

Voluntary Exercise Reduces Oxidative Stress and Disease Severity in Mice with Multiple Sclerosis

Amir Hossein Saffar Kohneh Quchan¹, Mohammad Reza Kordi²,
Fatemeh Shabkhiz³

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: amirsaffar@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: mrkordi@ut.ac.ir
3. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shabkhiz@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research

Article history:

Received:

29 August 2021

Received in revised form:

13 January 2022

Accepted:

8 February 2022

Published online:

20 February 2023

Keywords:

EAE,

Nrf2,

voluntary wheel running,

Xanthine oxidase.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress and the production of Reactive Nitrogen (RNS) and Oxygen (ROS) Species play an important role in the pathogenesis and the progression of MS. This study aimed to investigate the effect of exercise on disease severity, NRF2 protein levels, and xanthine oxidase enzyme in the spinal cord during the chronic period of the disease.

Methods: Thirty female C57Bl/6 mice (6-8 weeks) were divided into three Voluntary Exercise, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), and Healthy Control groups. After induction of EAE by Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) and after the mice showed a clinical score of one for two consecutive days, they performed one hour of voluntary exercise for four weeks and five days a week. Forty-eight hours after the last training session, the mice were anesthetized with Ketamine and Xylazine, and the spinal cord tissue was removed. The location of NRF2 proteins in the gray and white matter of the spinal cord was investigated by Immunohistochemistry, and xanthine oxidase was measured by xanthine oxidase assay kit according to the kit manufacturer's instructions and by ELISA method.

Results: Voluntary exercise increased NRF2 protein levels in the white matter (P=0.0001) and gray matter (P=0.0001) of the spinal cord and decreased xanthine oxidase levels in the spinal cord (P=0.001), and attenuated disease severity during the chronic period (P=0.01).

Conclusion: Voluntary exercise reduces oxidative stress and disease severity during the chronic period of the disease and would be a good strategy for controlling and treatment of MS disease.

Cite this article: Saffar Kohneh Quchan AH., Kordi MR & Shabkhiz F. Voluntary Exercise Reduces Oxidative Stress and Disease Severity in Mice with Multiple Sclerosis. *Journal of Sport Biosciences*. 2022; 14 (4): 5-18.

DOI: <https://doi.org/10.22059/jsb.2022.329699.1485>



© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuroinflammatory disease of the central nervous system that causes disability in young adults, especially in women. The primary event in the pathogenesis of MS is the infiltration of highly proinflammatory leukocytes, especially TH1 and TH17 cells, into the CNS and the production of interferon-gamma (IFN- γ) and IL-17A. This increase in inflammatory reactions increases the permeability of the blood-brain barrier and causes more penetration of B cells and monocytes into the CNS. These processes are associated with activating macrophages and microglia residing in the CNS and releasing more inflammatory cytokines and chemokines. In addition, activated macrophages and microglia in CNS lesions express enzymes involved in oxidative stress such as NADPH oxidase (NOX), inducible nitric oxide synthase (iNOS), xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) and increase ROS production and oxidative stress. Evidence shows that oxidative stress plays an important role in the progression and development of MS by increasing the destruction of the blood-brain barrier, damage to mitochondria, and the further increase of inflammatory cytokines with the activation of NF κ B. Many clinical studies have shown the beneficial effects of physical activity and exercise on improving walking, fatigue, depression, and quality of life in people with MS. Also, regular exercise increases neurotrophins, anti-inflammatory factors, and neurogenesis. It also reduces inflammation, oxidative stress, and the destruction of the myelin sheath, and prevents disease progression. The optimal effect of exercise on neurological diseases depends on its type, intensity, and duration. Voluntary exercise is an activity whose intensity and duration are under the control of the individual, and therefore less stress is introduced, which can be more enjoyable for the patients. Evidence Strongly shows that voluntary exercise can

effectively reduce clinical symptoms in neurological diseases, but the mechanism of its effect has not yet been fully determined. Considering the importance of NRF2 and oxidative stress in the progression and development of MS disease and the different effects of the type and intensity of activity in MS and EAE, this study aimed to investigate the effect of four weeks of voluntary exercise on the NRF2 and XO levels in the spinal cord of C57BL/6 mice with EAE in the chronic period of the disease (30 days after induction of EAE).

Methods

Thirty female C57Bl/6 mice (6-8 weeks) were divided into three Voluntary Exercise, EAE, and Healthy Control groups. After induction of EAE by MOG35-55 and after the mice showed a clinical score of one for two consecutive days, they performed one hour of voluntary exercise for four weeks and five days a week. Forty-eight hours after the last training session, the mice were anesthetized with ketamine and xylazine, and their spinal cord tissues were removed. The location of NRF2 proteins in the gray and white matter of the spinal cord was investigated by immunohistochemistry, and xanthine oxidase was measured by xanthine oxidase kit assay according to the kit manufacturer's instructions by ELISA method.

Results

Voluntary exercise increased NRF2 protein levels in the white matter (P=0.0001) and gray matter (P=0.0001) of the spinal cord and decreased xanthine oxidase levels in the spinal cord (P=0.001), and attenuated disease severity in the chronic period (P=0.01). The clinical scores of the groups on the day of onset of symptoms and the chronic period of the disease are presented in Table 1.

Table 1. The clinical scores of the groups on the day of onset of symptoms and the chronic period of the disease

Groups	Day 10 post-induction (onset of symptoms)	Day 30 post-induction (chronic period of disease)
EAE	0.57(0-1)	1.71(1-2)
Voluntary Exercise	0.60(1-2)	0.60(0-2)

Conclusion

In this study, it was shown that voluntary exercise, reduced the oxidative stress caused by the induction of EAE in the chronic period of the disease, regardless of the intensity and duration; however, more research is needed to decide on the appropriate type, intensity, and duration of exercise in MS patients.

