Journal of Zabol Medical School

Vol 4; No. 2; Summer 2021: 61-8

Original Article

10.18502/jzms.vl4i2.?????

Crossref

Coping with Exercise Induced Spatial Memory Improvement in Morphine Dependent Rats by Inhibiting Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Aboozar Zare[1], Vali Nowzari[2], Tahereh Karimi-Jashni[3]

Received: 28.04.2021
Accepted: 22.05.2021
Published: 06.07.2021

Abstract

Background: Addiction as a chronic disorder that requires long treatment. One way to treating this chronic disease is exercise. Chronic exposure to opiates impairs spatial learning and memory. Given the well-known beneficial effects of voluntary exercise on cognitive functions, we investigated whether voluntary exercise would ameliorate the cognitive deficits that are induced by morphine dependence. If an effect of exercise was observed, we aimed to investigate the possible role of hippocampal brain-derived neurotropic factor (BDNF) in the exercise-induced enhancement of learning and memory in morphine-dependent rats.

Methods: The rats were injected with bi-daily doses (10 mg/kg, at 12 hr. intervals) of morphine over a period of 10 days of voluntary exercise. Following these injections, a water maze task was performed twice a day for 5 consecutive days, followed by a probe trial 2 days later. A specific BDNF inhibitor (TrkB-IgG chimera) was used to block the hippocampal BDNF action during the 10 days of voluntary exercise.

Results: The voluntary exercise diminished the severity of the rats' dependency on morphine. A blockade of the BDNF action blunted the exercise-induced improvement of spatial memory, hippocampal neuron counting and BDNF protein levels in the dependent rats. Our results indicate that voluntary exercise could be increase the expression of LTP by lowering the induction threshold for LTP in the DG of morphine-dependent rats.

Conclusion: Thus, voluntary exercise might be considered as a potential method to ameliorate some of the deleterious behavioral consequences of the abuse of morphine and other opiates.

Keywords: Morphine dependency, Exercise, Learning, Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

Citation: Zare A, Nowzari V, Karimi-Jashni T. **Coping with Exercise Induced Spatial Memory Improvement in Morphine Dependent Rats by Inhibiting Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).** J Zabol Med Sch 2021; 4(2): 61-8.

1- PhD in Sports Management, Farhangian University, Shiraz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Physical Education, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran
3- Farhangian University, Salman Farsi Branch, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Aboozar Zare, **Email:** aboozarzare363@gmail.com

مجله دانشکده پزشکی زابل
دوره ٤، شماره ٢؛ تابستان ١٤٠٠: ٦٨-٦١

مقاله پژوهشی

10.18502/jzms.vl4i2.????

Crossref

مقابله با بهبود حافظه‌ی فضایی ناشی از ورزش در موش‌های وابسته به مرفین در اثر جلوگیری از عمل فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

ابوذر زارع[1]، ولی نوذری[2]، طاهره کریمی جشنی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۱
تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۴/۱۵

چکیده

مقدمه: اعتیاد، به عنوان یک اختلال مزمن، نیازمند درمان طولانی است. یکی از راه‌های درمان این بیماری مزمن، ورزش کردن می‌باشد. ورزش ارادی، اثرات مفید بر اعمال شناختی دارد و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF (Brain derived neurotrophic factor) را در هیپوکامپ افزایش می‌دهد. مصرف درازمدت مرفین، یادگیری و حافظه‌ی فضایی را مختل می‌کند. از این رو، نقش فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) موجود در هیپوکامپ، در مقابله با بهبود اعمال شناختی به دنبال ورزش ارادی در موش‌های وابسته به مرفین بررسی شد.

شیوه‌ی مطالعه: موش‌های نمونه، هم‌زمان با ۱۰ روز فعالیت دویدن، مرفین (۱۰ mg/kg، روزی دو بار با فاصله‌ی ۱۲ ساعت) زیر جلدی دریافت کردند. سپس تمام موش‌ها برای ۵ روز متوالی و هر روز، ۲ بار در ماز آبی موریس آموزش دیدند. آزمون نهایی، ۲ روز بعد از آخرین آموزش انجام شد. مهارکننده‌ی اختصاصی گیرنده‌ی BDNF (TrkB-lgG chimera) برای بلوط عمل BDNF در طول ۱۰ روز ورزش ارادی داخل هیپوکامپ تزریق شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، ورزش، شدت وابستگی به مرفین را در موش‌های وابسته کاهش می‌دهد. همچنین مهارکننده‌ی گیرنده‌ی BDNF موجب جلوگیری از افزایش حافظه‌ی فضایی، تعداد نورون‌های هیپوکامپ و میزان پروتئین BDNF ناشی از ورزش در موش‌های وابسته به مورفین گردید.

نتیجه‌گیری: بنابراین ورزش ارادی، ممکن است یک روش بالقوه‌ای برای درمان برخی از نقایص رفتاری ناشی از مرفین و داروهایی از این قبیل باشد.

