

تأثیر تمرینات زود هنگام استقامتی بر بهبود ضایعات مغزی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و بیان پروتئین A2A به دنبال سکتگی ایسکمیک مغزی در موش صحرایی

مهدی صیدیوسفی^۱، ضیاء فلاح محمدی^۲، مهتاب معظمی^۳، علی یعقوبی^۴، زینب فغفوری^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ایسکمی/ریپرفیوژن مغزی، باعث ایجاد آسیب‌های ساختاری و عملکردی در هیپوکامپ می‌شود. فعالیت فیزیکی، یک روش ضروری و کارآمد در توان‌بخشی زود هنگام پس از سکتگی مغزی است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین استقامتی زود هنگام بر روی ترمیم، بر بهبود نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و بیان پروتئین A2A به دنبال ایسکمی/ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر بود.

روش‌ها: ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar به طور تصادفی به سه گروه (Sham، ایسکمی و کنترل و نیز ایسکمی و تمرین) تقسیم شدند. موش‌های گروه ایسکمی و تمرین، ۲۴ ساعت پس از القای ایسکمی به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته روی نوار گردان دویدند. ایسکمی با انسداد هر دو شریان کاروتید مشترک به مدت ۴۵ دقیقه ایجاد شد. از آزمون Ladder برای بررسی وضعیت عملکردی و از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) جهت بررسی میزان مرگ نورونی استفاده گردید. همچنین، جهت بررسی بیان پروتئینی، از روش Immunohistochemistry استفاده شد.

یافته‌ها: ایسکمی مغزی، با افزایش مرگ سلول‌های عصبی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و کاهش عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی در حیوانات همراه بود. تمرین زود هنگام به طور معنی‌داری باعث کاهش مرگ سلولی و کاهش اختلال شناختی و یادگیری حرکتی شد. همچنین، بیان پروتئین A2A در گروه ایسکمی و تمرین نسبت به گروه ایسکمی + کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: تمرین زود هنگام روی نوار گردان، به عنوان یک محرک توان‌بخشی، موجب اثرات محافظتی در برابر مرگ سلولی و بهبود عملکرد حرکتی خواهد شد.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، ایسکمی، ریپرفیوژن

ارجاع: صیدیوسفی مهدی، فلاح محمدی ضیاء، معظمی مهتاب، یعقوبی علی، فغفوری زینب. تأثیر تمرینات زود هنگام استقامتی بر بهبود ضایعات مغزی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و بیان پروتئین A2A به دنبال سکتگی ایسکمیک مغزی در موش صحرایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛

۳۷ (۵۲۶): ۴۸۵-۴۹۲

مقدمه

مشخص شده است که مدیریت زود هنگام بیماران پس از سکتگی ایسکمیک مغزی، مرگ و میر ناشی از بیماری را کاهش می‌دهد و بازبازی عملکردی را بهبود می‌بخشد (۳). پژوهشگران بسیاری، شروع زود هنگام تمرینات ورزشی در ۲۴ ساعت اولیه پس از سکتگی مغزی، جهت بهبود ناتوانی‌های جسمانی و کاهش ضایعات مغزی را توصیه کرده‌اند (۶-۴). همچنین، شروع تمرینات زود هنگام ورزشی در ۲۴ ساعت اولیه، به طور

ایسکمیک مغزی، یکی از جدی‌ترین اختلالات عصبی و شایع‌ترین علت معلولیت دایمی در سراسر جهان است (۱). در ساعات ابتدایی، ایسکمیک اغلب با ایجاد خسارات ماندگار در مغز، باعث کاهش درازمدت در عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی خواهد شد و در نهایت، می‌تواند به طور قابل توجهی به کاهش کیفیت زندگی بیماران بینجامد (۲).

- ۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
- ۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، ساری، ایران
- ۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
- ۵- دکتری تغذیه، مرکز تحقیقات سلامت غذایی (نمک)، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

نویسنده‌ی مسؤو: ضیاء فلاح محمدی

Email: zia-falm@umz.ac.ir

۲- گروه ایسکمی و کنترل ($n = 7$) که حیوانات تحت جراحی و القای ایسکمی مغزی قرار گرفتند و به صورت کنترل شده نگهداری شدند.
۳- گروه ایسکمی و ورزش ($n = 7$) که پس القای ایسکمی مغزی، حیوانات به انجام تمرینات استقامتی بر روی نوار گردان پرداختند. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی سمنان (با کد IR.SEMNAN.REC.1397.057) تأیید و تمام مراحل آن مطابق بیانیه‌ی Helsinki انجام شد. همچنین، معیارهای ورود به این مطالعه شامل وزن بین ۳۰۰-۲۵۰ گرم، جنس نر و نژاد Wistar بودند. معیارهای خروج از مطالعه، شامل عدم توانایی در انجام تمرین، آسیب دیدگی حین انجام تمرین و مرگ حین جراحی و یا انجام تمرین بود.