Ethical Considerations:

This study was approved by the research ethics committee of the University of Tehran

Funding:

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

Authors' contribution:

Amir Hossein Saffar Kohneh Quchan: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing the original draft. **Mohammad Reza Kordi:** Project administration, Supervision, Writing, Review, and Editing.

Fatemeh Shabkhiz: Writing and Review

Conflict of interest:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

فعالیت ورزشی اختیاری استرس اکسیداتیو و شدت بیماری را در موش‌های مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس کاهش می‌دهد

امیرحسین صفار کهنه قوچان^۱، محمدرضا کردی^۲، فاطمه شب‌خیز^۳

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: amirsaffar@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسؤل، گروه فیزیولوژی ورزشی، علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: mrkordi@ut.ac.ir

۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: shabkhiz@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه: استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) واکنش‌پذیر، نقش مهمی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری ام‌اس دارد. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر فعالیت ورزشی بر شدت بیماری، سطوح پروتئین NRF2 و آنزیم گزانتین اکسیداز در نخاع در دوره مزمن بیماری است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱

روش پژوهش: ۳۰ موش ماده C57B16 (۶-۸ هفته) به سه گروه فعالیت ورزشی اختیاری، EAE و کنترل سالم تقسیم شدند. پس از القای EAE با میلین لیگوندروسیت گلیکوپروتئین (MOG35-55) و پس از آنکه موش‌ها دو روز پیایی نمره بالینی یک را نشان دادند، به مدت چهار هفته، پنج روز، روزی یک ساعت تمرین اختیاری را انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها به وسیله کتامین و زایلازین بی‌هوش شده و بافت نخاع برداشته شد. مکان‌یابی پروتئین‌های NRF2 در ماده خاکستری و سفید نخاع با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد و آنزیم گزانتین اکسیداز با استفاده از کیت گزانتین اکسیداز طبق دستورالعمل سازنده کیت به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

کلیدواژه‌ها:

EAE

NRF2

چرخ دوار اختیاری،

گزانتین اکسیداز.

یافته‌ها: فعالیت ورزشی اختیاری سطوح پروتئین NRF2 را در قسمت سفید ($P=0/0001$) و خاکستری نخاع افزایش داد ($P=0/0001$) و سطوح آنزیم گزانتین اکسیداز در نخاع ($P=0/0001$) و شدت بیماری را در دوره مزمن کاهش داد ($P=0/0001$).

نتیجه‌گیری: فعالیت ورزشی اختیاری می‌تواند استرس اکسیداتیو و شدت بیماری را در دوره مزمن بیماری کاهش دهد و راهبرد مناسبی برای کنترل و درمان بیماری ام‌اس باشد.

استناد: صفار کهنه قوچان، امیرحسین؛ کردی، محمدرضا؛ و شب‌خیز، فاطمه. فعالیت ورزشی اختیاری استرس اکسیداتیو و شدت بیماری را در موش‌های مبتلا به مالتیپل

اسکلروزیس کاهش می‌دهد. نشریه علوم زیستی ورزشی، ۱۴۰۱؛ ۱۴(۴): ۵-۱۸.

DOI: <https://doi.org/10.22059/jsb.2022.329699.1485>



© نویسندگان.

ناشر: انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس^۱، یک بیماری مزمن التهابی-عصبی سیستم عصبی مرکزی است که سبب ناتوانی در بزرگسالان جوان به خصوص در زنان می شود. رویداد اولیه در پاتوژنز بیماری ام اس نفوذ لکوسیت های بسیار پیش التهابی به ویژه *TH1* و *TH17* به داخل سیستم عصبی مرکزی و تولید اینترفرون گاما و *IL-17A* است (۱). این افزایش واکنش های التهابی نفوذپذیری سد خونی - مغزی را افزایش می دهد و سبب نفوذ بیشتر سلول های *B* و مونوسیت ها به *CNS* می شود. این فرایندها با فعال شدن ماکروفاژها و میکروگلیاهای ساکن در *CNS* و ترشح بیشتر سایتوکاین های التهابی، چموکاین ها همراه است (۱، ۲). علاوه بر این ماکروفاژها و میکروگلیاهای فعال شده در ضایعات *CNS* آنزیم های دخیل در استرس اکسیداتیو مثل مانند *NADPH* اکسیداز (*NOX*)، نیتریک اکسید سنتاز القایی^۲، گزانتین اکسیداز^۳ و میلوپراکسیداز^۴ را بیان می کنند و سبب افزایش تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر و استرس اکسیداتیو می شوند. شواهد نشان می دهد استرس اکسیداتیو از طریق افزایش تخریب سد خونی-مغزی، آسیب به میتوکندری، افزایش بیشتر سایتوکاین های التهابی با فعال سازی *NFkB* نقش مهمی در پیشرفت و توسعه بیماری ام اس دارد (۳). در بسیاری از پژوهش ها آسیب اکسیداتیو شدید ناشی از افزایش بیش از حد *ROS* ها در ضایعات بافت مغز و نخاع بیماران ام اس و انسفالومیلیت خودایمن تجربی^۵ مشاهده شده است (۴). انسفالومیلیت خودایمن تجربی رایج ترین مدل تجربی بیماری ام اس است که تمام ویژگی های پاتولوژیک این بیماری مثل التهاب، تخریب غلاف میلین، از دست دادن آکسون ها و گلیوز را پوشش می دهد. *ROS* سلولی می تواند به وسیله منابع خارجی شامل اشعه ماورای بنفش و یونیزه کننده و برخی داروها و عوامل داخلی شامل آنزیم های میتوکندریایی و غیر میتوکندریایی مثل گزانتین اکسیداز و *NADPH* اکسیداز تولید شود (۵). گزانتین اکسیداز با تبدیل هیپوگزانتین^۶ به گزانتین^۷ و گزانتین به اسید اوریک^۸ مسئول کاتابولیسم پورین هاست (۶). *XO* الکترون ها را به اکسیژن منتقل می کند و در پی آن O_2^- و H_2O_2 را درون سلول تولید می کند (۷). در شرایط طبیعی این آنزیم به شکل گزانتین دهیدروژناز^۹ وجود دارد، اما در بیماری های عصبی به خصوص ام اس، گزانتین دهیدروژناز به *XO* تبدیل می شود که به اختلال در سیگنالینگ کلسیم درون سلولی و افزایش رادیکال های آزاد و متعاقب آن تخریب سدخونی-مغزی و آسیب نورونی می انجامد (۷، ۸). با توجه به موارد بالا، مشخص است که استرس اکسیداتیو و التهاب دو فرایند به هم مرتبط در پیشرفت بیماری ام اس هستند که *Nrf2* به شیوه پیچیده ای هر دو فرایند را کنترل و از پیشرفت بیماری ام اس جلوگیری می کند (۹).