کلمات کلیدی: وابستگی به مرفین، ورزش ارادی، یادگیری، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

ارجاع: زارع ابوذر، نوذری ولی، کریمی جشنی طاهره. **مقابله با بهبود حافظه‌ی فضایی ناشی از ورزش در موش‌های وابسته به مرفین در اثر جلوگیری از عمل فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز.** مجله دانشکده پزشکی زابل ۱۴۰۰؛ ۴(۲): ۶۸-۶۱.

مقدمه

اعتیاد، از دست دادن کنترل فرد در مصرف دارو و یا جستجو و مصرف اجباری دارو، با وجود آثار زیان‌بار آن است. مشابه سایر بیماری‌ها، یک فهم درست از پایه‌ی زیست‌شناسی اعتیاد، به یافتن درمان‌های مؤثرتری منجر خواهد شد (۱). دلایل شروع مصرف داروهای اعتیادآور، هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند. بعضی از محققین معتقدند که در طی مصرف دارو، رفتارهای مربوط به مصرف دارو به صورت خودکار و شبیه عادت در می‌آیند که کنترل ارادی ضعیفی روی آن‌ها است (۲). تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی در قشر پره فرونتال، احتمالاً در از دست دادن کنترل ارادی در وضعیت پیش‌رونده‌ی اعتیاد، جستجوی اجباری برای دارو، تصمیم‌گیری اعمال شناختی و عود نقش دارند (۳). اعتیاد به مخدرها، اختلالات شناختی از جمله تخریب حافظه و یادگیری را سبب می‌شوند. برای مثال، موش‌های صحرایی که به طور مزمن با مرفین مواجه شده‌اند در اکتساب حافظه‌ی رجوعی اختلال نشان می‌دهند (۴).

یافته‌ها نشان داد که شکل‌پذیری سیناپسی هیوکامپ بعد از مصرف مزمن مرفین، به آن وابسته می‌شود. به عبارت دیگر، عمل هیوکامپ در حضور مرفین، سازش یافته است. هیوکامپ به عنوان یک ساختار کلیدی دخیل

۱- دکترای مدیریت ورزش، مدرس دانشگاه فرهنگیان، شیراز، ایران
۲- استادیار، گروه مدیریت ورزشی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران
۳- دانشگاه فرهنگیان، واحد سلمان فارسی، شیراز، ایران
نویسنده مسؤول: ابوذر زارع
Email: aboozarzare363@gmail.com

در حافظه، شدیداً از مصرف مزمن دارو متأثر می‌شود. این داروها سبب شکل‌پذیری نامطلوب، آتروفی دندریتی یا تخریب نورونی در هیپوکامپ موش‌های بالغ می‌گردد (۵). همچنین مصرف مزمن مواد مخدر، از طریق تداخل با مسیرهای درون سلولی پیام‌رسانی فاکتورهای رشد نوروتروفیک، با عامل تنظیمی آن‌ها روی نورون‌ها مداخله می‌کند. نتایج دیگر نشان داد که تجویز مزمن مواد مخدر یا کوکایین، موجب تغییر مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی فاکتورهای نوروتروفیک می‌شود که به دنبال آن موجب اختلال عمل و نقش هومیوستاتیک این فاکتورها در حفظ اعمال نورونی می‌گردد.

فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)، مهم‌ترین نوروتروفین مغزی می‌باشد که برای عملکرد سیناپسی و تشکیل حافظه‌ی فضایی ضروری است و در مدل‌های جانوری به نظر می‌رسد که دارای اثر شبه ضد افسردگی در هیپوکامپ باشد (۶). پیدا کردن راه‌های مؤثر برای جلوگیری از تغییرات سیناپسی ناشی از داروهای مخدر، می‌تواند نقش مهمی در درمان و جلوگیری از عود آن داشته باشد.

متأسفانه به علت عدم شناخت دقیق مکانیسم‌های این بیماری، روش‌های درمان مؤثر و جلوگیری از ایجاد وابستگی و عود آن، در دسترس نیست. به نظر می‌رسد یکی از روش‌های مؤثر و کم هزینه‌ی درمان اعتیاد، ورزش باشد. مطالعات جدید نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند برخی از نشانه‌های شناختی و پیامدهای تخریبی ریخت‌زایی زوال عقلی را کاهش دهد و موجب بازگرداندن یادگیری فضایی در موش‌های مسن گردد (۷). مطالعات اخیر نشان داد که ورزش ارادی، می‌تواند موجب افزایش ۵۰ درصدی نورون‌زایی در هیپوکامپ موش‌های مسن و همچنین در قشر حرکتی و مخچه و باز گرداندن حافظه فضایی در ماز آبی گردد. احتمالاً BDNF، می‌تواند نقش بالقوه‌ای در نورون‌زایی و شکل‌پذیری سیناپسی و تقویت یادگیری و حافظه‌ی ناشی از ورزش داشته باشد (۸).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ورزش ارادی، با کاهش دادن وسعت آسیب بعد از صدمه‌ی مغزی و به تأخیر انداختن شروع بیماری آلزایمر، می‌تواند برخی از پیامدهای تخریبی ریختی و رفتاری حاصل از پیری را نیز از بین ببرد. ورزش ارادی، می‌تواند مانع اثرات منفی و یا سطح بالای کورتیکوسترون بر روی پروتئین BDNF شود (۹). ورزش، مقدار BDNF و نورون‌زایی را در هیپوکامپ موش‌های جوان و مسن و نیز قشر حرکتی و مخچه افزایش می‌دهد. گزارش‌ها نشان داده که ورزش، بر سطح آمین‌ها و اندروفین‌ها در بدن اثر گذاشته و این تغییرات می‌تواند باعث اثرات مثبت در مغز شوند. همچنین سطوح بالای نوراپی‌نفرین، کاتکول آمین‌ها، سروتونین و نوروترانسمیترهای دیگر ممکن است اثرات ورزش در حافظه و یادگیری را توجیه کند.

