

بررسی اثرات ورزش اجباری بر حافظه فضایی و رفتار اضطرابی در موش‌های اوارکتومی شده وابسته به مرفین

عباسعلی وفایی (Ph.D)، فریناز حقایق خراسانی (M.D)[†]، زهرا سراج (M.D)[†]، حسین میلادی گرجی (Ph.D)، علی رشیدی پور (Ph.D)*

مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳۱

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۱۸۶ Rashidy-pour@semums.ac.ir

† میزان مشارکت برابر با نفر اول

چکیده

هدف: مطالعات قبلی در آزمایشگاه ما نشان می‌دهد که ورزش سبب اصلاح اختلالات شناختی و رفتاری در موش‌های ماده سالم می‌شود. با این وجود، اثرات ورزش روی اختلالات شناختی - رفتاری ناشی از مصرف مزمن مرفین در موش‌های دچار یائسگی تجربی (اوارکتومی شده) مشخص نیست. هدف این مطالعه، بررسی اثر ورزش اجباری ملایم و متوسط بر حافظه مکان اشیاء و رفتار اضطرابی در رت‌های اوارکتومی شده وابسته به مرفین در طی مرحله ترک بود. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار استفاده شد. در گروه کنترل یا فاقد تخمدان تزریق زیرجلدی مرفین (۱۰mg/kg) یا سالین دوبار در روز با فاصله ۱۲ ساعت در طی مدت ۱۰ روز انجام شد. سپس موش‌ها طبق پروتکل ورزشی به مدت ۴ هفته و هر هفته ۵ روز ورزش ملایم یا متوسط (با تردمیل) انجام دادند. سپس حافظه تعیین مکان اشیاء و رفتارهای شبه اضطرابی (در ماز مرتفع بعلاوه‌ای شکل) ارزیابی شد. یافته‌ها: تزریق مزمن مرفین، میزان اضطراب (کاهش ورود و زمان گذرانده شده در بازوی باز ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع) را در موش‌های سالم ولی نه اوارکتومی شده افزایش داد و این اثر، توسط ورزش ملایم و متوسط اصلاح شد. ورزش ملایم و متوسط در گروه‌های کنترل غیرمرفینی نیز اثر ضد اضطرابی داشت. مرفین، اثر معنی‌داری بر حافظه فضایی تعیین مکان شی در موش‌های سالم و اوارکتومی شده نداشت. ورزش متوسط سبب افزایش حافظه فضایی در موش‌های سالم و اوارکتومی شده غیروابسته ولی نه وابسته به مرفین شد. نتیجه‌گیری: به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد هورمون‌های تخمدانی احتمالاً اثرات مصرف مزمن مرفین را روی حافظه فضایی و رفتارهای اضطرابی تحت تاثیر قرار می‌دهند و بررسی این ارتباط پیچیده نیازمند تحقیقات بیش تر است.

واژه‌های کلیدی: ورزش تردمیل، مرفین مزمن، حافظه، اضطراب، حذف تخمدان

مقدمه

اپیویدهای برون‌زاد مصرف‌شده خواهد شد [۴-۶]. این باور وجود دارد که تمرینات ورزشی هوازی بلندمدت می‌تواند تمایل به مصرف مرفین و هروئین را از طریق تغییر در تعداد رستورهای اپیوئیدی مرکزی، کاهش دهد [۷]. هورمون‌های جنسی به‌ویژه استروژن حافظه وابسته به هیپوکامپ را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استروژن به‌طور سریع (در ۱-۲ ساعت) موجب تعدیل عملکرد الکتروفیزیولوژیکی در برش‌های هیپوکامپ می‌شود [۸]. تراکم زیاد گیرنده‌های استروژنی و تولید استروژن در مراکز اصلی حافظه و یادگیری به ویژه هیپوکامپ، نقش این گیرنده‌ها را در حافظه فضایی نشان می‌دهد. استرادیول چندین شکل حافظه فضایی وابسته به

مطالعات جدید نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند برخی از مسیرهای عصبی و مکانیسم‌های مغزی را که به وسیله مورفین یا سایر اویپات‌ها فعال می‌شوند، تحت تاثیر قرار داده و بدین ترتیب در کاهش تمایل به مصرف مورفین و سایر ترکیبات اعتیادآور، نقش داشته باشد [۱]. ورزش و فعالیت بدنی، آزادسازی پپتیدهای شبه افیونی درون‌زاد مغز، به ویژه بتا اندروفین‌ها را افزایش داده و در نتیجه اثراتی شبیه مورفین و آگونیست‌های گیرنده‌های اپیوئیدی را پدید می‌آورد [۲]. ورزش طولانی‌مدت تغییراتی را در پروتئین‌های باند شونده، به اپیویدها ایجاد می‌کند [۳] و باعث کاهش حساسیت به

روش برداشتن تخمدان‌ها: یک ماه قبل از شروع آزمایش‌ها، بعد از بی‌هوش کردن حیوان به دنبال تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن) مخلوط با زایلوزین (۱۴ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن)، در ناحیه شکمی - طرفی حیوان در هر دو طرف برش داده شد و پس از لیگاتور کردن لوله‌های رحمی تخمدان‌ها برداشته شد.

