

## Research Paper

**The Effect of Short- and Long-Term Exercise Courses on Memory Impairment Induced by Ethidium Bromide Injection in the Hippocampus of the Brain of Male Rats****M. Maleki<sup>1</sup>, H. Hatami Nemati<sup>2</sup>, H. Ahmadi<sup>3</sup>, S. Nasri<sup>4</sup>**

1. MSc. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Assistant professor, Department of Basic Sciences, University of Farhangian, Tehran, Iran (corresponding author)
4. Associated Professor, Department of Biology, University of Payame Noor, Tehran, Iran.

Received: 2022/10/05

Accepted: 2022/10/02

**Abstract**

Multiple sclerosis is the most common non-traumatic debilitating disease that affects the memory of affected people in addition to motor disabilities. The aim of this study was to investigate the effects of improving short- and long-term exercise on spatial memory impairment induced by ethidium bromide injection in the CA region of the hippocampus of male rats. This study was conducted on seven groups of 7 male rats with an average age of 10 weeks and a weight range of  $200 \pm 50$  grams, including control group, sham group, ethidium bromide group, two groups under short- and long-term exercise and two ethidium bromide + exercise experimental groups. Morris water maze was used to measure spatial memory. Injection of 3  $\mu$ l of ethidium bromide 0.01 into the CA1 region of the hippocampus on the third to fifth days of experiments reduced spatial memory-related parameters ( $P < 0.05$ ). In addition, applying short- and long-term exercise courses could improve the parameters of elapsed time ( $P < 0.05$ ) and traveled distance ( $P < 0.05$ ) to find the platform in the third to fifth days of the experiment due to the effect of ethidium bromide in the Morris water maze. Despite the beneficial effect of exercise on improving the memory of rats, the results of the study showed that short-term exercise course had a greater effect on improving the memory of poisoned rats induced by ethidium bromide injection in a 7-day period than long-term exercise.

**Keywords:** Ethidium Bromide, Short-Term Exercise, Long-Term Exercise, Spatial Memory

1. Email: Masomehmaleki71@gmail.com
2. Email: h.hatami@tabrizu.ac.ir
3. Email: hahmadi@cfu.ac.ir
4. Email: s\_nasri2000@yahoo.com



## Extended Abstract

### Background and Purpose

Multiple sclerosis causes impairment in long-term memory and working memory (1). Ethidium bromide is widely used as a demyelinating model to re-evaluate endogenous myelination in rats (2). The sensitivity and vulnerability of the neurons of the CA1 region of the hippocampus are higher compared to other brain regions to threatening and mutagenic stimuli such as ethidium bromide (3). Studies on rodents have also shown that animal running improves performance in hippocampus-related learning tasks, such as learning, spatial memory, and contextual fear conditioning (4).

Considering the fact that the hippocampus is more sensitive and vulnerable to threatening and mutagenic stimuli such as ethidium bromide compared to other brain areas. (5), and the performance in the Morris water maze test is dependent on the activity of the hippocampus (5); and, at the same time, the use of this test to investigate learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice has been proven (5). The purpose of this study is to investigate the strengthening and positive effects of short-term (i.e., two-week) and long-term (i.e., two-month) exercise sessions on memory impairment due to injection of ethidium bromide in the CA1 region of the hippocampus of male rats.

### Materials and Methods

In this study, male Wistar rats with an average age of 10 weeks and a weight limit of  $200\pm 50$  grams were used. After anesthesia, the rats were placed in the stereotaxic apparatus. Using the Paxinos and Watson atlas of rat brain coordinates (6), the characteristics of the CA1 region of the hippocampus of the left side were obtained unilaterally, and the guide cannulas with a thickness of 23 gauge were carefully inserted in this region, so that it was located on the upper level of the CA1 region (7). The animal's brain was cut by a vibroslice microtome and, the images of these slices were compared with Paxinos and Watson's atlas.

### Experimental Groups

Forty-nine rats were grouped into seven experimental groups and one control group. The control group received no treatment. The sham group received a volume of 3 microliters of 0.9% saline every 3 minutes for 7 days. The experimental group of ethidium bromide received three microliters of 0.01 of ethidium bromide every 3 minutes for seven days. Two experimental groups were subjected to short-term and long-term exercise, which were respectively subjected to short-term (two-week) or long-term (two-month) exercise on a special rat treadmill. Two experimental groups of ethidium bromide + exercise, after



receiving three microliters of 0.01 ethidium bromide in the CA1 region of the left hippocampus, underwent short-term or long-term exercise, respectively.

