprotection, neurogenesis, and the sleepy brain. *Neuroscientist*. 2012;18(6):645-53.
12. Mondanelli G, Coletti A, Greco FA, Pallotta MT, Orabona C, Iacono A, et al. Positive allosteric modulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 restrains neuroinflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(7):3848-57.
13. Uz T, Qu T, Sugaya K, Manev H. Neuronal expression of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) mRNA in the rat brain. *Neurosci Res*. 2002;42(4):309-16.
14. D'Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K. *Acta Neuropatho*. 2012;124(5):599-614.
15. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2, 3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002;196(4):447-57.
16. Parmar K, Stadelmann C, Rocca MA, Langdon D, D'Angelo E, D'Souza M, et al. The role of the cerebellum in multiple sclerosis—150 years after Charcot. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;89:85-98.
17. Amiri M. Multiple sclerosis in Iran: An epidemiological update with focus on air pollution debate. *J Clin Transl Res*. 2021;7(1):49-60.
18. Dorans KS, Massa J, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Physical activity and the incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2016;87(17):1770-6.
19. Lozinski BM, Yong VW. Exercise and the brain in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2022;28(8):1167-72.
20. Quchan AHSK, Kordi MR, Namdari H, Shabkhiz F. Voluntary wheel running stimulates the expression of Nrf-2 and interleukin-10 but suppresses interleukin-17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett*. 2020;738:1353-82.
21. Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav Brain Res*. 2013;242:110-6.
22. 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. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4723-37.

23. Silva BA, Ferrari CC. Environmental enrichment as a promising strategy for aiding multiple sclerosis treatment. *Neural Regen Res.* 2020;15(9):1660-61.
24. 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. *JAHSSP.* 2022;9(2):138-48.
25. 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 Behav Immun.* 2020;89:314-25.
26. Mangalam A, Shahi SK, Luckey D, Karau M, Marietta E, Luo N, et al. Human gut-derived commensal bacteria suppress CNS inflammatory and demyelinating disease. *Cell Rep.* 2017;20(6):1269-77.
27. Samani SA, Moloudi MR, Ramezanzadeh R, Abdi M, Nikkhoo B, Izadpanah E, et al. Oral Administration of Probiotic *Enterococcus durans* to Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Basic Clin Neurosci.* 2022;13(1):35-46.
28. Shahidi SH, Kordi MR, Rajabi H, Malm C, Shah F, Quchan ASK. Exercise modulates the levels of growth inhibitor genes before and after multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;341:577172.
29. Fournier AP, Baudron E, Wagnon I, Aubert P, Vivien D, Neunlist M, et al. Environmental enrichment alleviates the deleterious effects of stress in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2020;6(4):2055217320959806.
30. Zarzecki MS, Cattelan Souza L, Giacomeli R, Silva MRP, Prigol M, Boeira SP, et al. Involvement of Indoleamine-2, 3-Dioxygenase and Kynurenine Pathway in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Neurochem Res.* 2020;45(12):2959-77.
31. da Silva CC, Bichuetti DB, de Azevedo Silva SMC, Ferraz HB, de Oliveira EML, Borges V. Movement disorders in multiple sclerosis and neuromyelitis optica: A clinical marker of neurological disability. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018;51:73-8.
32. Mifflin KA, Yousuf MS, Thorburn KC, Huang J, Pérez-Muñoz ME, Tenorio G, et al. Voluntary wheel running reveals sex-specific nociceptive factors in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pain.* 2019;160(4):870-81.
33. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Musella A, Giudice TL, Mataluni G, et al. Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis.* 2009;36(1):51-9.
34. Souza LC, Jesse CR, Del Fabbro L, de Gomes MG, Goes ATR, Borges Filho C, et al. Swimming exercise prevents behavioural disturbances induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- β 1-42 peptide through modulation of cytokine/NF-kappaB pathway and indoleamine-2, 3-dioxygenase in mouse brain. *ehav Brain Res.* 2017;331:1-13.
35. Kwidzinski E, Bechmann I. IDO expression in the brain: a double-edged sword. *JJ Mol Med.* 2007;85(12):1351-9.
36. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(1):64-82.
37. Dunn AL, Reigle TG, Youngstedt SD, Armstrong RB, Dishman RK. Brain norepinephrine and metabolites after treadmill training and wheel running in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(2):204-9.