روش انجام ورزش اجباری:

دستگاه: از دستگاه تردمیل (Treadmill) برقی ساخت شرکت برج صنعت استفاده شد. این دستگاه، دارای چهار lane است. ابعاد کل دستگاه ۵۴×۴۷×۲۰ و ابعاد هر lane برابر با ۱۰×۴۲×۲۰ می‌باشد.

عادت دادن: برای مطالعه اثرات ورزش اجباری، رت‌های بالغ ماده، ابتدا به سیستم ورزشی عادت داده شدند تا استرس آن‌ها کم شود و حیواناتی که مقاومت کرده و ورزش انجام نمی‌دهند از فرآیند آزمایش حذف شدند. برای سازش دادن، حیوانات به مدت ۳ روز، هر روز ۱۵ دقیقه با حداقل سرعت (۲ متر بر دقیقه) روی دستگاه قرار گرفته و ورزش کردند [۲۲]. طبق پروتکل، هر دو گروه ورزش ملایم و متوسط، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته، هر روز به مدت ۳۰ دقیقه روی تردمیل دویدند [۲۰].

ورزش ملایم: در این گروه، رت‌ها با سرعت ۲ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه اول و ۵ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه دوم و سپس ۸ متر در دقیقه برای بیست دقیقه بعدی روی تردمیل دویدند [۲۳، ۲۰].

ورزش متوسط: رت‌ها با سرعت ۸ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه اول و ۱۱ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه دوم و سپس ۱۴ متر در دقیقه برای بیست دقیقه، روی تردمیل دویدند [۲۴، ۲۰].

بررسی اضطراب با استفاده از دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع: دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع؛ یک مدل استاندارد جهت ارزیابی سطح اضطراب در جوندگان است. این مدل تجربی سنجش اضطراب غیر شرطی بوده و نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد. این دستگاه از چوب ساخته شده است و شامل دو بازوی باز (هر یک ۵۰×۱۰ سانتی‌متر همرا با یک لبه ۵ میلی‌متری) و دو بازوی بسته (هر یک ۵۰×۱۰×۴۰ سانتی‌متر) و یک کفه مرکزی (۱۰×۱۰ سانتی‌متر) به طوری که بازوهای باز روبروی یک‌دیگر قرار دارند و حدود ۷۰ سانتی‌متر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرد.

در صبح روز آزمون هر موش به طور جداگانه، ۵ دقیقه قبل از آزمایش در جعبه‌ای با دیواره‌های مشکی از جنس پلکسی‌گلاس به ابعاد ۳۰×۴۰×۱۰ سانتی‌متر قرار گرفتند تا فعالیت جستجوگرانه (Explorative activity) حیوان افزایش

هیپوکامپ شامل حافظه فضایی بلندمدت در ماز آبی موریس [۱۰، ۹] و حافظه کوتاه‌مدت در ماز شعاعی [۱۱] و ماز تی [۱۲] را در جوندگان افزایش می‌دهد.

یافته‌های جدید نشان می‌دهند که ورزش تشکیل سلول جدید را در هیپوکامپ موش‌های اوارکتومی شده (مدل تجربی یائسگی) افزایش می‌دهد [۱۳]. در مطالعات دیگر پیشنهاد شده که تمرینات فیزیکی از ظهور بسیاری از علائم در زنان یائسه جلوگیری می‌کند [۱۴]. هم‌چنین نشان داده شده که فعالیت فیزیکی تعداد سلول‌های جدید را در شکنج دندانه‌ای افزایش داده و حافظه را بهبود می‌بخشد [۱۵]. مطالعات جدید نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند، به عنوان یک روش درمانی، برای اختلالات شناختی و رفتاری ناشی از اعتیاد مطرح باشد [۱۶-۱۸]. هنوز مشخص نیست که آیا ورزش قادر است اختلالات شناختی و رفتاری ناشی از مرفین در دوران یائسگی را نیز اصلاح نماید و این‌که شدت ورزش باید چگونه باشد. در مطالعات گذشته نشان داده است که ورزش‌های غیرآزادی با شدت‌های مختلف، اثرات مختلفی در مغز دارد. فعالیت بدنی در شدت بالا، اثر بیش‌تری بر افزایش فاکتورهای تمایز سلولی در مغز دارد [۱۹] و نوع ملایم تا متوسط آن در هیپوکامپ باعث افزایش تکثیر سلولی و بیان ژن BDNF می‌شود [۲۰]. نتایج مطالعات قبلی در آزمایشگاه ما نشان داد که ورزش با شدت‌های مختلف اثرات مهمی بر اصلاح اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از مصرف مزمن مرفین در موش‌های ماده دارد [۱۷، ۲۱]. از این‌رو، هدف مطالعه کنونی بررسی اثرات شدت‌های ملایم و متوسط ورزش اجباری بر نارسایی‌های رفتاری (شناختی-اضطرابی) در رت‌های ماده اوارکتومی شده وابسته به مرفین است.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های ماده بزرگ آزمایشگاهی (Rat) ماده بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده می‌گردد. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار خواهد گرفت و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با درجه حرارت ثابت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری خواهند شد. مجموعاً ۶۰ موش اوارکتومی و ۶۰ موش سالم استفاده شد.