### **Examining Spatial Memory**

Three days after the treatment with ethidium bromide, short or long-term exercise or injection of drug + short and long-term exercise in the respective experimental groups, the Morris water maze method was used to measure the parameters related to spatial memory. The parameters that can be measured and related to spatial memory in the Mauritius water maze are: 1- Time to find the platform 2- Distance traveled to find the platform. These parameters were recorded with the installed camera and Maze Router software (8).

### **Statistical Analysis**

The obtained data were statistically analyzed in SPSS software. Because the data had a normal distribution, the one-way analysis of variance test was used to compare the quantitative difference of the average data in the experimental groups. Tukey's post hoc test was also used to compare the qualitative difference of the average data.  $P < 0.05$  was considered as a significant difference between experimental groups. Graphs were drawn using Excel 2016 software.

### **Findings**

One-way analysis of variance showed that exercising five days a week and two short-term periods of two weeks and long-term periods of two months did not significantly alter the elapsed time ( $P > 0.05$ ) and the distance traveled to find the platform ( $P > 0.05$ ) in the Morris water maze compared to the control group.

The results of the one-way analysis of variance and Tukey's post-hoc test for another part of the study results showed the unilateral injection of three microliters of 0.01 ethidium bromide in seven days into the CA1 area of the hippocampus of the left side of the rat brain. Although on the first and second days of the test did not have a significant effect on the parameters on time to find the platform ( $P > 0.05$ ) and the distance traveled to find the platform ( $P > 0.05$ ), it caused a significant delay in the time to find the platform on the third, fourth and fifth days of the test ( $P > 0.05$ ) and the increase in the distance traveled on the third and fourth ( $P < 0.01$ ) and the fifth day of the test ( $P < 0.05$ ) compared to the control group in the Morris water maze test.

The interaction results of short and long-term exercise periods with ethidium bromide injection in the CA1 region of the hippocampus on the left side of the rat brain showed that short-term exercise for two weeks, after seven days of injection of three microliters of 0.01 ethidium bromide in the CA1 region of the hippocampus on the left side of the rat brain, can improve the effect of ethidium bromide on time spent to find the platform on the fourth day ( $P < 0.01$ ) and the



fifth day of the experiment ( $P < 0.05$ ) and another parameter indicating the spatial memory, the distance traveled on the fourth day ( $P < 0.05$ ) and the fifth day of the experiment ( $P < 0.05$ ) compared to the group receiving ethidium bromide. Moreover, the results of the interaction of long-term exercise with ethidium bromide injection in rats showed that long-term exercise for two months after seven days of injection of three microliters of the 0.01 ethidium bromide in CA1 area of the hippocampus of the left side of the brain, enables to improve the effect of ethidium bromide on time spent on the third and fifth days of the experiment ( $P < 0.05$ ) and the distance traveled on the third day of the experiment ( $P < 0.05$ ) to find the platform relative to the group receiving ethidium bromide in the Morris water maze.

### **Conclusion**

The results obtained from the drug injection in this study showed that the injection of the used dose of ethidium bromide into the CA1 region of the hippocampus of rats as a demyelination agent, significantly led to a decrease in parameters related to spatial memory in adult male rats. Thus, from the third day, the time and distance required to find the platform in the Morris water maze increased compared to the control group, which indicates a decrease in spatial memory in rats treated with this drug.

The analysis of the findings showed that applying two-week short-term forced exercise in a special treadmill apparatus on rats during the test days, did not change the parameters of the spatial memory. Although, the long-term exercise caused a slight decrease in the time and distance traveled to find the platform on the test days compared to the control group, these changes were not significant and could not be interpreted as strengthening and improving memory. The contradiction between the results of previous studies and the present study may be due to the difference in the type of animals studied and the difference in the running speed of the animals on the treadmill or whether the exercise is voluntary or compulsory (9).