همچنین تحقیقات دیگری نیز در این مورد نشان داده‌اند که ورزش دویدن، در موش‌های صحرایی جوان، باعث افزایش تعداد سلول‌های جدید در هیپوکامپ شده، بنابراین اندازه‌ی هیپوکامپ را زیاد کرده و موجب بهبودی عمل مغز می‌شود (۱۰). با توجه به تحقیقات فوق، از این رو نقش فاکتور نوروتورفیک مشتق از مغز (BDNF) موجود در هیپوکامپ در مقابله با بهبود اعمال شناختی به دنبال ورزش ارادی در موش‌های وابسته به مرفین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی یاسوج انجام شد. موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که همگی در حیوان‌خانه‌ی مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان پرورش داده شده بودند به صورت اتفاقی در گروه‌های مورد نظر قرار گرفتند. در طی آزمایش‌ها، تمام حیوانات در قفس‌های انفرادی پلی‌اتیلنی با ابعاد (۲۶، ۵۰، ۲۵ سانتی‌متر) و در یک اتاق با درجه حرارت ثابت (۲ ± ۲۲) و سیکل شبانه‌روزی منظم (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند و آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار داشت. مطالعه‌ی حاضر در کمیته‌ی پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج با کد ۱۲۰۲۱۴۰۴۹۴۲۰۳۳ تأیید و ثبت شد.

داروهای مورد استفاده در این مطالعه، مرفین سولفات، داروهای بی‌هوش‌کننده شامل اورتان، کتامین و زایلوسین بود. مواد مورد استفاده، لاتکس فلویورسانت (Fluorercent Latex Microbeads)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، سالین بافر شده فسفاتی استریل (PBS)، پودر سیتوکروم C، پارافرمالدیید، محلول بافر لیز (Lysis Buffer)، نوروتورفیک مشتق از مغز (BDNF Emax Immunoassag). وسایل و دستگاه‌های مورد نیاز شامل لوازم تشریح (تیغ جراحی، قیچی، پنس و

لوله‌های تراشه و غیره)، سرنگ انسولین جهت تزریق دارو، سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری، ست کنترل‌کننده‌ی حرارت همراه با صفحه‌ی نمایش درجه حرارت به صورت تنظیم شونده، دستگاه هموژنایزر، دستگاه ELISA reader، استریو تاکسی ساخت شرکت استولتینگ (Stoelting)، مته‌ی دندان‌پزشکی جهت سوراخ کردن جمجمه‌ی موش، قفس‌های مجهز به چرخ گردان، ماز آبی موریس جهت ارزیابی حافظه‌ی فضایی، نرم‌افزار نروتریس ۲۳، ورژن ۱ (Neuro Trace)، رایانه برای دریافت و تجزیه و تحلیل داده‌های الکتروفیزیولوژی و قفس فارادی استفاده شد.

برای انجام آزمایش، حیوانات با تزریق زیرجلدی مرفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) دو بار در روز با فاصله‌ی ۱۲ ساعت به مدت ۱۰ روز همزمان به ورزش ارادی به صورت مزمن، وابسته شدند. تجویز مزمن مرفین، تولید وابستگی فیزیکی و روانی می‌کند. تظاهرات فیزیکی وابستگی (نشانه‌های رفتاری و Autonomic) به عنوان قطع مرفین در نظر گرفته شد. موش‌های ورزشکار کنترل و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار، پس از آشنا شدن با دستگاه تریدمیل مدل ۵ لاین (شرکت فنی مهندسی کیمیا کهربای مبین ساخت ایران)، هر روز به مدت یک ساعت دویدند. این گروه‌ها در ابتدا با سرعت ۵ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه‌ی اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه‌ی بعد و سپس ۱۷ متر در دقیقه برای ۵۰ دقیقه‌ی آخر با شیب صفر درجه ورزش کردند.