روش ایجاد اعتیاد: حیوانات با تزریق زیرجلدی مورفین (10 mg/kg) دو بار در روز با فاصله ۱۲ ساعت به مدت ده روز به صورت مزمن وابسته می‌شوند. موش‌های گروه کنترل هم به صورت مشابه سالین دریافت می‌نمایند [۱۸].

الف: گروه‌های سالم: (۶ گروه ۱۰ تایی)

۱- گروه کنترل: گروه غیر معتاد ورزش نکرده (Saline/sedentary, SAL/SED): این گروه از حیوانات طبق پروتکل روی تردمیل خاموش با مدار شوک الکتریکی خاموش قرار گرفتند و به جای مورفین سالیین دریافت کردند.

۲- گروه کنترل- ورزش ملایم: (SAL/Exercise-Low, SAL/EXC-L) گروه غیر معتاد که طبق پروتکل در سطح ملایم ورزش کردند و به جای مورفین سالیین دریافت نمودند.

۳- گروه کنترل- ورزش متوسط: (SAL/Exc-moderate, SAL/EXC-M) گروه غیر معتاد که طبق پروتکل در سطح متوسط ورزش کردند و به جای مورفین سالیین دریافت کردند.

۴- گروه معتاد ورزش نکرده: (Morphine/SED, MOR/SED) گروه معتاد غیرورزشکار که طبق پروتکل روی تردمیل خاموش با مدار شوک الکتریکی خاموش قرار گرفتند.

۵- گروه معتاد - ورزش ملایم: (MOR/EXC-L) گروه معتاد که طبق پروتکل در سطح ملایم ورزش کردند.

۶- گروه معتاد - ورزش متوسط: (MOR/EXC-M) گروه معتاد که طبق پروتکل در سطح متوسط ورزش کردند.

ب: گروه‌های اوارکتومی شده: (۶ گروه ۱۰ تایی)

۱- گروه کنترل (SAL/OVX): گروه غیر معتاد ورزش نکرده: گروهی بودند که نه ورزش کردند و نه معتاد بودند. این گروه از حیوانات طبق پروتکل روی تردمیل خاموش با مدار شوک الکتریکی خاموش قرار گرفتند و به جای مورفین سالیین دریافت کردند.

۲- گروه کنترل- ورزش ملایم (SAL/OVX-EXC-L): گروه غیر معتاد که طبق پروتکل در سطح ملایم ورزش کردند و به جای مورفین سالیین دریافت کردند.

۳- گروه کنترل- ورزش متوسط (SAL/OVX-EXC-M): گروه غیر معتاد که طبق پروتکل در سطح متوسط ورزش کردند و به جای مورفین سالیین دریافت کردند.

یابد. سپس برای سنجش سطح اضطراب، حیوان در ماز بعلاوه شکل مرتفع (در قسمت کفه و رو به بازوی باز) قرار داده شده و به مدت ۵ دقیقه پارامترهای اصلی زیر ارزیابی و ثبت شد:

۱- تعداد کل ورود به بازوهای باز و بسته
۲- مدت زمان ماندن در بازوهای باز و بسته و تعداد کل ورودها [۲۵].

در این تست، کاهش حضور در بازوی باز (زمان گذرانده شده و تعداد ورود) به عنوان افزایش اضطراب در نظر گرفته می‌شود [۲۵]

تست حافظه مکان اشیاء (Object Location Memory Test, OLMT)

این تست جهت ارزیابی حافظه فضایی در رت استفاده می‌شود. در یک محفظه ابتدا دو جسم کوچک سرامیکی یکسان در با ابعاد $50 \times 50 \times 50$ قرار داده شدند. موش‌ها به مدت ۴ روز و روزی ۱۰ دقیقه، در محفظه بدون اشیاء قرار داده شدند تا استرس آن‌ها کم شود. در مرحله دوم (اکتساب) موش‌ها به مدت ۵ دقیقه با اشیاء مواجه شدند و در مرحله سوم (تست حافظه) ۳۰ دقیقه بعد از فاز دوم، یک شی به موقعیت جدید در محفظه منتقل شد. سپس، مدت زمانی که صرف کشف اجسام در موقعیت‌های قدیم و جدید شد به مدت ۵ دقیقه ارزیابی شد. و شاخص تمایز برای هر حیوان با فرمول زیر محاسبه شد:

Discrimination Index (TN + TF/TN)