The results of the present study on the interaction of the post-treatment effect of forced exercise with memory-impairing drugs showed that although long-term exercise is effective in improving the memory of rats damaged by ethidium bromide injection, short-term exercise has a better and more significant effect on improving memory in 7-day ethidium bromide-poisoned rats. Although current evidence is insufficient to conclude, exercise is an effective treatment for Alzheimer's disease or cognitive decline (10),



### Article Message

One of the benefits of the present study is to investigate the effects of non-pharmacological treatment for memory disorders, including the beneficial effect of exercise in this regard. The developments of this study can complement other results in this field, that instead of taking medicine, memory problems in multiple sclerosis patients can be improved by increasing physical activity and exercising. One of the limitations of the present study was the time limit for conducting the research, as well as the lack of facilities and laboratory devices to measure other behavioral parameters, and tissue changes in completing and confirming the results of this study. Therefore, further studies with different methods of acute and chronic administration of ethidium bromide, as well as investigating the parameters of oxidative stress and lipid peroxidation in the hippocampus and other brain centers related to memory, are suggested to confirm the role of exercise in improving memory and learning problems.

### Ethical Considerations

#### Compliance with Research Ethical Guidelines

In the present study, the ethical standards of working with laboratory animals based on the related guidelines were considered.

#### Contribution of Authors

The authors of the article have participated in the design, execution and writing of various parts of the article.

#### Conflict of Interest

According to the authors, this article has no conflict of interest.

#### Acknowledgments

We are grateful to the esteemed Research Vice-Chancellor of Tabriz University for providing the necessary credit.

### References

1. Sengul H. S., Şengul Y., Yucel S., Forta H. Cognitive Impairment in Young Multiple Sclerosis and Essential Tremor Patients: A Comparative Study. 2016; 22(3): 109-113. J. Neurol. doi: 10.4274/tnd.46704.
2. DeLuca GC, Yates RL, Beale H, Morrow SA. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical, radiologic and pathologic. Brain Pathol. 2015; 25(1):79-98. doi: 10.1111/bpa.12220.
3. Bondan E, Lallo M, Trigueiro A, Ribeir C, Sinhorini I, Graça D. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment. Braz J Med Biol Res. 2006; 39(5): 637-646. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00019.x/abstract.



4. Garabadu D, Singh D. Ocimum basilicum attenuates ethidium bromide-induced cognitive deficits and pre-frontal cortical neuroinflammation, astrogliosis and mitochondrial dysfunction in rats. *Metab Brain Dis.* 2020; 35(3):483-495. doi: 10.1007/s11011-020-00536-z.
5. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011; 108(7):3017-22. doi: 10.1073/pnas.1015950108.
6. Loprinzi PD, Day S, Deming R. Acute Exercise Intensity and Memory Function: Evaluation of the Transient Hypofrontality Hypothesis. *Medicina .* 2019; 55(8): 445. doi: 10.3390/medicina55080445.
7. Loprinzi PD, Day S, Deming R. Acute Exercise Intensity and Memory Function: Evaluation of the Transient Hypofrontality Hypothesis. *Medicina .* 2019; 55(8): 445. doi: 10.3390/medicina55080445.
8. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *J Vis Exp.* 2011; (53):2920. doi: 10.3791/2920.
9. Redila V. A, Christie B. R. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neurosci.* 2006; 137: 1299–1307. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.050.
10. Ang E.T, Wong P.T, Moochhala S, Ng Y.K, 2003. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neurosci.* 2003; 118:335–345. doi:10.1016/S0306-4522(02)00989-2.



## تأثیر دوره‌های ورزش کوتاه و بلندمدت بر اختلال حافظه ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ مغز موش صحرایی نر

معصومه ملکی<sup>۱</sup>، حمیرا حاتمی نعمتی<sup>۲</sup>، حاتم احمدی<sup>۳</sup>، سما نصری<sup>۴</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران ( نویسنده مسئول)