ماز آبی، یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره‌ی مشکی (قطر ۱۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۵ سانتی‌متر) است که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متری از آب ۲ ± ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد پر شد. یک سکوی Plexiglass روشن (با قطر ۱۱ سانتی‌متر) ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع شمال شرقی، جنوب شرقی، شمال غربی، جنوب غربی قرار داده شد. این سکو توسط یک پایه، روی کف مخزن نگهداری می‌شد. سکوی فوق فقط وسیله‌ای برای فرار حیوان از آب بود. اتاقی که ماز در آن قرار داشت، حاوی اجسام و علامت‌های اضافی تعبیه شده از قبیل پوستر، قفسه، پنجره و غیره بود. حرکت و رفتار حیوان به وسیله‌ی یک دوربین تلویزیونی مادون قرمز که در ارتفاع دو متری بالای ناحیه مرکزی مخزن قرار گرفته ردیابی و تشخیص داده و کنترل می‌شد. سیگنال تلویزیونی دیجیتال وارد یک سیستم ردیاب کامپیوتری شده که حرکت موش را هر ۱۰۰ میلی ثانیه ارزیابی و ذخیره می‌کند، از این رو امکان ثبت دقیق مسیر شنای موش در هر بار آموزش فراهم می‌شد (۱۱).

برای جلوگیری از اثرات حاد تزریق مرفین، آموزش در ماز آبی، ۲ ساعت بعد از تزریق مرفین از روز ۱۱ بعد از شروع ورزش ارادی شروع شد. حیوان، یک ساعت قبل از شروع آموزش به صورت قفس‌های انفرادی به منظور سازش با محیط جدید به اتاق ماز آبی حمل گردیدند. به منظور یادگیری فضایی، آموزش حیوانات در ماز آبی طی ۵ روز انجام گرفت. هر موش، ۲ بار در روز (۲ آزمایش در روز) برای مدت ۶۰ ثانیه از یکی از کناره‌های دیواره‌ی ماز به صورت تصادفی به داخل آب رها می‌گردید تا با استفاده از علایم محیطی، محل سکوی پنهان در زیر آب را پیدا نماید و به موش اجازه داده می‌شد به مدت ۲۰ ثانیه روی صفحه باقی بماند. در صورتی که موش، قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نباشد، با دست به طرف آن هدایت خواهد شد. این پروتکل، تست خوبی برای ارزیابی اثر ورزش بر روی یادگیری و حافظه است که تفاوت‌ها را بهتر نشان می‌دهد (۱۲).

سیتوکروم C در آب مقطر استریل با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر حل گردید، سپس سالین بافر شده فسفاتی استریل (PBS)، حاوی ۰/۱ درصد سرم BSA و پروتیئن مهارکننده (TrkB/IgG) جهت تهیه‌ی محلول Stock (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شده بود. لاتکس فلویورسانت Microbeads به عنوان یک حامل، جهت آزاد کردن دارو به داخل هیپوکامپ استفاده گردید. این پوشش دارویی Microbeads به عنوان سیستم رهاکننده‌ی درون بدنی (in vivo) برای ارزیابی اثرات نوروتروفین‌ها بر روی نورون‌ها استفاده می‌شود. پوشش دارویی Microbeads در شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با یک مخلوط ۱ به ۵ microbeads با TrkB/IgG (۵ میکروگرم در میکرولیتر در PBS حاوی ۰/۱ درصد BSA) و سیتوکروم C (۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر در آب مقطر) خوابانده شد. صبح روز بعد، این دو محلول به مدت ۳۰ دقیقه با g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس در آب استریل جهت تهیه‌ی یک غلظت ۱۰ درصد نهایی مجدداً سوسپانسیون شده‌اند (۱۳).

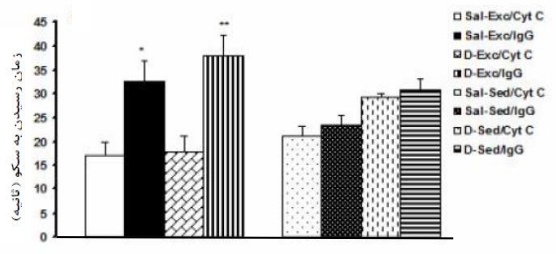
تزریق آنتی‌بادی و سیتوکروم C بلافاصله قبل از شروع دوره‌ی ورزش، به ترتیب به گروه‌های ورزش کرده و ورزش نکرده به داخل هیپوکامپ راست و چپ با استفاده از Fluorescent Latex Microbeads صورت گرفت. در این