TN: Time exploring Novel location

شده برای کشف موقعیت جدید

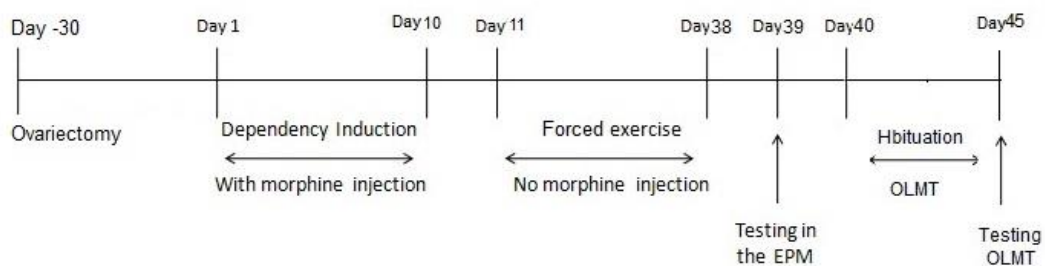
TF: Time exploring Familiar location

صرف شده برای کشف موقعیت قبلی

شاخص تمایز بیش‌تر از ۵۰ درصد در فار تست، نشان‌دهنده زمان کشف بیش‌تر در موقعیت جدید می‌باشد.

شکل ۱، بازه زمانی آزمایش‌ها را نشان می‌دهد.

گروه‌های آزمایشی

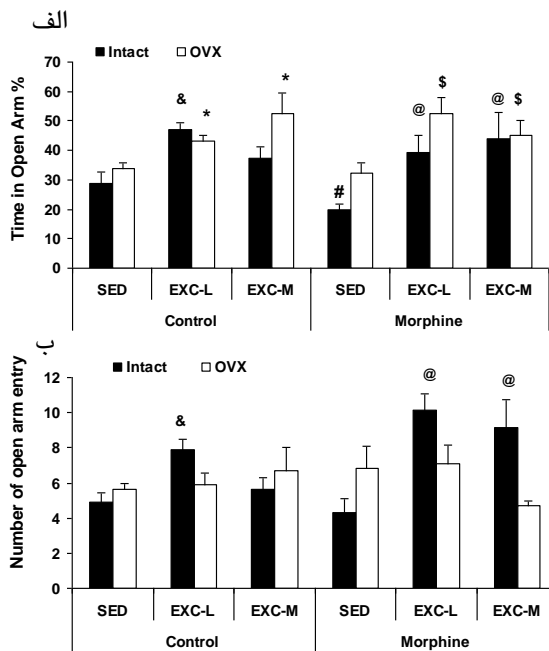


شکل ۱. بازه زمانی آزمایش.

ب: تعداد ورود به بازوی باز

آنالیز واریانس سه طرفه برای تعداد ورود به بازوی باز (شکل ۲ - ب): نشان‌دهنده عدم اثر معنی‌دار گروه ($P=0/1$) ($F_{1,84}=2/23$) و عدم اثر معنی‌دار درمان ($P=0/06$) ($F_{1,84}=3/47$)، عدم اثر معنی‌دار ورزش ($P=0/09$) ($F_{2,84}=2/44$)، و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه‌ها و درمان ($F_{84,1}=2/43$, $P=0/1$) و ورزش ($F_{84,1}=2/1$, $P=0/1$) و عدم تعامل معنی‌دار بین درمان و ورزش ($F_{1,84}=0/13$, $P=0/8$) و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه‌ها، درمان و ورزش ($F_{1,84}=2/91$, $P=0/059$) بود.

آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تعداد ورود به بازوی باز به صورت معنی‌داری در گروه‌های سالم ورزشی (با شدت متوسط) وابسته به مرفین نسبت به گروه غیر ورزشی سالم وابسته به مرفین بیشتر بود ($P<0/05$). نهایتاً، تعداد ورود به بازوی باز به صورت معنی‌داری در گروه سالم ورزشی غیر وابسته به مرفین نسبت به گروه غیر ورزشی سالم غیر وابسته به مرفین بیشتر بود ($P<0/001$).



شکل ۲. اثر شدت‌های ملایم و متوسط ورزش اجباری، بر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (الف) و تعداد ورود به بازوی باز (ب) در موش‌های سالم و اوارکتومی شده کنترل و وابسته به مرفین. $^{\#}P<0.05$ نسبت به گروه SAL/SED سالم غیرمرفینی. $^{\&}P<0.05$ نسبت به گروه SAL/SED سالم غیرمرفینی. $^*P<0.05$ نسبت به گروه SAL/SED اوارکتومی شده غیرمرفینی. $^{\$}P<0.05$ نسبت به گروه SAL/SED اوارکتومی شده مرفینی. $^{\@}P<0.05$ نسبت به گروه SAL/SED سالم مرفینی.

SAL: Saline, MOR: Morphine, SED: Sedentary, EXC-L: Mild exercise, EXC-M: Moderate exercise

۴ - گروه معتاد ورزش نکرده (MOR/OVX-SED): گروه معتاد غیرورزشکار که طبق پروتکل روی تردمیل خاموش با مدار شوک الکتریکی خاموش قرار گرفتند.

۵ - گروه معتاد - ورزش ملایم (MOR/OVX-EXC-L): گروه معتاد که طبق پروتکل در سطح ملایم ورزش کردند.