Nrf2، فاکتور رونویسی هسته ای است که فعال شدن آن سازوکار دفاعی را در برابر استرس اکسیداتیو مرتبط با التهاب ایجاد می کند. جانسون^{۱۰} و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند موش هایی که *NRF2* در آنان ناک اوت شده بود، نفوذ سلول های ایمنی، التهاب و تخریب غلاف میلین بیشتر و علائم بالینی شدیدتر را نشان دادند (۱۰). کاهش *NRF2* با افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش سایتوکاین های التهابی از طریق فعال سازی مسیر *NFkB* همراه است که به آسیب به الیگودندروسیت ها، تخریب غلاف میلین و افزایش شدت بیماری در ام اس منجر می شوند. در همین زمینه نلسن^{۱۱} و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند که القای ام اس در موش های با نقص *NRF2* به آپوپتوز و کاهش بیشتر الیگودندروسیت ها، افزایش بیشتر التهاب عصبی و تخریب آکسون در مقایسه با موش های نرمال (بدون نقص *NRF2*) منجر شد (۱۱). با توجه به اهمیت *NRF2* در پاتوژنز بیماری ام اس مداخلات دارویی متعددی برای افزایش *NRF2*

1. Multiple sclerosis (MS)

2. Inducible nitric oxide synthase I (NOS)

3. xanthine oxidase (XO)

4. Myeloperoxidase (MPO)

5. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

6. hypoxanthine

7. xanthine

8. uric acid

9. xanthine dehydrogenase

10. Johnson

11. Nellessen

جلوگیری از توسعه بیماری انجام گرفته است. برای مثال تحقیقات نشان دادند برخی ترکیبات فعال کننده *NRF2* مثل متیل هیدروژن فومارات^۱، استرهای اسید فوماریک^۲ و سولفورفان^۳ سبب کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب و تخریب غلاف میلین در انسفالومیلیت خودایمن تجربی و اماس می شود (۱۲، ۱۳). پژوهش‌های بالینی زیادی نیز تأثیرات مفید فعالیت ورزشی و فعالیت بدنی را بر بهبود راه رفتن، خستگی، افسردگی و کیفیت زندگی در افراد مبتلا به اماس نشان داده‌اند (۱۴-۱۶). همچنین فعالیت ورزشی سبب افزایش نروتروفین‌ها، افزایش عامل‌های ضدالتهابی، افزایش نوروژنز، التهاب و استرس اکسیداتیو، و نیز کاهش تخریب غلاف میلین و جلوگیری از پیشرفت بیماری می‌شود (۱۷-۲۰). برای مثال شهیدی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند چهار هفته فعالیت اجباری و اختیاری پیش و پس از القای *EAE* موجب کاهش تخریب غلاف میلین، جلوگیری از پیشرفت بیماری و کاهش شدت بیماری شد (۲۱). همچنین سوزا^۴ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند چهار هفته فعالیت ورزشی استقامتی و مقاومتی که از نوع فعالیت‌های اجباری در جوندگان محسوب می‌شود، سبب افزایش *NRF2* کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در *CNS* شد (۱۹). اثر بهینه فعالیت ورزشی در بیماری‌های عصبی به نوع، شدت و مدت آن بستگی دارد. فعالیت ورزشی اختیاری فعالیتی است که شدت و مدت آن تحت کنترل فرد است و از این رو استرس کمتری وارد می‌شود که می‌تواند برای بیمار لذت‌بخش‌تر باشد. شواهد قوی نشان می‌دهد فعالیت ورزشی اختیاری می‌تواند تأثیرات مؤثری در کاهش علائم بالینی در بیماری‌های عصبی داشته باشد، اما سازوکار اثر آن هنوز به طور کامل مشخص نشده است. با توجه به اهمیت *NRF2* و استرس اکسیداتیو در پیشرفت و توسعه بیماری اماس و تأثیر متفاوت نوع و شدت فعالیت در اماس و انسفالومیلیت خودایمن تجربی، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر چهار هفته فعالیت ورزشی اختیاری بر سطوح *NRF2* و *XO* در نخاع موش‌های *C57BL/6* مبتلا به *EAE* در دوره مزمن بیماری (۳۰ روز پس از القا) است.

روش‌شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از نوع توسعه‌ای و روش اجرای آن تجربی است. به این منظور ۳۰ موش نژاد *C57Bl/6* (۶-۸ هفته) از انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه شناختی سالاری در کرج منتقل شد. پس از دو هفته آشنایی با محیط مدل *EAE* توسط آزمایشگاه سالاری تولید شد. پس از تولید مدل حیوانات هر روز وزن‌گیری و از لحاظ بالینی ارزیابی شدند. پس از اینکه موش‌ها دو روز پیاپی نمره بالینی یک را نشان دادند، به مدت چهار هفته، پنج روز و روزی یک ساعت تمرین اختیاری را انجام دادند (۲۲). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها به وسیله کتامین و زایلازین بی‌هوش و بافت نخاع برداشته شد. حیوانات در رطوبت حدود ۴۵ درصد و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های ۱۰ عددی نگهداری با چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری می‌شدند و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. تمام مراحل و روش‌های پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه تهران تأیید شد.

القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی

موش‌های *C57BL/6* با ایمن‌سازی زیرجلدی از پهلوی با ۲۰۰ میکروگرم میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین^۵ (*MOG35-55*) در محلول بافرشده با فسفات^۶ که با حجم مساوی از دمای کامل فروند^۷ تکمیل شده با ۴۰۰ میکروگرم عصاره مایکوباکتریوم تیوبریکولوسیس^۸ *H37Ra* به حالت ذرات ریز و پایدار (امولسیون) درآمده بودند، القا شدند. به تمامی حیوانات در روزهای ۰ و ۴۸ ساعت

1. methyl hydrogen fumarate (MHF)

2. fumaric acid esters (FAE)

3. Sulforaphane

4. Souza

5. Myelin oligodendrocytes glycoprotein

6. Phosphate-buffered saline (PBS)

7. Complete Freund's adjuvant

8. Mycobacterium tuberculosis (CFA)

پس از آن (در روز تزریق و دو روز پس از آن)، به صورت داخل صفاقی ۳۰۰ نانوگرم تزریق پرتوسیس تاکسین^۱ شد. شایان ذکر است گروه کنترل همزمان با باقی گروهها تزریق سالین^۲ شدند. برای ارزیابی علائم بالینی *EAE*، توسط دو ناظر مستقل ارزیابی شدند و از یک سیستم نمره دهی بالینی *EAE* برای ارزیابی اختلال عصبی در مدل *EAE* با توجه به مقیاس زیر استفاده شد:

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، نمره ۵ = مرگ.

آماده سازی بافت

تمام حیوانات به وسیله ترکیب کتامین و زالازین تحت بی هوشی عمیق قربانی شدند. به دنبال آن پس از برداشت بافت قطعاتی به صورت برش عرضی از نخاع، با استفاده از محلول برتن ثابت سازی انجام گرفت. به منظور آبیگری بافت، نمونه به ترتیب در الکل ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد و مطلق قرار گرفت. سپس نمونه در داخل محلول پزیلول قرار گرفت که آن نیز جایگزین الکل شد. در مرحله آغستگی نمونه داخل پارافین مذاب توسط دستگاه اتوتکنیکون قرار گرفت. در مرحله قالب گیری ضمن انجماد پارافین، نمونه نیز داخل باقی مانده و آماده مقطع گیری شد. در مرحله برش گیری نمونه همراه با قالب پارافین توسط دستگاهی به نام میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون، برش داده شد.

سنجش *NRF2* با روش ایمونوهیستوشیمی

مکان یابی پروتئین های *NRF2* در ماده خاکستری و سفید نخاع با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در شش نمونه از هر گروه بررسی شد. برای این منظور نمونه های نخاع با *PBS* در چهار مرحله و به فاصله پنج دقیقه شسته شدند. به منظور بازیابی آنتی ژنی روی نمونه ها اسید کلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد، سپس بافر بورات به منظور خنثی سازی اسید به مدت پنج دقیقه اضافه و سلول ها با *PBS* شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشای سلول ها استفاده شد. سپس نمونه ها دوباره با *PBS* شسته شدند و سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با *PBS* به نمونه اضافه و پس از ایجاد محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. روز بعد بافتها از یخچال خارج و سپس چهار بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با *PBS* شسته و به نمونه آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه شدند، سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل شد و پس از چهار بار شست و شو، به آنها *DAPI* اضافه شد، بلافاصله برداشته شد و روی نمونه *PBS* ریخته شد و در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت مدل *Olympus* و با لنز ۴۰۰ برای تأیید فاکتورها مشاهده شدند. شدت فلوروسنت نمونه ها توسط نرم افزار *Image J v1.8* تعیین شد. همچنین درصد سلول های رنگ آمیزی مثبت در برابر کل هسته های منطقه با نرم افزار *Image J* محاسبه و کمی شد.

سنجش گزانتین اکسیداز به روش الیزا

آنزیم گزانتین اکسیداز با استفاده از کیت زانتین اکسیداز (*Zellbio, Germany*)، طبق دستورالعمل سازنده کیت به روش *ELISA* اندازه گیری شد. به طور خلاصه، برای جداسازی پروتئین، بافت مغز جدا شده در بافر لیزکننده هموژن شده و *NaOH* به نمونه ها برای رسیدن به *PH* ۷/۴ اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با *rpm* ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و محلول رویی جمع آوری شد.

1. Pertussis toxin

2. Saline

روش آماری

در این پژوهش از میانگین و انحراف استاندارد برای توصیف داده‌ها استفاده شد، نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیروویلیک و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. برای بررسی تفاوت سطوح پروتئین *NRF2* و آنزیم زانتین اکسیداز در بین گروه‌ها از آزمون پارامتریک آنوای یکطرفه با آزمون تعقیبی توکی و برای ارزیابی تغییرات درون گروهی و بین گروهی شدت بیماری به ترتیب از آزمون ناپارامتریک ویلکاکسون و یو من ویتنی استفاده شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات به وسیله نرم افزار *SPSS* نسخه ۱۶ انجام گرفت و نمودارها با نرم افزار پریم رسم شد.