پژوهش، دوبار تزریق آنتی‌بادی در روز اول و ششم در فرایند ورزش ارادی انجام گردید. بعد از ۲ ساعت تزریق مرفین، موش‌ها با کتامین (Xylazine ۱۰ mg/kg + Ketamin ۷۰ mg/kg) بی‌هوش شدند و سپس در داخل دستگاه استریو تاکس قرار داده و بعد از تراشیدن موی سر و تمیز کردن با بتادین، جراحی صورت گرفت. مواد با سرنگ هامیلتون با حجم ۲ میکرولیتر به صورت آهسته در ظرف، ۱۵ دقیقه به داخل هیپوکامپ راست و چپ تزریق گردیدند. موش‌ها بعد از به هوش آمدن در داخل دستگاه ورزش قرار داده شدند. بعد از پایان دوره‌ی ارزیابی حافظه‌ی فضایی در روز ۱۷ (بعد از تست پروب Probe)، موش‌های هر گروه به دنبال بی‌هوشی، توسط گیوتین کشته شده و بعد از تشریح مغز، هیپوکامپ آن‌ها جدا شد و هیپوکامپ چپ را داخل پارافرمالدیید ۴ درصد در بافرفسفات با (pH = ۴/۷) قرار گرفت تا برای شمارش نورونی مورد استفاده قرار گیرد. هیپوکامپ راست در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره گردید تا جهت تعیین میزان پروتئین BDNF توسط کیت الیزا (ELISA) به کار رود. هیپوکامپ چپ موش‌ها پس از ثابت شدن در داخل پارافرمالدهید ۴ درصد در M ۰/۱ بافر فسفات و در pH = ۴/۷ و شستشو با آب مقطر با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون مراحل پردازش نمونه‌های بافتی شامل آب‌گیری توسط اتانول و شفاف‌سازی با گزیلول و آغشته‌ساز توسط پارافین مایع انجام شد. در مرحله‌ی بعد قالب‌گیری با پارافین انجام گردید. سپس برش‌های کرونال ۱۰ میکرومتری از مغز گرفته تا به مقطع هیپوکامپ بر طبق اطلس پاکسینوس- واتسون برسیم.

در تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و نیز برای داده‌های مکرر از اندازه‌گیری مکرر استفاده گردید. همچنین از آزمون تعقیبی Tukey، جهت تعیین تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. نتایج در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) تحلیل گردید. اطلاعات به صورت خطای معیار و میانگین برای هر گروه ارائه شد و سطح معنی‌داری، p value < ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

نتایج فاز یادگیری در طول ۵ روز آموزش ماز آبی، در نمودار ۱، نشان داده شد. اطلاعات موبوط به مسافتی که موش‌ها جهت رسیدن به سکو، شنا کرده‌اند مشابه با الگوی زمان رسیدن به سکو (Latency) بوده است لذا در این‌جا، نتایج مربوط به زمان رسیدن به سکو ارائه گردید.



نمودار ۱: اثر مهار گیرنده‌ی BDNF در طول دوره‌ی ورزش بر زمان رسیدن به سکو در فاز اکتساب یادگیری

*: نشان‌دهنده گروه موش‌های ورزشکار کنترل دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و گروه ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۴۴)، (Sal-Exc/Cyt C and Sal-Exc/IgG).

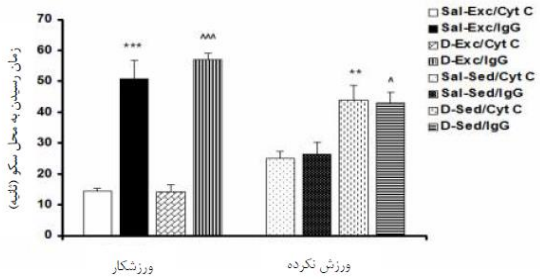
**: نشان‌دهنده‌ی موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۴۴)، (D-Exc/Cyt C and D-Exc/IgG).

برای تجزیه و تحلیل زمان رسیدن به سکوی مخفی، از آنالیز واریانس ۳ طرفه با اندازه‌گیری مکرر داده‌ها (مرفین، ورزش، روزهای آموزش) استفاده گردید. تمامی گروه‌ها، محل سکو را در طول ۵ روز آموزش، یاد گرفتند و کاهش زمان رسیدن به سکو با پیشرفت روزهای آموزش، در نمودار ۱ نشان داده شد. آنالیز آماری در فاز اکتساب یادگیری، اثر معنی‌داری ورزش (p value = ۰/۰۰۶، $F_{1.51}$ = ۵/۲۷)، اثر معنی‌داری مرفین (p value = ۰/۰۳۴، $F_{3.255}$ = ۳/۱۱)، تعامل معنی‌دار بین (ورزش، مرفین) (p value = ۰/۰۲، $F_{3.51}$ = ۳/۷۵) و اما فقدان تعامل بین فاکتورهای (مرفین، ورزش، روزهای آموزش) (p value = ۰/۴۷، $F_{12.204}$ = ۰/۹۷۹) نشان داده شد. مقایسه بین گروه‌ها نشان داد، زمان رسیدن به سکوی مخفی در گروه موش‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (Sal-Exc/Cyt C) و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (D-Exc/Cyt C)، به صورت معنی‌داری، کمتر از زمان گروه ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (Sal-Exc/IgG) و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (D-Exc/IgG) در روز ۵ آموزش بوده است (به ترتیب، p value = ۰/۴۴، p value = ۰/۰۰۰۴) (نمودار ۱). این یافته‌ها نشان می‌دهد که مهار گیرنده‌ی BDNF، موجب معکوس نمودن بهبود یادگیری فضایی ناشی از ورزش گردید، اما در موش‌های گروه ورزش نکرده، هیچ اثری نداشت.