۶ - گروه معتاد - ورزش متوسط (MOR/OVX-EXC-M): گروه معتاد که طبق پروتکل در سطح متوسط ورزش کردند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون SmirnovKolmogorov - بررسی شد و چون توزیع داده‌ها نرمال بود از آنالیز واریانس سه طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد و ملاک معنی‌داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر شدت‌های ملایم و متوسط ورزش اجباری بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های سالم و اوارکتومی شده گروه‌های کنترل و وابسته به مرفین در ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع

الف: درصد زمان سپری شده در بازوی باز

آنالیز واریانس سه طرفه برای درصد زمان سپری شده در بازوی باز (شکل ۲ - الف)، نشان‌دهنده اثر معنی‌دار گروه ($F_{1,84}=4/28$, $P=0/04$) و عدم اثر معنی‌دار درمان ($F_{1,84}=0/09$, $P=0/07$) ($P=0/0001$) ($F_{2,84}=17/02$) و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه‌ها و درمان ($F_{1,84}=0/65$, $P=0/52$) و ورزش ($F_{1,84}=0/09$, $P=0/9$) و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه‌ها، درمان و ورزش ($F_{1,84}=3/39$, $P=0/03$) بود. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که زمان گذرانده شده در گروه معتاد ورزش نکرده سالم به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه غیرمرفینی سالم بود ($P<0/05$). درصد زمان سپری شده به بازوی باز به صورت معنی‌داری در گروه‌های سالم و اوارکتومی شده ورزشی وابسته به مرفین نسبت به گروه‌های غیر ورزشی سالم و اوارکتومی شده وابسته به مرفین بیشتر بود ($P<0/05$). نهایتاً، درصد زمان سپری شده در بازوی باز به صورت معنی‌داری در گروه‌های سالم و اوارکتومی شده ورزشی غیر وابسته به مرفین نسبت به گروه‌های غیر ورزشی سالم و اوارکتومی شده غیر وابسته به مرفین بیشتر بود ($P<0/001$).

بحث و نتیجه گیری

مهم ترین یافته های این مطالعه عبارتند از: ۱- تفاوتی در میزان اضطراب موش های سالم و اوارکتومی شده (در ماز مرتفع بعلاوه ای شکل) وجود ندارد و مصرف مرفین، میزان اضطراب را در فقط در موش های سالم غیرورزشی کاهش می دهد. ورزش اجباری در شدت های کم و متوسط میزان اضطراب را در موش های سالم و اوارکتومی شده کاهش می دهند. ۲- مصرف مرفین، تأثیری روی حافظه مکان اشیاء نداشت. ضمناً اثرات تقویتی ورزش بر روی حافظه فضایی در موش های اوارکتومی شده دیده نشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف مرفین در موش های سالم سبب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می شود. این یافته، با مطالعات قبلی آزمایشگاه ما منطبق است. در مطالعات گذشته، ما نشان دادیم که سابقه مصرف مرفین سبب افزایش رفتارهای اضطرابی در موش ها می شود [۲۷، ۲۶، ۱۷]. با این وجود، مکانیسم های عصبی و هورمونی اثرات اضطراب زایی مرفین مشخص نیست. مطالعات قبلی نشان داده است که مصرف مزمن مرفین به صورت انتخابی خاموشی ترس را کاهش می دهد. این نقص در خاموشی ترس نقش مهمی در شیوع بالای اختلالات اضطرابی در افراد معتاد نقش دارد [۲۸]. اثرات اضطراب زایی مصرف مزمن مرفین، در موش های اوارکتومی شده مشاهده نشد. این یافته نشان می دهد هورمون های جنسی نقش مهمی در اثرات اضطراب زایی مرفین بازی می کنند به گونه ای که در فقدان آنها، مصرف مزمن مرفین قادر به ایجاد اضطراب نمی باشد. نکته مهم دیگر این است که خود حذف طولانی مدت تخمدان (۴ ماه) سبب افزایش اضطراب در موش ها می شود [۲۹] ولی در مطالعه کنونی این اثر دیده نشد. احتمالاً دلیل اصلی آن این است که ما یک ماه بعد از حذف تخمدان، رفتارهای اضطرابی را بررسی کردیم. از طرف دیگر، مطالعات قبلی نشان می دهد که هورمون های جنسی اثرات ضد اضطرابی دارند [۳۱، ۳۰] و از این رو، انتظار می رود که حذف این هورمون ها سبب افزایش اضطراب گردد که این یافته قابل انتظار در مطالعه کنونی مشاهده نشد. از این رو، مطالعات بیشتری نیاز است تا این تناقض ها بررسی و ارزیابی شوند.