القای ایسکمی مغزی: موش‌ها با استفاده از کتامین زایلازین با دز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۳۰ میلی‌گرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم زایلازین) از طریق تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند (۱۸). هر دو شریان کاروتید مشترک از صفحه‌ی کاروتید خود آزاد و سپس، عصب واگ به دقت از شریان کاروتید جدا گردید. سپس، شریان‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از گیره‌های جراحی مسدود شدند. حیوانات پس از عمل جراحی با دسترسی آزاد به آب و غذا به مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) جداگانه نگهداری شدند (۱۹).

شیوه‌نامه‌ی تمرینات: ۲۴ ساعت پس از ایسکمی، برنامه‌ی تمرین بر روی نوار گردان ویژه‌ی حیوانات به مدت ۸ هفته آغاز شد. ابتدا جهت آشناسازی، موش‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵ متر/دقیقه و شیب صفر درجه، به مدت دو روز به فعالیت پرداختند. تمرین اصلی، با سرعت ۱۸ متر/دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و شیب صفر درجه به مدت ۵ روز در هفته‌ی اول، آغاز و سپس، مدت و شدت تمرین و شیب تدریجاً به طور فزاینده افزایش یافت؛ به طوری که حیوانات در هفته‌ی هشتم به مدت ۵۰ دقیقه با سرعت ۳۰ متر/دقیقه با شیب ۱۰ درجه به تمرین پرداختند (۲۰). همچنین، جهت کنترل استرس ناشی از تردمیل، شوک الکتریکی به طور کامل از شیوه‌نامه‌ی تمرینات حذف شد.

آزمون عملکردی: جهت بررسی عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی، از آزمون استاندارد راه رفتن ماهرانه روی نردبان افقی یا آزمون Ladder استفاده شد. در ساعت صفر (پیش از القای ایسکمی)، ساعت ۲۴ و هفته‌ی هشتم (۲۴ ساعت و ۸ هفته) پس از القای ایسکمی آزمون انجام شد و عملکرد حیوانات با استفاده از دوربین فیلمبرداری (Canon, Japan) با کیفیت بالا ثبت و نقص‌های رفتاری و عملکردی ارزیابی شد. در پایان، تعداد خطاهای هر حیوان با مقیاس استاندارد این آزمون مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت (۲۱).

آماده‌سازی بافت: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها بیهوش شدند. پرفیوژن Transecardiac با ۰/۹ درصد سالین، ۴ درصد پارافرمالدهید در ۰/۱ مولار بافر فسفات ($pH = 7/4$) به

قابل توجهی حجم انفارکتوس مغزی را کاهش می‌دهد (۷)، هماهنگی حرکتی و نقص عصبی را بهبود می‌بخشد (۸) و مانع پیشرفت پاتولوژیک این بیماری می‌شود (۶). با این وجود، در خصوص شروع زودهنگام تمرینات ورزشی، نتایج متناقض است. مشاهده شده است که تمرینات ورزشی در ۲۴ ساعت اولیه پس از سکته‌ی ایسکمی، آسیب بافت کورتکس را تشدید می‌کند (۹). همچنین، با افزایش سیتوکاین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو، ضایعات مغزی افزایش می‌یابد (۱۰). فعال‌سازی نیتریک اکسید سنتاز و هایپرگلیکولیز در مراحل اولیه پس از ایسکمی نیز باعث افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود (۱۱).

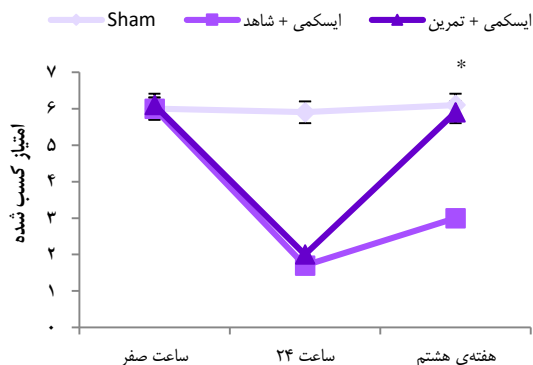
با توجه به این که هنوز نتایج کافی برای اثبات مفید بودن انجام زود هنگام تمرینات ورزشی در ۲۴ ساعت اولیه پس از سکته‌ی ایسکمی مغزی وجود ندارد (۱۲)، شناخت مکانیسم‌های مولکولی دخیل در توان بخشی و بهبود سکته‌ی مغزی ضروری است. ثابت شده است در دقایق اولیه پس از آسیب ایسکمی، سطح Adenosine triphosphate (ATP) خارج سلولی به دلیل مهار جریان خون مغزی در طی ایسکمی و کمبود مواد مغذی در مغز، کاهش می‌یابد (۱۳). که بلافاصله در سطح گیرنده‌های A2A آدنوزین (A2A adenosine receptor یا A2A) تنظیم افزایشی اتفاق می‌افتد و طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی تنظیم می‌شوند (۱۴).