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، موش‌های

گروه ورزشکار (Sal-Exc) و گروه وابسته به مرفین ورزشکار (D-Exc) دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (Cyt C) بر عکس گروه دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی، در زمان کم‌تری به سکو رسیدند (نمودار ۱: فقط زمان رسیدن به سکو در روز ۵ آموزش را نشان می‌دهد)، بنابراین، ورزش به طور مؤثری موجب بهبود یادگیری شد.

نتایج آزمون به خاطرآوری حافظه‌ی فضایی، در نمودار ۲ نشان داده شد. آنالیز واریانس دو طرفه بر روی زمان رسیدن به محل سکو، تعامل معنی‌دار بین (ورزش، مرفین) (F3.51 = ۲۳/۱۶ ،p value = ۰/۰۰۰۱) را نشان می‌دهد. مقایسه‌ی بین گروه‌ها نشان داد که زمان رسیدن به محل سکو در گروه‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C، به صورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (IgG) و همچنین گروه‌های ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C یا دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی می‌باشد. همچنین زمان رسیدن به محل سکو در گروه‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C یا دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی، طولانی‌تر می‌باشد (به ترتیب، p value = ۰/۰۱، p value = ۰/۰۳۴) (نمودار ۲).



نمودار ۲: اثر مهار گیرنده‌ی BDNF به وسیله‌ی پروتئین مهارکننده‌ی تیروزین کیناز (TrkB-IgG) در طول ورزش ارادی بر روی زمان رسیدن به محل سکو در زمان آزمون به خاطرآوری حافظه‌ی فضایی

***: نشان‌دهنده‌ی گروه موش‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و گروه ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۰۰۱) (Sal-Exc/Cyt C and Sal-Exc/IgG).

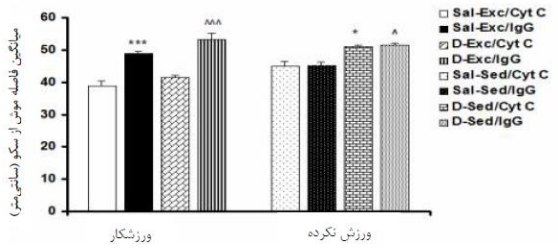
^^^: نشان‌دهنده‌ی موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۰۰۱) (D-Exc/Cyt C and D-Exc/IgG).

**: نشان‌دهنده‌ی گروه موش‌های ورزش نکرده دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم (p value = ۰/۰۱) (Sal-Sed/Cyt C and D-Sed/Cyt C).

^: گروه موش‌های ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۳۴) (Sal-Sed/IgG and D-Sed/IgG).

همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، گیرنده‌ی BDNF موجب معکوس شدن اثرات مفید ورزش بر روی حافظه‌ی فضایی با طولانی‌تر کردن زمان رسیدن به محل سکو در گروه‌های ورزشکار گردید.

آنالیز واریانس دو طرفه بر روی میانگین فاصله‌ی شنا از مرکز محل سکو (Proximity) (نمودار ۳) تعامل معنی‌دار بین (ورزش، مرفین) (p value = ۰/۰۰۰۱، $F_{3,51}$ = ۹/۵۸) را نشان داد. مقایسه‌ی بین گروه‌ها نشان داد که گروه موش‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم (Sal-Exc/Cyt C) و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (D-Exc/Cyt C) در مقایسه با گروه موش‌های ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (Sal.Sed/Cyt C) و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم (D- C Sed/Cyt C) به صورت معنی‌داری میانگین فاصله‌ی شنا از مرکز محل سکوی کم‌تری داشتند (به ترتیب، p value = ۰/۰۲۲، p value = ۰/۰۰۰۱). همچنین گروه‌های ورزشکار دریافت‌کننده سیتوکروم C (Sal-Exc/Cyt C) و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم (C D-Exc/Cyt C) در مقایسه با گروه ورزشکار کنترل دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (Sal-Exc/IgG) و گروه وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (D-Exc/IgG) به صورت معنی‌داری با فاصله‌ی کم‌تری نسبت محل سکو، شنا کردند (میانگین فاصله‌ی شنا از مرکز محل سکوی کم‌تری داشتند) (هر دو، p value = ۰/۰۰۰۱).



نمودار ۳: میانگین فاصله‌ی موش از محل سکو (Proximity) در طول آزمون به خاطرآوری حافظه‌ی فضایی در ماز آبی

***: نشان‌دهنده‌ی گروه موش‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و گروه ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۰۰۱) (Sal-Exc/Cyt C and Sal-Exc/IgG).

^^^: نشان‌دهنده‌ی موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۰۰۱) (D-Exc/Cyt C and D-Exc/IgG).

**: نشان‌دهنده‌ی گروه موش‌های ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم (p value = ۰۳۹) (Sal-Sed/Cyt C and D-Sed/Cyt C).

^: گروه موش‌های ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۱۸) (S al-Sed/IgG and D-Sed/IgG).