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۰

### چکیده

اهداف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس شایع‌ترین بیماری ناتوان‌کننده غیرتروماتیک است که به‌جز ناتوانایی‌های حرکتی بر حافظه افراد مبتلا نیز تأثیر می‌گذارد. هدف این مطالعه، بررسی اثرات بهبوددهنده اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت بر اختلال حافظه فضایی ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA هیپوکامپ رت‌های نر بود. مواد و روش‌ها: این مطالعه روی هفت گروه هفت‌تایی از موش‌های صحرایی نر با میانگین سنی ۱۰ هفته و محدوده وزنی  $200 \pm 50$  گرم شامل گروه کنترل، گروه شاهد، گروه اتیدیوم بروماید، دو گروه تحت ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت و دو گروه آزمایشی اتیدیوم بروماید + ورزش صورت گرفت. از ماز آبی موریس به‌منظور آزمون حافظه فضایی استفاده شد. یافته‌ها: تزریق سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۰/۱) به ناحیه CA1 هیپوکامپ در روزهای سوم تا پنجم آزمایش موجب کاهش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی شد ( $P < 0.05$ ). علاوه بر این، اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت، قادر به بهبود پارامترهای زمان سپری‌شده ( $P < 0.05$ ) و مسافت طی‌شده ( $P < 0.05$ ) برای یافتن سکو در روزهای سوم تا پنجم آزمایش ناشی از اثر اتیدیوم بروماید در ماز آبی موریس شد. نتیجه‌گیری: به‌رغم اثر مفید ورزش بر بهبودی حافظه رت‌ها، نتایج مطالعه نشان داد که دوره ورزش کوتاه‌مدت در مقایسه با ورزش بلندمدت اثر بیشتری بر بهبودی حافظه رت‌های مسموم‌شده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در دوره‌ی هفت‌روزه دارد.

**واژگان کلیدی:** اتیدیوم بروماید، ورزش کوتاه‌مدت، ورزش بلندمدت، حافظه فضایی.

1. Email: Masomehmaleki71@gmail.com

2. Email: h.hatami@tabrizu.ac.ir

3. Email: hahmadi@cfu.ac.ir

4. Email: s\_nasri2000@yahoo.com



## مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (ام‌اس)<sup>۱</sup> شایع‌ترین بیماری ناتوان‌کننده غیرتروماتیک است که بر افراد کهنسال تأثیر می‌گذارد. فرضیه برجسته پاتوفیزیولوژی ام‌اس، دمیلیناسیون نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی ناشی از خود ایمنی است (۱). بروز ام‌اس در سراسر جهان همراه با تأثیرات اجتماعی و اقتصادی این بیماری در حال افزایش است (۱). بیماری مالتیپل اسکلروزیس، موجب اختلال در حافظه بلندمدت و حافظه کاری می‌شود (۲). در ۳۰ درصد از افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس، اختلال حافظه وابسته به هیپوکامپ شایع است (۲). کاهش کلی اندازه هیپوکامپ و به‌ویژه اندازه ناحیه CA1 آن در بیماران مبتلا به ام‌اس پیش‌رونده ایجاد می‌شود (۳). مطالعات مربوط به تصویربرداری عصبی نشان داده است که آتروفی ناحیه CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس روی می‌دهد (۴). به‌منظور بررسی ارتباط بین عملکرد شناختی و نوروپاتولوژی هیپوکامپ در طی بیماری مالتیپل اسکلروزیس، پژوهشگران به مدل‌های تجربی روی آورده‌اند تا فرایندهای تحلیل عصبی را نشان دهند که طی این بیماری در مغز اتفاق می‌افتد (۵). میلین‌زدایی تجربی با مواد سمی، مبنایی ساختاری برای مطالعه تغییرات مولکولی و سلولی در حین دمیلیناسیون فراهم کرده است (۶). اتیدیوم بروماید<sup>۲</sup> دارویی است که برای شبیه‌سازی فرایند پاتوفیزیولوژیک بیمارهای دمیلینه‌کننده نورون‌ها، در ایجاد مدل‌های تجربی مالتیپل اسکلروزیس جوندگان استفاده می‌شود (۶)؛ از این دارو به‌طور گسترده به‌عنوان یک مدل دمیلینه‌کننده برای ارزیابی مجدد میلیناسیون درون‌زاد در موش صحرایی استفاده می‌شود (۷). گزارش شده است که هفت روز بعد از تزریق اتیدیوم بروماید، دمیلیناسیون سمی<sup>۳</sup> یا دمیلیناسیون نورونی رخ می‌دهد (۸). مکانیسم آسیب بافتی در بیماری‌های دمیلیناسیون سیستم عصبی مرکزی کاملاً مشخص نشده است، اما شواهد زیادی بیانگر نقش استرس اکسیداتیو در این مورد، به‌دلیل نبود تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد است (۹، ۶). بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس، مقدار بیشتری از رادیکال‌های آزاد در خون دارند (۵). پیشنهاد شده است که در ضایعات دمیلینه‌کننده، اتیدیوم بروماید با فعال‌سازی و تکثیر میکروگلیا و آستروسیت‌ها می‌تواند موجب التهاب عصبی شود، اما این آسیب عصبی ممکن است با ظرفیت فیزیولوژیک CNS ترمیم شود (۶). اتیدیوم بروماید می‌تواند باعث دمیلینه‌شدن نورون‌ها از طریق التهاب عصبی در هیپوکامپ جوندگان شود (۱۰).