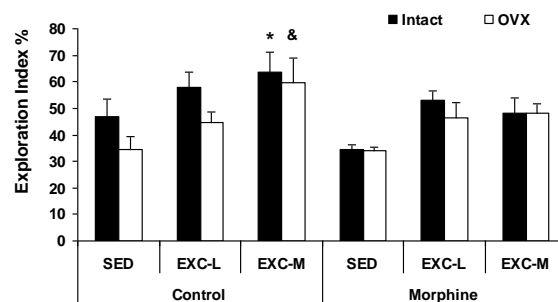
نتایج این مطالعه نشان داد که ورزش در شدت های کم و متوسط هم در گروه های کنترل (سالم و اوارکتومی شده) و هم در گروه های مرفینی (سالم و اوارکتومی شده) سبب کاهش اضطراب می شود. این یافته با مطالعات قبلی مبنی بر اثرات ضد اضطرابی ورزش انطباق دارد [۲۷، ۱۸، ۱۷]. در حال حاضر، مکانیسم های ضد اضطرابی ورزش کاملاً روشن نیست. پیشنهاد شده است که چندین پیک عصبی و پپتید شامل سروتونین،

ج- تعداد کل ورود به بازوی باز و بسته

آنالیز واریانس سه طرفه برای تعداد کل ورود (داده ها نشان داده نشده است) نشان دهنده عدم اثر معنی دار گروه (۰/۰۵ > P) و عدم اثر معنی دار درمان (۱/۲۳، P > ۰/۰۵) و عدم اثر معنی دار ورزش (۲/۳۷، P > ۰/۰۵) و عدم تعامل معنی دار بین گروه ها و درمان (۲/۱۴، P > ۰/۰۵) و عدم تعامل معنی دار بین گروه ها و ورزش (۱/۱، P > ۰/۰۵) و عدم تعامل معنی دار بین ورزش و ورزش (۰/۲۲، P > ۰/۰۵) و عدم تعامل معنی دار بین گروه ها، درمان و ورزش (۱/۸، P > ۰/۰۵) بود.

اثر شدت های ملایم و متوسط ورزش اجباری بر حافظه فضایی تعیین مکان شای در موش های سالم و اوارکتومی شده گروه های کنترل و وابسته به مرفین

آنالیز واریانس سه طرفه برای تست حافظه فضایی (OLMT) (شکل ۳) نشان دهنده اثر معنی دار گروه (۰/۰۴ > P) و عدم اثر معنی دار درمان (۴/۰۶۸، P = ۰/۰۸) و اثر معنی دار ورزش (۰/۰۱، P = ۰/۰۰۰۱) و عدم تعامل معنی دار بین گروه ها و درمان (۱۶/۵، P = ۰/۰۸) و عدم تعامل معنی دار بین ورزش و ورزش (۰/۰۱، P = ۰/۰۸) و عدم تعامل معنی دار بین درمان و ورزش (۰/۰۱، P = ۰/۰۸) و تعامل معنی دار بین گروه ها، درمان و ورزش (۰/۰۱، P = ۰/۰۸) بود. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان حافظه در موش های گروه های ورزشی سالم و اوارکتومی شده (با شدت متوسط) نسبت به گروه های غیرورزشی سالم و اوارکتومی شده بیشتر بود (P < ۰/۰۵)



شکل ۳. اثر شدت های مختلف ورزش اجباری، بر شاخص شناخت در حافظه فضایی در موش های سالم و اوارکتومی شده کنترل و وابسته به مرفین. P < 0.05 & نسبت به گروه اوارکتومی شده غیرمرفینی غیر ورزشی. P < 0.05* نسبت به گروه سالم غیرمرفینی غیر ورزشی

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان مورد حمایت قرار گرفت و بخشی از پروژه پایان‌نامه دکتری عمومی خانم فریناز حقایق خراسانی و زهرا سراج است.