همچنین مشخص شده است که در ساعات اولیه پس از ایسکمی مغزی، فعال شدن A2A اثرات حفاظتی عصبی اعمال می‌کند (۱۶-۱۵). به همین دلیل، تنظیم افزایشی در A2A‌ها از طریق انجام تمرینات زودهنگام استقامتی در ۲۴ ساعت اول پس از آسیب ایسکمی، ممکن است عامل کلیدی و یک هدف جدید در مدیریت اولیه‌ی این بیماری باشد (۱۷). سکته‌ی ایسکمی مغزی یک رویداد ناگهانی است و درمان‌های پیش‌گیرانه همیشه امکان‌پذیر نیست. از این رو، مدیریت زودهنگام این بیماری، یک نیاز حیاتی است. سؤال مطالعه‌ی حاضر این بود که «آیا تمرینات زودهنگام استقامتی روی نوار گردان می‌تواند در کاهش حجم ضایعه در نورون‌های CA1 هیپوکامپ و بهبود عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی و بیان A2A پس از سکته‌ی ایسکمیک مغزی مؤثر باشد؟».

روش‌ها

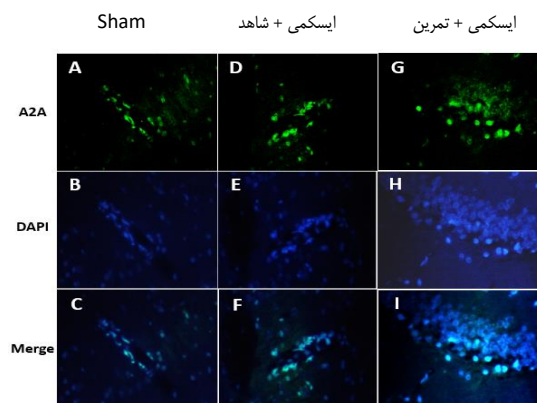
حیوانات: ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar خریداری و با دسترسی آزاد به غذا و آب در محیط کنترل شده (با رطوبت ۲۲-۲۴ درصدی سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت) نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی ساده به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه Sham ($n = 7$) که جهت کنترل اثرات مربوط به بیهوشی و القای ایسکمی، تمام مراحل جراحی و مراقبت‌های بعد از آن بدون القای ایسکمی انجام شد.

در پایان هفته‌ی هشتم، تعداد خطاها در گروه ایسکمی و تمرین، نسبت به گروه ایسکمی و کنترل، کاهش معنی‌داری دیده نشد ($P < 0/050$) (شکل ۲).



شکل ۲. میانگین امتیاز کسب شده در گروه‌های مختلف
 * تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه ایسکمی ($P < 0/050$).

نتایج آزمون Ladder نشان داد که قبل از القای ایسکمی، اختلاف معنی‌داری بین ۳ گروه در میانگین خطاهای ایجاد شده وجود نداشت ($P = 0/710$). ۲۴ ساعت پس از سکت، تعداد خطاها به طور قابل توجهی در ۲ گروه ایسکمیک افزایش یافت ($P < 0/001$). نتایج نشان داد بیان پروتئین A2A یک الگوی افزایشی دارد (شکل ۳).



شکل ۳. ارزیابی و شمارش سلول‌ها در گروه Sham، گروه ایسکمی و کنترل و گروه ایسکمی و تمرین. در تمامی گروه‌ها، تصاویر ردیف اول (A-G) مربوط به اتصال آنتی‌بادی اولیه به پروتئین A2A و تصاویر ردیف دوم (B-H) مربوط به رنگ‌آمیزی تمامی هسته‌های سلولی با استفاده از 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) می‌باشد. تصاویر ردیف سوم (C-I) مربوط به ادغام تصاویر ردیف اول و دوم با هم می‌باشند؛ توسط میکروسکوپ فلورسانس با بزرگ‌نمایی $\times 400$ ، واکنش‌پذیری و بیان سلول‌ها ارزیابی و شمارش شدند.