1. Multiple Sclerosis (MS)
2. Ethidium Bromide (EB)
3. Toxic Demyelination





حساسیت و آسیب‌پذیری نوروهای ناحیه CA1 هیپوکامپ در مقایسه با دیگر نواحی مغزی، به محرک‌های تهدیدکننده و موتاژن همچون اتیدیوم بروماید بیشتر است (۱۲، ۱۱). ورزش ملایم موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما می‌شود که تحت‌تأثیر ویتامین‌ها افزایش می‌یابد (۱۳). اعتقاد بر این است که ورزش کردن در انسان باعث افزایش یادگیری و حافظه می‌شود و زوال شناختی مرتبط با پیری را به تأخیر می‌اندازد (۱۴). مطالعات روی جوندگان نیز نشان داده است که دویدن جانور باعث بهبود عملکرد در تکالیف یادگیری وابسته به هیپوکامپ مانند یادگیری، حافظه فضایی و شرطی‌سازی ترس زمینه‌ای می‌شود (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند، فعالیت بدنی، عملکرد هیپوکامپ را تقویت می‌کند، اما مکانیسم‌های مرتبط با اثرات فعالیت بدنی کاملاً مشخص نشده است (۱۶). برخی پژوهش‌های حیوانی نشان می‌دهند، ورزش از طریق مکانیسم‌های نوروتروفیک، نورونیک و عروقی بر سلامت مغز تأثیر مثبت می‌گذارد (۱۶). به‌طور مشخص، داده‌های محدود اما قانع‌کننده نشان می‌دهند که ورزش ممکن است نورونز در هیپوکامپ را افزایش داده و بار آسیب‌شناسی عصبی را کاهش دهد (۱۷). برخی از پژوهشگران پیشنهاد کرده‌اند که ورزش باعث افزایش نوروژنایی در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ (مرکز یادگیری و حافظه) و خارهای دندریتی در نوروهای ناحیه ژيروس دندانه‌ای و CA1 هیپوکامپ و لایه III قشر انتورینال می‌شود (۱۹، ۱۸). براساس نتایج مطالعات متعدد قبلی، بعد از انجام فعالیت ورزشی کوتاه‌مدت، عملکرد حافظه تقویت می‌شود (۲۰، ۲۱). برخی پژوهشگران نیز گزارش کرده‌اند که ورزش مزمن در تقویت عملکرد حافظه کوتاه‌مدت و حافظه کاری مؤثر است (۲۲). یکی از تفاوت‌های مطالعه حاضر با مطالعات قبلی، اثر پس‌تیمار دوره‌های کوتاه‌مدت و بلندمدت فعالیت ورزشی بر تقویت و بهبودی حافظه است که در مطالعات پیشین بررسی نشده است.

هیپوکامپ در مقایسه با دیگر نواحی مغزی، به محرک‌های تهدیدکننده و موتاژن همچون اتیدیوم بروماید، حساس‌تر و آسیب‌پذیرتر است (۱۱). همچنین عملکرد در آزمون ماز آبی موریس وابسته به فعالیت هیپوکامپ است (۲۳) و درعین‌حال استفاده از این آزمون برای بررسی نقص یادگیری و حافظه در موش‌های مدل بیماری آلزایمر اثبات شده است (۲۳)، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات تقویتی و مثبت بهبوددهنده اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت دوهفته‌ای و بلندمدت دوماهه بر اختلال حافظه ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA هیپوکامپ رت‌های نر انجام شد.