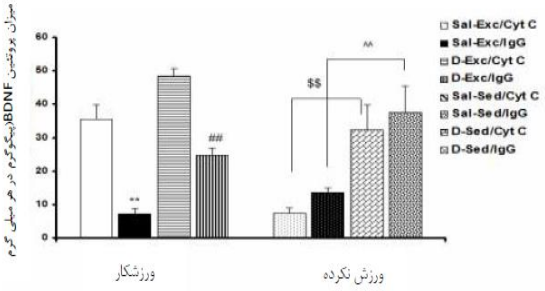
نمودار ۳، میانگین فاصله‌ی موش از محل سکو (Proximity) در طول آزمون به خاطرآوری حافظه‌ی فضایی در ماز آبی را نشان می‌دهد. گروه‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (IgG)، میانگین فاصله‌ی بیشتری را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (Cyt C) داشتند که حاکی از مهار گیرنده‌ی BDNF به وسیله‌ی پروتئین مهارکننده‌ی تیروزین کیناز (TrkB-IgG) در طول ورزش ارادی بر روی حافظه‌ی فضایی می‌باشد. گروه ورزش نکرده وابسته به مرفین دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (IgG) و سیتوکروم C (Cyt C)، میانگین فاصله از محل سکوی بیشتری را نسبت به گروه سالین داشتند.

هیچ تفاوت معنی‌داری بین زمان رسیدن به محل سکو، مدت زمان سپری شده در ناحیه‌ی هدف و میانگین فاصله از محل سکو در بین گروه‌های ورزشکار و ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی IgG و همچنین در بین گروه‌های ورزش نکرده‌ی وابسته به مرفین یا سالین دریافت‌کننده‌ی آنتی‌بادی (IgG) یا سیتوکروم C (Cyt C) دیده نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری در سرعت شنا کردن گروه‌ها نیز مشاهده نگردید (p value = ۰/۷۷، $F_{7.51}$ = ۰/۵۹).

یافته‌های مربوط به اثر ورزش و مهارکننده BDNF بر روی میزان پروتئین BDNF هیپوکامپ در نمودار ۴ نشان داده شد. آنالیز واریانس سه طرفه (ورزش، مرفین، آنتی‌بادی) بر روی میزان پروتئین BDNF اثر معنی‌داری ورزش (p value = ۰/۰۲، $F_{1.50}$ = ۴/۵۹) و مرفین (p value = ۰/۰۰۰۱، $F_{1.50}$ = ۲۳/۸)، آنتی‌بادی (p value = ۰/۰۳۸، $F_{1.50}$ = ۴/۵۵) و تعامل معنی‌دار بین (ورزش، آنتی‌بادی) (p value = ۰/۰۰۱، $F_{1.50}$ = ۱۲/۶۵) را نشان داده است.

مقایسه‌ی بین گروه‌ها نشان داد که ورزش، موجب افزایش میزان پروتیین BDNF هیپوکامپ در گروه‌های ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (Sal-Exc/Cyt C) و گروه موش‌های ورزش نکرده دریافت‌کننده سیتوکروم C (Sal-Sed/Cyt C) و همچنین بین گروه موش‌های وابسته به مرفین ورزشکار دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (D-Exc/CytC) و موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده‌ی دریافت‌کننده‌ی سیتوکروم C (D-Sed/Cyt C)، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب p value = ۰/۰۱۳، p value = ۰/۰۴۲) که نمایان‌گر افزایش میزان پروتئین BDNF در گروه‌های ورزشکار در مقایسه با گروه‌های ورزش نکرده می‌باشد.

نمودار ۴، اثر مهار گیرنده‌ی BDNF در طول دوره ورزش بر روی میزان پروتیئن BDNF هیپوکامپ که میزان پروتئین BDNF به صورت پیکوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین کل بافت محاسبه شده است. نتایج به صورت میانگین ± میانگین خطای معیار بیان گردید. ورزش، موجب افزایش میزان پروتیین BDNF گردید، در حالی که مهار گیرنده‌ی BDNF میزان پروتئین گروه ورزشکار دریافت‌کننده آنتی‌بادی (Exc/IgG) را کاهش داد.



نمودار ۴: اثر مهار گیرنده‌ی BDNF در طول دوره‌ی ورزش بر روی میزان پروتئین BDNF هیپوکامپ

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که ورزش ارادی، موجب افزایش تعداد نورون‌های شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ موش‌های وابسته و غیر وابسته به مرفین ورزشکار گردید که مهار گیرنده‌ی BDNF موجب کاهش معنی‌دار این اثر ورزش در هر دو گروه ورزشی گردید. این یافته نشان می‌دهد که افزایش تعداد نورون‌ها ناشی از ورزش به مکانیزم با واسطه‌ی BDNF می‌باشد. این یافته مورد تأیید مطالعات دیگر می‌باشد که اثرات مثبت ورزش را بر نورون‌زایی نشان داده‌اند. پیشنهاد گردید که نورون‌زایی هیپوکامپ به دنبال ورزش توانایی یادگیری و حافظه را زیاد می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز مزمن مرفین، تعداد نورون‌های شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ را در موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده، کاهش داد. در تأیید این یافته در مطالعات قبلی نشان داده شد، که در معرض‌گذاری مزمن مرفین و هرویین نورون‌زایی را تضعیف می‌کند و تراکم خارهای دندریتی را کاهش می‌دهد. در این مطالعه، ورزش تنها توانست تعداد نورون‌های ناحیه‌ی شکنج دندانه‌دار را افزایش دهد. در تأیید این یافته، در مطالعه‌ای نشان داده شد که شکنج