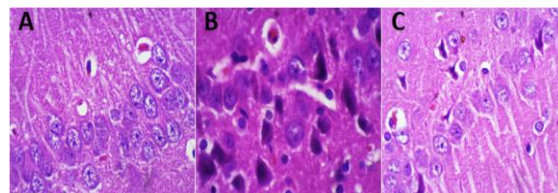
عنوان تثبیت‌کننده قرار گرفت. سپس، مغز حیوانات برداشته شد و به مدت ۳ روز در یک تثبیت‌کننده‌ی مشابه قرار گرفت. از مغز، بلوک‌های پارافینه تهیه شد. سپس، با توجه به اطللس Paxinus، بخش‌های کرونالی پارافینه در ضخامت ۷ میکرومتر برای روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، بین ۳/۳-۴/۲ میلی‌متر پشت برگما برش داده شد.

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (H&E): توسط دستگاه میکروتوم، از بلوک‌های پارافینه مقاطع کرونال به ضخامت ۶ میکرومتری آماده و با استفاده از هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی شدند و به منظور بررسی تغییرات Histomorphologic، توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 400$ بررسی شدند. سلول‌های عصبی با غشای هسته و هستک مشخص به عنوان سلول زنده و سلول‌های عصبی با تراکم رنگی بالا، به عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته شدند.

بررسی Immunohistochemistry از تکنیک Immunohistochemistry به روش Envision (۲۲) و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی A2A با کد orb338920 (ساخت شرکت Biorbyt کشور انگلستان) استفاده شد. در پایان بررسی، تصاویری با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپی تهیه و برای بررسی کیفیت واکنش، تصاویر با نرم‌افزار ImageJ نسخه ۱/۴۹ مورد واکاوی قرار گرفت.

یافته‌ها

سلول‌های عصبی زنده با غشای هسته و هستک مشخص در گروه Sham قابل مشاهده بودند. در حالی که سلول‌های مرده‌ی گروه ایسکمی و کنترل به صورت پر رنگ با تراکم رنگی بالا مشاهده شد (شکل ۱). سلول‌های مرده در گروه Sham در حدود ۶ درصد از جمعیت سلولی را شامل می‌شدند. همچنین، در گروه ایسکمی و کنترل، جمعیت سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/001$)؛ به طوری که سلول‌های مرده در حدود ۹۰ درصد از جمعیت سلولی را شامل می‌شدند. شروع زودهنگام تمرینات استقامتی، جمعیت سلول‌های مرده را به طور معنی‌داری تا حدود ۴۵ درصد نسبت به گروه ایسکمی و کنترل کاهش داد ($P = 0/020$).



شکل ۱. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در گروه‌های Sham (A)، ایسکمی و کنترل (B) و ایسکمی و تمرین (C). سلول‌های طبیعی با هسته‌ی روشن، هستک واضح و سیتوپلاسم صورتی و سلول‌های مرده با هسته و هستک نامشخص و سیتوپلاسم به صورت تیره رنگ قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی $\times 400$).

مقاومت در برابر ضایعات مغزی و کاهش مرگ سلولی و نیز بهبود نتایج آزمون‌های عملکردی شود (۲۶-۲۷).

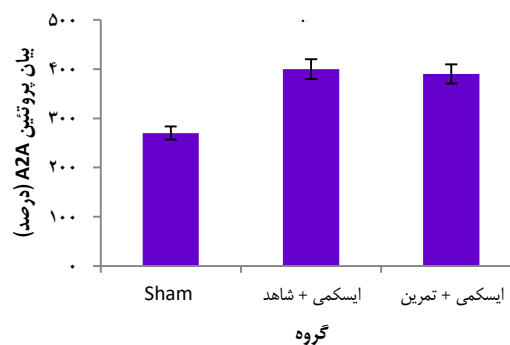
در مطالعه‌ی حاضر، جهت ارزیابی میزان ضایعه‌ی مغزی پس از سکنه‌ی ایسکمیک مغزی، از آزمون Ladder (۲۱) استفاده شد که نتایج حاصل نشان داد در روز صفر، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت، اما پس از گذشت ۲۴ ساعت از القای سکنه، اختلاف معنی‌دار بود؛ به طوری که کاهش معنی‌داری در عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی در حیوانات در گروه‌های ایسکمیک نسبت به گروه Sham ایجاد شد. Stout و همکاران، عملکرد حرکتی و مهارت قدم زدن را قبل و پس از القای سکنه‌ی ایسکمیک در موش‌های صحرایی با استفاده از آزمون Ladder ثبت کردند. در مطالعه‌ی آنان، در گروه ایسکمیک نسبت به گروه Sham، کاهش معنی‌داری در میزان عملکرد حرکتی - شناختی موش‌ها ایجاد شد (۲۸). در مطالعه‌ی حاضر، همچنین بهبود معنی‌داری در میزان عملکرد حرکتی حیوانات در گروه ایسکمیک و تمرین نسبت به گروه ایسکمیک و کنترل مشاهده شد.