یافته‌های پژوهش

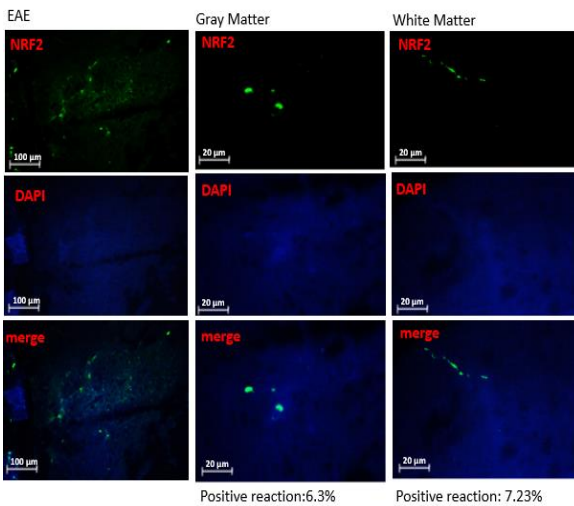
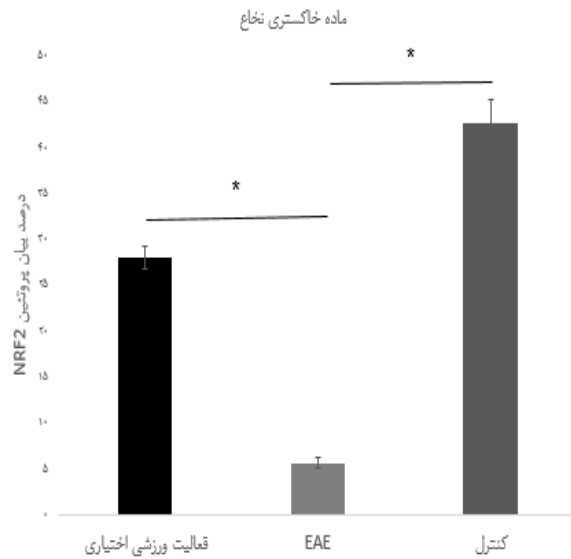
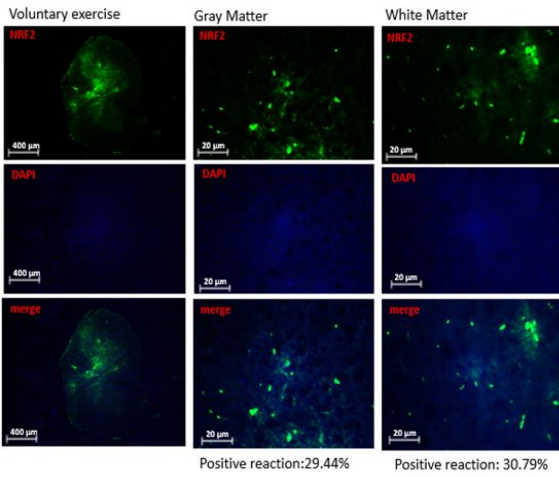
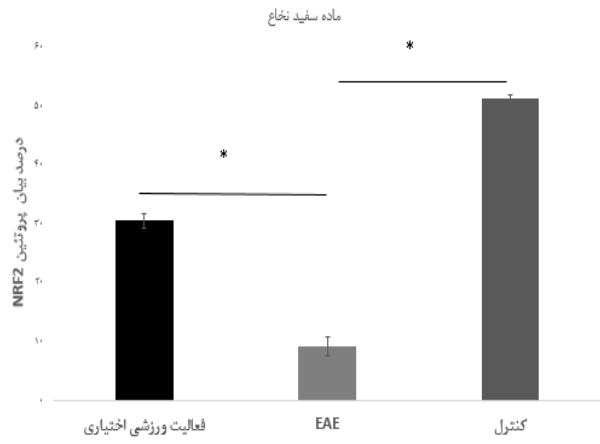
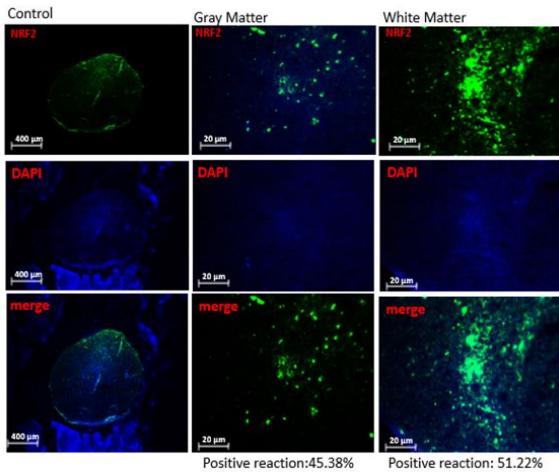
چهار هفته فعالیت ورزشی اختیاری پس از شروع علائم شدت بیماری را در دوره مزمن بیماری کاهش می‌دهد. نتایج آزمون ویلکاکسون نشان داد که شدت بیماری پس از شروع علائم در روز دهم به تدریج تا روز سیام پس از القا افزایش یافت ($P=0/02$). اما در گروهی که فعالیت ورزشی اختیاری انجام داده بودند، شدت بیماری تغییر نکرد ($P=1/00$). همچنین نتایج آزمون یو من ویتنی نشان داد که در مقایسه با گروه *EAE* فعالیت ورزشی اختیاری نمرات بالینی (شدت بیماری) را در دوره مزمن (۳۰ روز پس از القا) کاهش داد ($P=0/01$).

جدول ۱. نمرات بالینی گروه‌ها در روز شروع علائم و دوره مزمن بیماری

گروه	۱۰ روز پس از القا (شروع علائم)	۳۰ روز پس از القا (دوره مزمن بیماری)
<i>EAE</i>	(۱-۰) ۰/۵۷	(۲-۱) ۱/۷۱
فعالیت ورزشی اختیاری	(۲-۱) ۰/۶۰	(۲-۰) ۰/۶۰

چهار هفته فعالیت ورزشی اختیاری پس از شروع علائم سطوح *NRF2* در قسمت سفید و خاکستری نخاع افزایش می‌دهد.