دندانه‌دار، ناحیه‌ای است که پرولیفراسیون و بقاء سلولی در آن رخ می‌دهد و در سراسر دوران حیات جونـدگان، تولیـد نورون‌های تازه می‌نمایـد. ایـن ناحیـه حـاوی سـلول‌هـای بنیادی و اجدادی نورونی است.

علاوه بر افزایش BDNF در گروه‌های ورزشکار وابسـته و غیر وابسته به مرفین اشـاره شـده در ایـن مطالعـه، ایـن افزایش در گروه‌های ورزش نکرده‌ی وابسته به مـرفین نیـز رخ داد. همان‌طوری که قـبلاً اشـاره شـد، مهـار گیرنـده‌ی BDNF، میـزان پـروتئین BDNF ناشـی از مـرفین را در موش‌های وابسته به مرفین ورزش نکرده، مهار نکـرد. ایـن یافته ممکن است ناشی از تنظیم اپی‌ژنتیکی ژن BDNF و پلی‌مورفیسم ژن BDNF باشد (۱۴). نقش میـزان BDNF افزایش یافتـه در اسـتفاده‌کننـدگان داروهـای مـورد سـوء مصرف، ناشناخته باقی مانده است. BDNF افـزایش یافتـه ممکن است در شکل‌پذیری سیناپسی دخالت داشته باشد.

ایـن مطالعـه نشـان داد کـه فعالیـت فیزیکـی، شـدت وابسـتگی بـه مـرفین را کـاهش داده اسـت و نیـز آسـیب شناختی ایجاد شده در موش‌های وابسـته بـه مـرفین را از طریق مکانیسم با واسطه‌ی پروتئین مهارکننـده‌ی (TrkB) بهبـود بخشـید. همچنـین ورزش، موجـب افـزایش شکل‌پـذیری سیناپسـی در شـکنج دندانـه‌دار هیپوکامـپ موش‌های وابسته به مرفین گردیـد. بنـابراین ورزش ارادی ممکن است به عنوان یک روش بالقوه، برخی از پیامـدهای تخریبـی رفتـاری ناشـی از داروهـای مـورد سـوء مصـرف همچون نقایص شناختی را درمان نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بـا کد ۱۲۰۲۱۴۰۴۹۴۲۰۳۳ در دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد یاسوج می‌باشد. بدین‌وسـیله از معاونـت پـژوهش دانشـگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج و همچنین کلیه‌ی کسانی که مـا را در انجام پژوهش یاری رساندند، تقدیر می‌شود.

References

1. Pu L, Bao GB, Xu NJ, Ma L, Pei G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. J Neurosci 2002; 22(5): 1914-21.
2. Kelley AE. Memory and Addiction: Shared Neural Circuitry and Molecular Mechanisms. Neuron 2004; 44(1): 161-79.
3. Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. Neurobiol Learn Mem 2002; 78(3): 637-647.
4. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh M. Long-term potentiation as an electrophysiological assay for morphine dependence and withdrawal in rats: an in vitro study. J Neurosci Meth 2003; 124(2):189-96.
5. Tamminga CA. Adult neurogenesis and drug abuse. Am J Psychiatry. 2004; 16 (3): 4-26.
6. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. J Pharmacol Sci 2003; 19(4): 267-70.
7. Cotman CW, Berchtold NC. Physical activity and the maintenance of cognition: Learning from animal models. Alzheimer's Dement 2007; 3(2 Suppl): S30-7.
8. Vanpraag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J Neurosci 2005; 25(38): 8680-5.
9. Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci 2007; 8(11): 844-58.
10. Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, et al. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. Neurosci Lett 2005; 383(3): 241-5.
11. Akhavan MM, Emami-Abarghoie M, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Vafaei AA, Bandegi AR, et al. Serotonergic and noradrenergic lesion suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. Neuroscience 2008; 151(4): 1173-83.
12. Ding Q, Vaynman S, Akhavan MM, Ying Z, Gomezpinilla F. Insulin- like growth factor interfaces with brain derived neurotrophic factor mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise - induced cognitive function. Neuroscience 2006; 140(3): 823-33.
13. Riddle DR, Katz LC, Lo DC. Focal delivery of neurotrophins into the central nervous system using fluorescent latex microspheres. Biotechniques 1997; 2(3): 928-34.
14. Bao G, Kang L, Li H, Li Y, Pu L, Xia P, et al. Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. Neuropsychopharmacology 2007; 32(8): 1738-49.