انحطاط در نورون‌های هرمی هیپوکامپ پس از ایسکمیک مغزی، منجر به نقص در عملکرد و یادگیری در این ناحیه می‌شود (۲۹). در این باره، مکانیسم‌های متعددی جهت بازیابی عصبی از طریق تمرینات زودهنگام مطرح است. عامل نروتروفیک مشتق از مغز (Brain-derived neurotrophic factor یا BDNF) عامل مهم تغذیه‌ای مغز است که به صورت برجسته‌ای در هیپوکامپ بیان می‌شود (۳۰). فعالیت‌های ورزشی از طریق بیان BDNF، باعث افزایش تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های عصبی می‌شود که این امر برای تسهیل بازسازی نورون‌ها، انتقال سیناپسی و در نهایت، بهبود عملکرد حسی - حرکتی و شناختی پس از آسیب ایسکمیک/هیپوکسی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ ضروری است (۳۱).

یک مکانیسم دیگر، افزایش بیان VEGF است. افزایش سطوح VEGF سبب بقا، تکثیر، مهاجرت و نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال و در نهایت، موجب افزایش رگ‌زایی یا آنژیوژنز می‌شود (۳۲) که برای بهبود در مبادله‌ی اکسیژن و گلوکز در بافت دچار ایسکمیک و بازیابی عملکردی و شناختی بسیار اهمیت دارد (۳۳). در این رابطه نیز Chen و همکاران نشان دادند که انجام تمرینات زودهنگام استقامتی در ۲۴ ساعت اولیه پس از آسیب ایسکمیک مغزی از طریق مسیرهای VEGF و BDNF، افزایش آنژیوژنز، نوروژنز و در نهایت، اختلالات حرکتی و شناختی را پس از سکنه‌ی مغزی بهبود می‌بخشد (۳۴).

از سوی دیگر، فعال شدن A2Aها که به طور گسترده در هیپوکامپ و در پایانه‌های عصبی قرار دارند (۳۵)، با تسهیل در فعالیت VEGF، BDNF و به کارگیری گیرنده‌ی تیروزین کیناز B-Tropomyosin receptor kinase یا TrkB (۳۶-۳۸) و نیز با

همچنین، بر اساس شکل ۴، مشخص شد که القای سکنه‌ی ایسکمیک، موجب افزایش معنی‌دار در بیان A2A نسبت به گروه Sham شد ($P < 0/050$)، اما بین گروه ایسکمیک و تمرین و گروه ایسکمیک و کنترل، در بیان A2A تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/050$).



شکل ۴. درصد بیان پروتئین A2A حاصل از بررسی‌های Immunohistochemistry در گروه‌های مختلف * تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه Sham ($P < 0/050$).

بحث

در این مطالعه، تأثیر مدیریت زودهنگام سکنه‌ی ایسکمیک مغزی با استفاده از تمرینات استقامتی بر روی نوار گردان بر میزان عملکرد شناختی، یادگیری حرکتی و بیان پروتئین A2A در نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمیک گذرای مغزی در موش‌های صحرایی نر بررسی شد. نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، حساس‌ترین ناحیه به آسیب ایسکمیک/هیپوکسی هستند؛ به گونه‌ای که ۵ دقیقه انسداد کاروتید مشترک، باعث ایجاد ایسکمیک کامل در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ می‌شود (۱۳) و به دنبال آن، آبخاری از وقایع اولیه‌ی مولکولی شروع می‌شوند که باعث تشدید آسیب ناشی از ایسکمیک/رپر فیوژن می‌شود (۲۳).

یکی از مسیرهای اولیه در مرگ و بقای نورونی به دنبال آسیب ایسکمیک، فعال‌سازی گلوتامات و سمیت تحریکی آن در سیستم عصبی است. گلوتامات، یک ناقل عصبی تحریکی مهم در سیستم عصبی مرکزی است که نقش مهمی در تغییرات طولانی مدت بر رشد و بقای نورون‌ها دارد (۲۴).