## روش پژوهش

در این پژوهش تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۱۰ هفته و محدوده وزنی  $200 \pm 50$  گرم تهیه شده از دانشگاه داروسازی تهران استفاده شد. به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، جانوران به مدت دو هفته در گروه‌های پنج‌تایی در شرایط دمایی ثابت محیطی  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تنظیم نور با دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری شدند. هنگام کار با رت‌ها، موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و از رهنمودهای مربوط به استانداردهای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی پیروی شد (۲۴، ۲۵). علت انتخاب رت‌های نر، ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود.

وسایل و داروهای استفاده شده عبارت بودند از: دستگاه استریوتاکسی مدل Kopf شرکت استولتینگ Stolting آمریکا برای کانول‌گذاری مغز رت‌ها، دستگاه ترمیم مخصوص اعمال دوره‌های ورزش در رت دستگاه ماز آبی موریس (شرکت برج‌صنعت آزما، ایران)، ترازوی دیجیتال با دقت  $0.1 \text{ gr}$ ، داروی اتیدیوم بروماید به منظور دمی‌لیناسیون (شرکت Sigma, St Louis, MO, USA) که بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در محلول سالین استریل  $0.9$  درصد حل شد.

برای بیهوشی جانوران، تزریق درون‌صفاقی  $0.1$  میلی‌لیتر از مایع بیهوشی ( $100 \text{ mg/kg}$  کتامین و  $5 \text{ mg/kg}$  زایلین، شرکت Alfasan Chemical Co) برحسب کیلوگرم از وزن رت‌ها توسط سرنگ انسولینی صورت گرفت. بلافاصله رت‌ها در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات مغز رت (۲۶)، مشخصات ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ  $\{3/8\}$ -AP= (قدامی-خلفی)، از خط وسط  $ML=+2/2 \text{ mm}$  (میانی-جانبی) از سطح مجمله  $DV=+2/7 \text{ mm}$  (شکمی-پشتی) به صورت یک‌طرفه به دست آمد و کانول‌های راهنما با ضخامت ۲۳ گیج در ناحیه مذکور با دقت وارد شدند؛ به طوری که درست در سطح بالایی ناحیه CA1 قرار گیرد (۲۷). اطراف کانول‌های روی استخوان مجمله، ترکیب آکریل مخصوص دندان‌پزشکی و مونومر آن ریخته شد؛ به طوری که کانول‌ها در بالای ماده آکریل برای تزریق در دسترس باشند. در پنجمین روز دوره بهبودی بعد از جراحی، رت‌ها آماده تزریق دارو و آزمون بودند. برای تزریق دارو در روز اجرای آزمون، از سر سوزن ۲۷ گیج دندان‌پزشکی (شرکت سوپا، ایران) استفاده شد که طول آن دو میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بود و توسط لوله پلاستیکی به سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری متصل بود. برای تأیید محل تزریق داروها، ابتدا از هر گروه آزمایشی یک رت به طور تصادفی انتخاب شد و توسط کلروفورم



کشته شد. مغز جانور توسط دستگاه میکروتوم ویبرواسلایس برش داده شد و تصاویر این برش‌ها با اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه شد (شکل شماره یک).

تزریق سالین و اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز جانور انجام شد. حجم تزریق دارو برای داروها در هر نوبت سه میکرولیتر به مدت سه دقیقه (یک میکرولیتر در هر دقیقه) بود. الگوی حجم تزریق و مدت‌زمان آن، بر پایه پژوهش‌های قبلی و نیز پاسخ دوز دارویی بود (۲۷، ۸). زمان لازم برای دمیلینه‌شدن نورونی توسط سم اتیدیوم بروماید، هفت روز در نظر گرفته شد (۸). در گروه‌های آزمایشی که تحت رت‌ها ورزش قرار می‌گرفتند، پس از تزریق هفت‌روزه دارو و به‌منظور اعمال ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت، رت‌ها در دستگاه تردمیل قرار داده شدند. تعداد ۴۹ سر موش صحرایی در هفت گروه آزمایشی هفت‌تایی گروه‌بندی شدند: گروه کنترل که به این گروه هیچ‌گونه تیماری ارائه نشد، گروه شاهد که حجم سه میکرولیتر سالین ۰/۹ درصد را در هر نوبت سه دقیقه‌ای به مدت هفت روز دریافت کردند، گروه آزمایشی اتیدیوم بروماید که حجم سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ را در هر نوبت سه دقیقه‌ای به مدت هفت روز دریافت کردند، دو گروه آزمایشی تحت ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت که به ترتیب ورزش کوتاه‌مدت دوهفته‌ای و بلندمدت دو ماهه دریافت کردند، دو گروه آزمایشی اتیدیوم بروماید + ورزش که بعد از دریافت هفت‌روزه حجم سه میکرولیتر از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ، به ترتیب تحت ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت قرار گرفتند. بعد از اتمام تزریق دارو و اعمال ورزش در گروه‌های آزمایشی مرتبط، آزمون حافظه فضایی از رت‌ها در ماز آبی موریس گرفته شد.