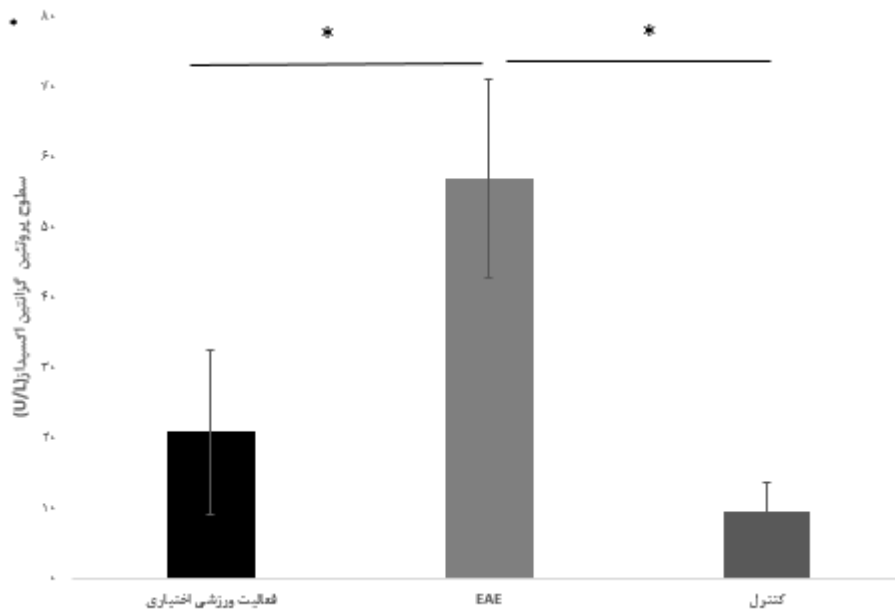
نتایج میکروسکوپ ایمنوفلورسانس نشان داد سطوح پروتئین *NRF2* در قسمت خاکستری ($F=356/11, P=0/001$) و قسمت سفید نخاع ($F=946/62, P=0/001$) در بین گروه‌ها تفاوت معناداری دارد. نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل سالم القای *EAE* سطوح پروتئین *NRF2* را در نخاع کاهش داد (ماده سفید $P=0/0001$ و ماده خاکستری $P=0/0001$). فعالیت ورزش اختیاری در مقایسه با گروه *EAE* سطوح پروتئین *NRF2* را افزایش داد (ماده سفید $P=0/0001$ و ماده خاکستری $P=0/0001$).



شکل ۱. سطوح پروتئین NRF2 در قسمت سفید و خاکستری نخاع - القای EAE سطوح پروتئین NRF2 را در قسمت سفید و خاکستری نخاع کاهش و فعالیت ورزشی اختیاری سطوح آن را افزایش می دهد ($P \leq 0.05$).

چهار هفته فعالیت ورزشی اختیاری پس از شروع علائم سطوح آنزیم گزانتین اکسیداز را در نخاع کاهش می‌دهد.

نتایج سنجش الایزا نشان داد سطوح آنزیم گزانتین اکسیداز در نخاع در بین گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد ($P=0/0001$)، نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل سالم القای *EAE* سطوح آنزیم *XO* را در نخاع افزایش داد ($P=0/001$) و فعالیت ورزش اختیاری در مقایسه با گروه *EAE* سطوح آنزیم *XO* را در نخاع کاهش داد ($P=0/001$).



شکل ۲. سطوح *XO* در نخاع-القای *EAE* سطوح آنزیم گزانتین اکسیداز را در نخاع افزایش و فعالیت ورزشی اختیاری سطوح آن را کاهش می‌دهد ($P \leq 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی موجب کاهش سطوح پروتئین *Nrf2* در ماده نخاع می‌شود. این یافته همسو با نتیجه پژوهش‌های هیگاشیا^۱ و همکاران (۲۰۱۷)، توپفوف^۲ و همکاران (۲۰۱۶) و لیو^۳ و همکاران (۲۰۱۴) است که نشان دادند القای *EAE* به کاهش سطوح پروتئین *Nrf2* در *CNS* و افزایش تشدید علائم بالینی در موش‌ها منجر می‌شود (۲۳-۲۵). همچنین ایتزی^۴ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند القای بیماری *EAE* موجب کاهش سطوح و سنتز گلوکوتائین و آنزیم‌های مرتبط با سنتز آن می‌شود که این کاهش با کاهش بیان پروتئین *Nrf2* در هسته و سیتوزول ارتباط دارد (۲۶). *Nrf2* یک فاکتور رونویسی هسته و عامل اصلی بیان ژن‌های مرتبط با عنصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی است. در شرایط عادی سطوح *Nrf2* در سلول به سبب اتصال با پروتئین مهارکننده خود *keap1* بسیار پایین است. در شرایط استرس اکسیداتیو *keap1* از *Nrf2* جدا شده، به هسته منتقل می‌شود و پس از اتصال به عنصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی به بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی منجر می‌شود. پژوهش‌های متعددی گزارش کرده‌اند *Nrf2* بر اثر