منابع

- [1] Naderi A, Alaei H, Sharifi M, Hoseini M. The comparison between effect of short-term and mid-term exercise on the enthusiasm of the male rats to self-administer morphine. *Iran J Basic Med Sci* 2007. (Persian).
- [2] Koltyn KF. Analgesia following exercise. *Sports Med* 2000; 29: 85-98.
- [3] de Oliveira MSR, da Silva Fernandes MJ, Scorza FA, Persike DS, Scorza CA, da Ponte JB, et al. Acute and chronic exercise modulates the expression of MOR opioid receptors in the hippocampal formation of rats. *Brain Res Bull* 2010; 83: 278-283.
- [4] Kanarek RB, Gerstein AV, Wildman RP, Mathes WF, D'Anci KE. Chronic running-wheel activity decreases sensitivity to morphine-induced analgesia in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 61: 19-27.
- [5] Smith MA, Yancey DL. Sensitivity to the effects of opioids in rats with free access to exercise wheels: μ -opioid tolerance and physical dependence. *Psychopharmacology* 2003; 168: 426-434.
- [6] Smith MA, Lyle MA. Chronic exercise decreases sensitivity to mu opioids in female rats: correlation with exercise output. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85: 12-22.
- [7] Smith MA, Lynch WJ. Exercise as a potential treatment for drug abuse: evidence from preclinical studies. *Front Psychiatry* 2011; 2.
- [8] Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S. Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neuroscience* 2006; 138: 757-764.
- [9] Harburger LL, Bennett JC, Frick KM. Effects of estrogen and progesterone on spatial memory consolidation in aged females. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 602-610.
- [10] Rashidy-Pour A, Bavarsad K, Miladi-Gorji H, Seraj Z, Vafaei AA. Voluntary exercise and estradiol reverse ovariectomy-induced spatial learning and memory deficits and reduction in hippocampal brain-derived neurotrophic factor in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2019; 187: 172819.
- [11] Bohacek J, Daniel JM. Increased daily handling of ovariectomized rats enhances performance on a radial-maze task and obscures effects of estradiol replacement. *Horm Behav* 2007; 52: 237-243.
- [12] Jasnow AM, Schulkin J, Pfaff DW. Estrogen facilitates fear conditioning and increases corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala in female mice. *Horm Behav* 2006; 49: 197-205.
- [13] Jin J, Jing H, Choi G, Oh MS, Ryu JH, Jeong JW, Huh Y, Park C. Voluntary exercise increases the new cell formation in the hippocampus of ovariectomized mice. *Neurosci Lett* 2008; 439: 260-263.
- [14] Shangold MM. Exercise in the menopausal woman. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 53S-8S; discussion 81S-3S.
- [15] van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2: 266-270.
- [16] Thorén P, Floras JS, Hoffmann P, Seals DR. Endorphins and exercise: physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc* 1990; 22: 417-428.
- [17] Ghodrati-Jaldbakhan S, Ahmadelipour A, Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Alizadeh M. Low- and high-intensity treadmill exercise attenuates chronic morphine-induced anxiogenesis and memory impairment but not reductions in hippocampal BDNF in female rats. *Brain Res* 2017; 1663: 20-28.
- [18] Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y, Akhavan MM, Semnanian S, Safari M. Voluntary exercise ameliorates cognitive deficits in morphine dependent rats: the role of

اپی‌نفرین، BDNF و CRF در این اثرات نقش دارند که در این میان نقش سروتونین از همه مهم‌تر است [۱۷، ۳۲]. حافظه محل شی، یک حافظه فضایی وابسته به هیپوکمپ است به گونه‌ای که تخریب هیپوکمپ این حافظه را مختل می‌کند [۳۳]. مطالعه ما نشان داد که مصرف مرفین، اثری روی این حافظه در موش‌های سالم و اوارکتومی شده نداشت و اثر افزایشی ورزش نیز در این موش‌ها دیده نشد، در حالی که در موش‌های غیرمرفینی سالم و اوارکتومی شده، ورزش متوسط غیرارادی سبب افزایش حافظه شد. این یافته نشان می‌دهد که سابقه مصرف مرفین با ایجاد تغییراتی در مغز و یا تداخل با مسیرهای فعال شده توسط ورزش مانع اثر افزایشی ورزش می‌شود. یکی از مولکول‌های مهمی که اثرات ورزش را وساطت می‌کند BDNF است [۳۴]. در مطالعات قبلی ما نشان دادیم که مرفین میزان این مولکول را در هیپوکمپ کاهش می‌دهد و ورزش کم و زیاد قادر نیست این کاهش را اصلاح کند [۱۷]. مکانیزم تاثیر مهاری مصرف مزمن مرفین بر بیان BDNF مشخص نیست. این اثر مهاری مرفین، حتی چهار هفته بعد از قطع مرفین در ناحیه CA1 هیپوکمپ مشاهده می‌شود [۳۵]. هر چند در مطالعه کنونی ما میزان BDNF را اندازه‌گیری نکردیم ولی احتمالاً کاهش میزان آن به واسطه مصرف مزمن مرفین، مانع اثر افزایشی ورزش روی حافظه در موش‌های مرفینی سالم و اوارکتومی شده، شده است در حالی که این اثر توسط ورزش متوسط در موش‌های غیرمرفینی سالم و اوارکتومی شده مشاهده شد. BDNF نقش مهمی در وساطت اثرات ورزش بر افزایش حافظه و شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکمپ بازی می‌کند [۳۴]. مطالعات پیش‌تری برای بررسی دقیق مکانیسم‌های مولکولی این اثر نیاز است.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه این است که در موش‌های ماده، مرحله سیکل جنسی (که غلظت هورمون‌های جنسی نوسان می‌کند) در طول آزمایش‌ها اندازه‌گیری نشد. این موضوع، باید در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد. به طور کلی، یافته جدید این مطالعه این است که بر خلاف موش‌های سالم ماده که تزریق مزمن مرفین موجب افزایش اضطراب می‌شود و ورزش ملایم و متوسط آن را اصلاح می‌کند، در موش‌های اوارکتومی شده مصرف مزمن مرفین قادر به ایجاد اختلالات اضطرابی نیست. ضمناً اثرات تقویتی ورزش بر روی حافظه فضایی در این موش‌ها دیده نمی‌شود. این موضوع، نشان می‌دهد که هورمون‌های تخمدانی اثرات مصرف مزمن مرفین را روی حافظه فضایی و رفتارهای اضطرابی تحت تاثیر قرار می‌دهند و بررسی این ارتباط پیچیده نیازمند تحقیقات پیش‌تر است.