ورزش رت‌ها: موش‌های صحرایی در گروه‌های تحت ورزش، پنج روز در هفته و به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۵ متر در دقیقه، در طول دو هفته (ورزش کوتاه‌مدت) و دو ماه (ورزش بلندمدت) در دستگاه تردمیل مخصوص رت، در شیب صفر درجه برای اعمال ورزش قرار داده شدند. در طول هر هفته و برای سازگاری حیوانات با اعمال ورزش تدریجی، به تدریج سرعت دستگاه در مدت پنج دقیقه از پنج متر به ۲۵ متر در دقیقه و زمان دویدن از ۱۰ دقیقه به ۶۰ دقیقه رسانده شد. برای اجبار حیوانات به دویدن، از یک صفحه میله‌ای مخصوص شوک الکتریکی در پشت دستگاه استفاده شد. موش‌های صحرایی در گروه‌های غیرورزشی نیز همانند گروه‌های ورزشی درحالی‌که دستگاه خاموش بود، به همان مدت در دستگاه تردمیل قرار داده شدند (۲۸). گزارشی از مطالعات قبلی درباره استفاده از این پروتکل در بهبود و ارتقای حافظه در رت‌های مبتلا به ام اس ذکر نشده است، اما از این پروتکل تمرینی برای بررسی مقایسه حافظه رت‌های مسن با رت‌های جوان استفاده شده است (۳۰، ۲۹).



بررسی حافظه فضایی: سه روز پس از اتمام تیمار با داروی اتیدیوم بروماید، اعمال ورزش کوتاه مدت و بلندمدت و تزریق دارو + اعمال ورزش کوتاه مدت و بلندمدت در گروه های آزمایشی مرتبط، روش ماز آبی موریس به منظور سنجش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی استفاده شد. دستگاه موجود در آزمایشگاه از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه‌رنگ با قطر ۱۳۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متری از آب  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد پر شده است. سکوی فلزی سیاه‌رنگ به قطر ۱۰ سانتی‌متر به طور ثابت و به صورت قراردادی در مرکز یکی از چهار ربع دایره قرار گرفته است. برای انجام آزمون، هر موش به مدت پنج روز و هر روز در یک نوبت (هر نوبت شامل چهار تجربه)، قبل از ظهر در دستگاه ماز آبی موریس آزمایش شد. پس از اتمام تجربه چهارم در هر نوبت، رت‌ها از دستگاه خارج و خشک شدند. پارامترهای قابل اندازه‌گیری و مرتبط با حافظه فضایی در ماز آبی موریس عبارت‌اند از: ۱- زمان پیدا کردن سکو؛ ۲- مسافت طی شده برای پیدا کردن سکو. این پارامترها با دوربین نصب شده و نرم افزار Maze Router ثبت مشد (۳۱).

داده‌های پژوهش در نرم‌افزار اسپاس پی‌اس تجزیه و تحلیل آماری شد. از آنجاکه داده‌ها توزیع نرمال داشتند، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه تفاوت کمی میانگین داده‌ها در گروه‌های آزمایشی و برای مقایسه تفاوت کیفی میانگین داده‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معناداری  $P < 0.05$  به عنوان تفاوت مقدار معنادار گروه‌های آزمایشی ملاک قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ رسم شد.