تحریک زیاد گلوتامات و گیرنده‌های آن، موجب اختلال تعادل یونی درون سلولی به ویژه کلسیم سیتوزولی و سمیت نورون‌های قشری مغز خواهد شد (۲۵) که در نهایت، به مرگ نورونی منجر می‌شود (۲۳). تمرینات زودهنگام استقامتی، می‌تواند از طریق کاهش گلوتامات و افزایش بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات، منجر به ایجاد

فعالیت نیکوتین آمید آدنین دیونوکلئوتید فسفات اکسیداز، باعث افزایش آپوپتوز سلولی شد (۱۱). همچنین، به نظر می‌رسد شروع زودهنگام تمرینات پس از ایسکمی، با افزایش عوامل التهابی و استرس اکسیداتیو، موجب تشدید ضایعات مغزی می‌گردد (۹-۱۰).

از طرف دیگر، به دلیل وجود استرس در تمرینات ورزشی روی نوار گردان (۶) و تأثیر منفی استرس بر ساختار پلاستیسیته‌ی هیپوکامپ، تمرینات استقامتی بر روی نوار گردان آثار زیان‌باری روی سلول‌های عصبی در معرض حادثه‌ی ایسکمیک می‌گذارد (۷). بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، سعی شد از وارد کردن استرس به موش‌ها اجتناب شود. از این رو، شوک الکتریکی موجود در نوار گردان به طور کامل حذف شد.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که آغاز زودهنگام تمرینات ورزشی در ساعات اولیه پس از ایسکمیک مغزی، تأثیر مثبتی بر توان‌بخشی اولیه و مدیریت زودهنگام این بیماری دارد. زمانی که تمرینات استقامتی به عنوان یک محرک توان‌بخشی ۲۴ ساعت پس از آسیب ایسکمیک آغاز شود، به احتمال زیاد با تنظیم مکانیسم‌های حفاظتی عصبی و غیر عصبی باعث کاهش ضایعه‌ی وارده در سلول‌های عصبی هیپوکامپ و نیز بهبود عملکرد شناختی و یادگیری حرکتی می‌شود که می‌تواند به عنوان یک روش درمانی نوین مؤثر و بدون عارضه در کاهش ضایعات مغزی ناشی از ایسکمیک مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران در مرکز تحقیقاتی علوم ورزشی شهید میرغنی و سایر همکارانی که در انجام تحقیق حاضر مشارکت داشتند، سپاسگزاری می‌گردد.

افزایش انتشار نوروترانسمیترها، باعث بهبود حافظه (۳۱)، یادگیری (۳۹) و تسهیل در عملکرد حسی- حرکتی خواهد شد (۴۰). هر چند مطالعه‌ی در زمینه‌ی اثر ورزش بر A2Aها در بافت مغز یافت نشد، اما نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد شروع زودهنگام تمرینات استقامتی، تأثیر معنی‌داری بر پروتئین A2A نداشته است که پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد.

یکی از چالش‌های مورد توجه در طراحی شیوه‌نامه‌های پیشنهادی توان‌بخشی ورزشی، زمان ورزش پس از ایسکمیک است. ۲۴ ساعت پس از ایسکمیک مغزی، زمانی حیاتی و ایمن برای انجام فعالیت‌های توان‌بخشی برای بیماران است (۴). در این باره، Zhang و همکاران، مشخص کردند شروع زودهنگام تمرینات ورزشی ۲۴ ساعت بعد از ایسکمیک مغزی، از طریق کاهش در ادم مغزی، حفاظت عصبی قابل توجهی را در برابر عوارض ناشی از سکته‌ی ایسکمیک مغزی ایجاد می‌کند (۴۱) ادم مغزی، ممکن است با افزایش فشار داخل جمجمه و فشار بر عروق مغزی، باعث کاهش خون‌رسانی به بافت مغز و در نهایت، موجب توسعه‌ی ضایعات مغزی شود (۴۳-۴۲). Tian و همکاران نیز دریافتند تمرینات زودهنگام در ۲۴ ساعت اولیه، با بهبود جریان خون مغزی از طریق افزایش تنش برشی لامینار وابسته به اندوتلیوم، باعث کاهش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال مغزی در موش صحرایی می‌شود (۴۴).

Zhang و همکاران نیز در مطالعه‌ی دیگری دریافتند که انجام تمرینات ورزشی زودهنگام استقامتی، ۲۴ ساعت پس از سکته‌ی ایسکمیک با افزایش سنتز میتوکندری‌های آسیب دیده‌ی ناشی ایسکمیک که آبشار مضر از گونه‌های فعال اکسیژن واکنشی را آغاز می‌کنند، می‌تواند بهترین درمان پس از سکته‌ی مغزی باشد (۴۵)، اما با این وجود، در مطالعه‌ی Shen و همکاران، شروع زودهنگام تمرینات استقامتی روی نوار گردان ۲۴ ساعت پس از ایسکمیک، با افزایش