Effects of voluntary and treadmill exercise on spontaneous withdrawal signs, cognitive deficits and alterations in apoptosis-associated proteins in morphine-dependent rats. *Behav Brain Res* 2014; 271: 160-170.

[28] Gu C, Li P, Hu B, Ouyang X, Fu J, Gao J, et al. Chronic morphine selectively impairs cued fear extinction in rats: implications for anxiety disorders associated with opiate use. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 666-673.

[29] Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Horm Behav* 2010; 58: 786-791.

[30] Koss WA, Gehlert DR, Shekhar A. Different effects of subchronic doses of 17- β estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Horm Behav* 2004; 46: 158-164.

[31] Walf AA, Frye CA. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 1097-1111.

[32] Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 2889-2898.

[33] Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 2002; 9: 49-57.

[34] Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 2580-2590.

[35] Han J, Zhu H, Chen G, Chen P, Luo L, Liu X, Wang C. The expression of BDNF and PSD-95 in hippocampal CA1 region of morphine-withdrawn rat with different dependent times. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008; 39: 253-255.

hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96: 479-491.

[19] Mojtahedi S, Kordi MR, Soleimani M, Hosseini SE. Effect of different intensities of short term aerobic exercise on expression of miR-124 in the hippocampus of adult male rats. *Zahedan J Res Med Sci* 2012; 14: 16-20. (Persian).

[20] Kim YP, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim H, et al. Magnitude-and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med* 2003; 24: 114-117.

[21] Ghodrati-Jaldbakhan S, Khalil-Khalili M, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. Effects of different intensities levels of treadmill exercise on cognitive functions and BDNF levels in prefrontal cortex of morphine dependent rats. *Koomesh* 2016; 17: 669-676. (Persian).

[22] Shahroodi A, Mohammadi F, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. Impact of different intensities of forced exercise on deficits of spatial and aversive memory, anxiety-like behavior, and hippocampal BDNF during morphine abstinence period in male rats. *Metab Brain Dis* 2020; 35: 135-147.

[23] Shafiee S, Vafaei A, Rashidy-Pour A. Effects of maternal hypothyroidism during pregnancy on learning, memory and hippocampal BDNF in rat pups: Beneficial effects of exercise. *Neuroscience* 2016; 329: 151-161.

[24] Ghaffari Z, Vafaei A, Rashidy-Pour A, Hadjzadeh M, Hosseini S. Effects of maternal hypothyroidism during pregnancy on anxiety-like behaviors in adulthood rats: Impact of moderate treadmill exercise. *Koomesh* 2016; 17: 707-717. (Persian).

[25] Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA. Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons. *Pak J Pharm Sci* 2008; 21: 285-289.

[26] Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Anxiety profile in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise. *Physiol Behav* 2012; 105: 195-202.

[27] Mokhtari-Zaer A, Ghodrati-Jaldbakhan S, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Akhavan MM, Bandegi AR, Rashidy-Pour A.

Effects of forced exercise on object location memory and anxiety behaviour in morphine dependent ovariectomized rats

Abbas Ali Vafaei (Ph.D), Farinaz Hagaygh Khorasani (M.D)[†], Zahra Serj (M.D)[†], Hossien Miladi-Gorji (Ph.D), Ali Rashidy-Pour (Ph.D)^{*}
Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 23-33654186 Rashidy-pour@semums.ac.ir

Received: 26 Feb 2020; Accepted: 20 Jun 2020

[†] Equal with first author

Introduction: Previous findings from our laboratory indicated that exercise alleviates the deficits in cognitive and anxiety disorders in healthy female rats. But the effect of exercise on cognitive and anxiety disorders induced by chronic morphine in experimental monopose of rats (ovariectomized) not known. Aim of this study was to investigate the effects of mild and modorate forced exercise on anxiety-like behaviors, and object location memory in ovariectomized of morphine-dependent rats during spontaneous withdrawal period.

Materials and Methods: Sham or ovariectomized rats were injected with bi-daily doses (10 mg/kg, at 12 h intervals) of morphine or saline over a period of 10 days. Then the rats were trained under mild and moderate exercises for 30 minute in a session of five days per week for four weeks. Then object location memory, and anxiety profile in elevated plus maze (EPM) were examined.

Results: Chronic morphine induced the anxiogenic-like behaviours (reductions in time spent, and entry into the EPM open arm) in intact, but not ovariectomized rats, which alleviated by both mild and moderate treadmill exercise. Also, both mild and moderate exercise produced anxiolytic behaviours in the non-morphine depedent intact and ovariectomized rats. Chronic morphine did not change object location memory in the intact and ovariectomized rats. Meanwhile, moderate exercise enhaced spatial location memory in non-morphine dependent, but not morphine dependent intact and ovarietomized rats.

Conclusion: In general, our findings demonstrate that sex ovarian hormones modulate the effects of chronic morphine on cognitive function and anxiety behaviour. It seems the nature of this interaction is complex and needs further investigation.

Keywords: Treadmill Exercise, Chronic Morphine, Memory, Anxiety, Ovarietomy.