1. Higashia

2. Topphoff

3. liu

4. Itzy

القای *EAE* کاهش می یابد، اما در توجیه علت این یافته نتایج ضد و نقیض است. ایتزی و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند *Nrf2* بر اثر القای *EAE* کاهش یافت و این کاهش در شرایطی که مقدار *Nrf2* هم در هسته و هم در سیتوزول پایین است، بیشتر است (تقریباً ۹۰ درصد) که نشان می دهد احتمالاً انتقال به هسته این فاکتور رونویسی نیز تحت تأثیر قرار گرفته است. همچنین آنها نشان دادند بیان ژن *Nrf2* طی دوره *EAE* کمی افزایش یافته است که نشان می دهد احتمالاً انسفالومیلیت خودایمن تجربی فرایندهای ترجمه یا پس از ترجمه *Nrf2* را تحت تأثیر قرار می دهد (۲۶). اختلال در سطوح و عملکرد *Nrf2* بیان بسیاری از ژن های آنتی اکسیدانی و محافظت کننده نوروں را تحت تأثیر قرار می دهد که ممکن است پیامدهای پاتولوژیکی بزرگی در بیماری های عصبی به خصوص ام اس داشته باشد. به نظر می رسد تمرین ورزشی می تواند رویکرد مناسبی برای جلوگیری از پیشرفت ام اس و انسفالومیلیت خودایمن تجربی باشد. یافته های پژوهش نشان داد فعالیت ورزشی اختیاری پس از شروع علائم بالینی *EAE* موجب افزایش سطوح پروتئین *Nrf2* در نخاع شد و کاهش علائم بالینی در دوره مزمن بیماری شد. برخلاف نتایج پژوهش حاضر ژای^۱ و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فعالیت ورزشی با شدت متوسط تأثیری بر شدت بیماری در دوره مزمن بیماری ندارد، در حالی که فعالیت ورزشی با شدت بالا علائم بالینی، نفوذ سلول هاسلول های ایمنی و تخریب غلاف میلین را در نخاع کاهش داد (۲۰). همچنین فرهمند و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا پیش از القای *EAE* شدت بیماری را در دوره مزمن کاهش داد. گزارش های متعدد نقش *NRF2* را در پاتوژنز ام اس نشان می دهد (۲۷). پژوهش ها گزارش کرده اند که کاهش *NRF2* به شروع سریع تر و شدیدتر علائم بالینی در *EAE* منجر می شود. علاوه بر این کاهش *NRF2* سبب افزایش فعال شدن گلیاها، تخریب آکسون، افزایش سایتوکاین های التهابی و در نهایت تشدید آسیب به نخاع می شود. بنابراین کاهش علائم بالینی در پژوهش حاضر می تواند به دلیل افزایش *NRF2* و کاهش استرس اکسیداتیو باشد. فعالیت ورزشی سبب تغییر در پروتئین *keap1* و جدا شدن از *Nrf2* می شود. هنگامی که *Nrf2* از *keap1* جدا می شود، به هسته منتقل شده و در آنجا با پروتئین های کوچک *MAF* هتروداایمریزه^۲ شده و به عنصر پاسخ آنتی اکسیدانی متصل می شود و به طور مؤثری آنزیم های فاز دو دفاع آنتی اکسیدانی را فعال می کند. بنابراین تمرینات ورزشی از این طریق مسیر پیام رسانی *Nrf2* را فعال می کند (۲۸). سوزا و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر دو نوع فعالیت ورزشی هوازی و مقاومتی را بر بیان ژن *Nrf2* و برخی فاکتورهای التهابی، ضدالتهابی، اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در *CNS* موش های مبتلا به *EAE* بررسی کردند. نتایج نشان داد هر دو فعالیت هوازی و مقاومتی علائم بالینی *EAE*، استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش و عوامل آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی را افزایش داد که این تغییرات احتمالاً ناشی از افزایش بیان پروتئین *Nrf2* در *CNS* است (۱۹). متوسامی^۳ و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند استرس اکسیداتیو ناشی از تمرین در موش های *Nrf2*^{-/-} به علت کاهش بیان ژن های آنتی اکسیدانی وابسته به *Nrf2* بیشتر بود (۲۹). همچنین گاندر^۴ و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند اختلالات مرتبط با افزایش سن در سیگنالینگ *Nrf2* و آنزیم های آنتی اکسیدانی سبب افزایش خطر ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی در سالمندان می شود. اما این کاهش در موش های سالمندی که فعالیت ورزشی متوسط انجام داده بودند، برگشت پذیر است و *Nrf2* و آنزیم های آنتی اکسیدانی به نزدیک سطوح طبیعی در موش های جوان بازگشت (۳۰). نتایج پژوهش حاضر نشان داد گزانتین اکسیداز با القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی در نخاع افزایش یافت. دیمتروویچ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند بین افزایش استرس اکسیداتیو و اختلالات عصبی ارتباط وجود دارد و القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی سبب

1. Xie

2. heterodimerize

3. Muthusamy

4. Gounder

افزایش فعالیت زانتین اکسیداز، *MDA* و *iNOS mRNA* و کاهش فعالیت *SOD* در نخاع موش‌ها می‌شود (۳۱). همچنین هنورات و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی بیان و فعالیت گزانتین اکسیداز را در سرم و *CNS* موش‌ها به‌خصوص در نخاع و مخچه که التهاب غالب است، افزایش می‌دهد (۳۲). مسیرهای متعددی در تولید سوپر اکسید شامل چند آنزیم اکسیداز (*NADPH* اکسیداز، گزانتین اکسیداز، سیتوکروم *P450* دخیل‌اند. اما گزانتین اکسیداز مهم‌ترین تولیدکننده *ROS* در زمینه التهاب است. بیان گزانتین اکسیداز و در نتیجه تولید سوپر اکسید به‌طور چشمگیری در حضور سایتوکاین‌های التهابی (*IL-1B* *IL-16*) و *TNF* افزایش می‌یابد و این افزایش در پاتوژن انسفالومیلیت خودایمن تجربی دخیل است. بنابراین افزایش گزانتین اکسیداز ناشی از القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی به‌دلیل افزایش سایتوکاین‌های التهابی اتفاق می‌افتد (۳۱). دیمتروویچ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند افزایش بیشتر گزانتین اکسیداز در نخاع موش‌های نر نسبت به موش‌های ماده به‌دلیل بیان بیشتر سایتوکاین‌های التهابی در سلول‌های تک‌هسته‌ای نخاع در موش‌های نر است. به‌نظر می‌رسد سلول‌های مشتق از مونوسیت‌های التهابی مثل ماکروفاژها و میکروگلیاهای فعال منبع اصلی گزانتین اکسیداز در مدل‌های انسفالومیلیت خودایمن تجربی و ام‌اس هستند (۳۱). بنابراین کاهش گزانتین اکسیداز می‌تواند در جلوگیری از پیشرفت ام‌اس و انسفالومیلیت خودایمن تجربی مؤثر باشد. هنورات و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند القای فبوکستات که مهارکننده فعالیت گزانتین اکسیداز است، علائم بالینی در موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی را کاهش داد (۳۲).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی اختیاری پس از القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی موجب کاهش سطوح زانتین اکسیداز شد که در مقایسه با گروه سالم گزانتین اکسیداز تفاوت معناداری را نشان نداد. بنابراین به‌نظر می‌رسد فعالیت ورزشی اختیاری رویکرد مناسبی برای کنترل سطوح *XO* متعاقباً تخریب‌های ناشی از آن باشد. افزایش زانتین اکسیداز به‌شدت به سایتوکاین‌های التهابی وابسته است. فعالیت ورزشی منظم موجب افزایش سطوح *Nrf2* می‌شود تحقیقات زیادی نشان دادند، *Nrf2* سبب سرکوب التهاب، استرس اکسیداتیو، افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۲۸). بنابراین فعالیت ورزشی منظم موجب تنظیم فعالیت سلول‌های ایمنی مثل ماکروفاژها، میکروگلیاهای فعال، کاهش استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های ضدالتهابی و متعاقب آن کاهش *XO* و *NADPH* اکسیداز مهم‌ترین آنزیم‌های تولیدکننده *ROS* در *CNS* می‌شوند (۲۸).

جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

در این پژوهش نشان داده شد که فعالیت ورزشی اختیاری صرف‌نظر از شدت و مدت، استرس اکسیداتیو ناشی از القای انسفالومیلیت خودایمن تجربی را در دوره مزمن بیماری کاهش داد، اما پژوهش‌های بیشتری نیاز است تا در مورد نوع و شدت و مدت مناسب تمرین در بیماران ام‌اس تصمیم‌گیری شود.

References

1. Moser T, Akgün K, Proschmann U, Sellner J, Ziemssen T. The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications. *Autoimmunity Reviews*. 2020;19(10):102647.
2. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J*. 2017;19(1):1-10.
3. Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+ T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2018;12:114.
4. van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(12):1729-37.
5. Mani S. Production of reactive oxygen species and its implication in human diseases. *Free radicals in human health and disease*: Springer; 2015. p. 3-15.
6. Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free radical biology & medicine*. 2013;62:170-85.
7. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurol*. 2015;24(4):325-40.
8. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T, Takata K, Koda T, Tada S, et al. Xanthine Oxidase Mediates Axonal and Myelin Loss in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e71329.
9. Michaličková D, Hrnčič T, Canová NK, Slanař O. Targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in multiple sclerosis. *European journal of pharmacology*. 2020;873:172973.
10. Johnson DA, Amirahmadi S, Ward C, Fabry Z, Johnson JA. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;114(2):237-46.
11. Nellessen A, Nyamoya S, Zendedel A, Slowik A, Wruck C, Beyer C, et al. Nrf2 deficiency increases oligodendrocyte loss, demyelination, neuroinflammation and axonal damage in an MS animal model. *Metabolic Brain Disease*. 2020;35(2):353-62.
12. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(Pt 3):678-92.
13. Li B, Cui W, Liu J, Li R, Liu Q, Xie XH, et al. Sulforaphane ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by antagonizing oxidative stress and Th17-related inflammation in mice. *Exp Neurol*. 2013;250:239-49.
14. 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.
15. Pilutti L, Dlugonski D, Sandroff B, Klaren R, Motl RW. Randomized controlled trial of a behavioral intervention targeting symptoms and physical activity in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014;20(5):594-601.
16. Alvarenga-Filho H, Sacramento PM, Ferreira TB, Hygino J, Abreu JEC, Carvalho SR, et al. Combined exercise training reduces fatigue and modulates the cytokine profile of T-cells from multiple sclerosis patients in response to neuromediators. *J Neuroimmunol*. 2016;293:91-9.
17. Bernardes D, Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Karmally S, Dellarole A, Carvalho-Tavares J, et al. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*. 2016;136 Suppl 1:63-73.
18. Bernardes D, Oliveira-Lima OC, Silva TV, Faraco CC, Leite HR, Juliano MA, et al. Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. *J Neuroimmunol*. 2013;264(1-2):24-34.
19. 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. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4723-37.

20. Xie Y, Li Z, Wang Y, Xue X, Ma W, Zhang Y, et al. Effects of moderate- versus high- intensity swimming training on inflammatory and CD4(+) T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunol*. 2019;328:60-7.
21. 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.
22. Saffar Kohneh Quchan AH, 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. *Neuroscience Letters*. 2020;738:135382.
23. Higashi C, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, et al. The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Pharmacol*. 2017;802:76-84.
24. Schulze-Topphoff U, Varrin-Doyer M, Pekarek K, Spencer CM, Shetty A, Sagan SA, et al. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(17):4777-82.
25. Liu N, Kan Q-c, Zhang X-j, Xv Y-m, Zhang S, Zhang G-X, et al. Upregulation of immunomodulatory molecules by matrine treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental and molecular pathology*. 2014;97(3):470-6.
26. Morales-Pantoja IE, Hu C-l, Perrone-Bizzozero NI, Zheng J, Bizzozero OA. Nrf2-dysregulation correlates with reduced synthesis and low glutathione levels in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neurochemistry*. 2016;139(4):640-50.
27. Farahmand F, Nourshahi M, Soleimani M, Rajabi H, Power KE. The effect of 6 weeks of high intensity interval training on myelin biomarkers and demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Journal of Neuroimmunology*. 2020;346:577306.
28. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biology*. 2016;10:191-9.
29. Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boehme C, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(2):366-76.
30. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KJ, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One*. 2012;7(9):e45697.
31. Dimitrijevic M, Kotur-Stevuljevic J, Stojic-Vukanic Z, Vujnovic I, Pilipovic I, Nacka-Aleksic M, et al. Sex Difference in Oxidative Stress Parameters in Spinal Cord of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Relation to Neurological Deficit. *Neurochemical research*. 2017;42(2):481-92.
32. Honorat JA, Kinoshita M, Okuno T, Takata K, Koda T, Tada S, et al. Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PloS one*. 2013;8(8):e71329.