References

1. Knecht S, Hesse S, Oster P. Rehabilitation after stroke. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(36): 600-6.
2. Antonow-Schlorke I, Ehrhardt J, Knieling M. Modification of the ladder rung walking task-new options for analysis of skilled movements. *Stroke Res Treat* 2013; 2013: 418627.
3. Stroke Unit Trialists' Collaboration. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (9): CD000197.
4. Bernhardt J, Dewey H, Thrift A, Collier J, Donnan G. A very early rehabilitation trial for stroke (AVERT): Phase II safety and feasibility. *Stroke* 2008; 39(2): 390-6.
5. Risedal A, Zeng J, Johansson BB. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(9): 997-1003.
6. Zhang P, Zhang Q, Pu H, Wu Y, Bai Y, Vosler PS, et al. Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4: 2476-89.
7. Yang YR, Wang RY, Wang PS. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2003; 339(2): 91-4.
8. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 201(2): 275-87.
9. Xing Y, Yang SD, Dong F, Wang MM, Feng YS, Zhang F. The beneficial role of early exercise training following stroke and possible mechanisms. *Life Sci* 2018; 198: 32-7.

10. Li F, Geng X, Khan H, Pandy JT, Jr., Peng C, Li X, et al. Exacerbation of brain injury by post-stroke exercise is contingent upon exercise initiation timing. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 311.
11. Shen J, Huber M, Zhao EY, Peng C, Li F, Li X, et al. Early rehabilitation aggravates brain damage after stroke via enhanced activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX). *Brain Res* 2016; 1648(Pt A): 266-76.
12. Diserens K, Michel P, Bogousslavsky J. Early mobilisation after stroke: Review of the literature. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22(2-3): 183-90.
13. Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Adenosine and stroke: Maximizing the therapeutic potential of adenosine as a prophylactic and acute neuroprotectant. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7(3): 217-27.
14. Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos MC, Chu CC, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol Pharmacol* 2005; 67(5): 1406-13.
15. Gracia E, Farre D, Cortes A, Ferrer-Costa C, Orozco M, Mallol J, et al. The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J* 2013; 27(3): 1048-61.
16. Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, Di PR, Melani A, Bramanti P, et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38(10): 2119-29.
17. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol Rev* 2018; 98(3): 1591-625.
18. Sharifi ZN, Abolhassani F, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, Movassaghi S. Neuroprotective treatment with FK506 reduces hippocampal damage and prevents learning and memory deficits after transient global ischemia in rat. *Arch Neurol* 2014; 1(1): 35-40.
19. Erfani S, Khaksari M, Oryan S, Shamsaei N, Aboutaleb N, Nikbakht F. Nampt/PBEF/visfatin exerts neuroprotective effects against ischemia/reperfusion injury via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Mol Neurosci* 2015; 56(1): 237-43.
20. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Opliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1979; 47(6): 1278-83.
21. Wallace DG, Winter SS, Metz GA. Serial pattern learning during skilled walking. *J Integr Neurosci* 2012; 11(1): 17-32.
22. Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Immunol* 2013; 103(1): 21.
23. Bonde C, Noraberg J, Noer H, Zimmer J. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 2005; 136(3): 779-94.
24. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 2001; 24(1-3): 107-29.
25. Endres M, Dirnagl U, Moskowitz MA. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. *Handb Clin Neurol* 2009; 92: 31-41.
26. Kima GY, Kimb EJ. The effect of physical training on glutamate transporter expression in an experimental ischemic stroke rat model. *Phys Ther Rehabil Sci* 2013; 2(2): 87-91.
27. Sosa PM, Schimidt HL, Altermann C, Vieira AS, Cibin FW, Carpes FP, et al. Physical exercise prevents motor disorders and striatal oxidative imbalance after cerebral ischemia-reperfusion. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48(9): 798-804.
28. Stout JM, Knapp AN, Banz WJ, Wallace DG, Cheatwood JL. Subcutaneous daidzein administration enhances recovery of skilled ladder rung walking performance following stroke in rats. *Behav Brain Res* 2013; 256: 428-31.
29. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297(5868): 681-3.
30. Liu YF, Chen HI, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: Roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol* 2009; 587(Pt 13): 3221-31.
31. Teixeira AL, Barbosa IG, Diniz BS, Kummer A. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: Correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark Med* 2010; 4(6): 871-87.
32. Suzuki J. Muscle microvascular adaptation and angiogenic gene induction in response to exercise training are attenuated in middle-aged rats. *Comparative Exercise Physiology*; 2015; 11(1): 23-33.
33. Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(2): 166-80.
34. Chen Z, Hu Q, Xie Q, Wu S, Pang Q, Liu M, et al. Effects of treadmill exercise on motor and cognitive function recovery of MCAO mice through the caveolin-1/vegf signaling pathway in ischemic penumbra. *Neurochem Res* 2019; 44(4): 930-46.
35. Baxter RL, Vega-Riveroll LJ, Deuchars J, Parson SH. A2A adenosine receptors are located on presynaptic motor nerve terminals in the mouse. *Synapse* 2005; 57(4): 229-34.
36. Mojsilovic-Petrovic J, Jeong GB, Crocker A, Arneja A, David S, Russell DS, et al. Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors. *J Neurosci* 2006; 26(36): 9250-63.
37. Fontinha BM, Diogenes MJ, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Enhancement of long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor requires adenosine A2A receptor activation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology* 2008; 54(6): 924-33.
38. Ramanathan M, Pinhal-Enfield G, Hao I, Leibovich SJ. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by

- adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter. *Mol Biol Cell* 2007; 18(1): 14-23.
39. Fontinha BM, Delgado-Garcia JM, Madronal N, Ribeiro JA, Sebastiao AM, Gruart A. Adenosine A(2A) receptor modulation of hippocampal CA3-CA1 synapse plasticity during associative learning in behaving mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34(7): 1865-74.
40. Correia-de-Sa P, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. *Br J Pharmacol* 1991; 103(2): 1614-20.
41. Zhang P, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J Neuroeng Rehabil* 2013; 10: 43.
42. Sharma HS, Westman J, Nyberg F. Pathophysiology of brain edema and cell changes following hyperthermic brain injury. *Prog Brain Res* 1998; 115: 351-412.
43. Marmarou A. The pathophysiology of brain edema and elevated intracranial pressure. *Cleve Clin J Med* 2004; 71(Suppl 1): S6-S8.
44. Tian S, Zhang Y, Tian S, Yang X, Yu K, Zhang Y, et al. Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics. *Brain Res* 2013; 1533: 114-21.
45. Zhang P, Xianglei J, Hongbo Y, Zhang J, Xu C. Neuroprotection of Early locomotor exercise poststroke: evidence from animal studies. *Can J Neurol Sci* 2015; 42(4): 213-20.
46. Sun J, Tong RK-Y, Ke I, Zhang J, Hu X, Zheng X. Treadmill exercise facilitates functional recovery and neuroprotection in subacute stroke rat. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2013; 3(2): 170-3.
47. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 105-22.

Impact of Early Endurance Training on Improvement of Brain Damage in CA1 Region of Hippocampus and Expression of A2A Protein Following Ischemic Stroke in Rats

Mehdi Seydyousefi¹, Ziya Fallahmohammadi², Mahtab Moazzami³,
Ali Yaghoubi⁴, Zeinab Faghfoori⁵

Original Article

Abstract

Background: Brain ischemia/reperfusion causes structural and functional damage in the hippocampus. Physical activity is an essential method for early rehabilitation after a stroke. The aim of this study was to determine the effect of 8 weeks of early endurance training on treadmill on improvement of the neurons of CA1 region of hippocampus and expression of A2A protein following cerebral ischemia/reperfusion in male rats.

Methods: 21 male Wistar rats were randomly divided into three groups of sham, ischemia + control, and ischemia + exercise. 24 hours after induction of ischemia, the rats in exercise group ran 5 days a week, for 8 weeks. Ischemia was induced by blocking both common carotid arteries for 45 minutes. Ladder test, hematoxylin and eosinophil (H&E) staining, and immunohistochemical method were used to evaluate functional status, neuronal death, and protein expression, respectively.

Findings: The brain ischemia was associated with an increase in neuronal death in the CA1 region of hippocampus, and reduced cognitive function and motor learning. Early training significantly decreased cell death, as well as impaired cognitive function and motor learning. Moreover, in ischemia + exercise group, expression of A2A did not change significantly compared to the ischemia + control group.

Conclusion: This study showed that early training on treadmill, as a rehabilitation stimulant, would have protective effects against cell death, and can improve motor function.

Keywords: Endurance training, Ischemia, Reperfusion

Citation: Seydyousefi M, Fallahmohammadi Z, Moazzami M, Yaghoubi A, Faghfoori Z. **Impact of Early Endurance Training on Improvement of Brain Damage in CA1 Region of Hippocampus and Expression of A2A Protein Following Ischemic Stroke in Rats.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(526): 485-92.

1- Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Humanities, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Mazandaran, Sari, Iran

3- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Humanities, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

5- PhD of Nutrition, Food Safety Research Center (Salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Corresponding Author: Ziya Fallahmohammadi, Email: zia-falm@umz.ac.ir