## نتایج

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد، اعمال ورزش به صورت پنج روز در هفته و در دو دوره کوتاه مدت دوهفته‌ای و بلندمدت دوماهه تغییری معنادار در زمان طی شده ( $P > 0.05$ )، جدول شماره یک) و مسافت طی شده برای یافتن سکو ( $P > 0.05$ )، جدول شماره یک) در ماز آبی موریس در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد، اعمال ورزش در دوره‌های کوتاه مدت و بلندمدت، تغییری معنادار در عملکرد حافظه فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس ایجاد نمی‌کند.

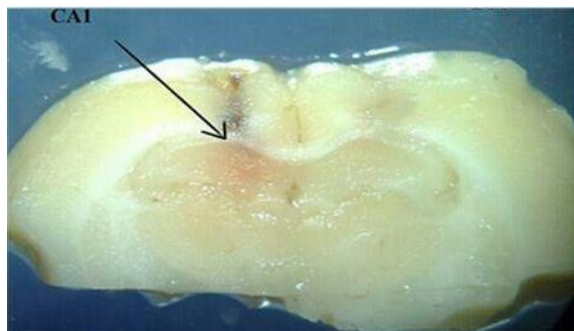
همچنین نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای بخش دیگری از نتایج مطالعه نشان داد، تزریق یک‌طرفه سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید  $0.1/0$  در دوره هفت‌روزه به ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز موش‌های صحرایی، در روزهای اول و دوم آزمایش تأثیری معنادار بر پارامترهای زمان یافتن سکو ( $P > 0.05$ )، منحنی بالای شکل شماره دو) و مسافت طی شده برای یافتن



سکو نداشت ( $P > 0.05$ )، منحنی بالای شکل شماره سه)، اما موجب تأخیر معنادار در زمان یافتن سکو در روزهای سوم، چهارم و پنجم آزمون ( $P < 0.05$ )، منحنی بالای شکل شماره دو) و نیز افزایش مسافت طی شده در روزهای سوم و چهارم ( $P < 0.01$ ) و پنجم آزمایش ( $P < 0.05$ )، منحنی بالای شکل شماره سه) در آزمون ماز آبی موریس در مقایسه با گروه کنترل شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد، تزریق دوز به‌کاررفته اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز در دوره هفت‌روزه، موجب کاهش عملکرد حافظه فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس می‌شود.

نتایج برهم‌کنش اثر دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت با تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز موش‌های صحرایی نشان داد، اعمال ورزش کوتاه‌مدت دوهفته‌ای، بعد از هفت روز از تزریق سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز رت‌ها، قادر به بهبودی اثر اتیدیوم بروماید بر زمان سپری‌شده برای یافتن سکو در روزهای چهارم ( $P < 0.01$ )، منحنی میانی شکل شماره دو) و پنجم آزمایش ( $P < 0.05$ )، منحنی میانی شکل شماره دو) و دیگر پارامتر بیانگر حافظه فضایی یعنی مسافت طی‌شده در روزهای چهارم ( $P < 0.05$ )، منحنی میانی شکل شماره سه) و پنجم آزمایش ( $P < 0.05$ )، منحنی میانی شکل شماره سه) نسبت به گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید بود. همچنین نتایج مطالعه برهم‌کنش اعمال دوره ورزش بلندمدت با تزریق اتیدیوم بروماید در موش‌های صحرایی نشان داد، اعمال ورزش بلندمدت دوماهه بعد از هفت روز از تزریق سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز، قادر به بهبودی اثر اتیدیوم بروماید بر زمان سپری‌شده در روزهای سوم و پنجم آزمایش ( $P < 0.05$ )، منحنی میانی شکل شماره دو) و مسافت طی‌شده در روز سوم آزمایش ( $P < 0.05$ )، منحنی میانی شکل شماره سه) برای یافتن سکو نسبت به گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید در ماز آبی موریس بود. مقایسه کلی نتایج برهم‌کنش اثر پس‌تیمار اعمال ورزش اجباری با داروی مختل‌کننده حافظه نشان می‌دهد، اعمال هر دو دوره ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت بر بهبودی حافظه رت‌های آسیب‌دیده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید مؤثر است، اما اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت در مقایسه با دوره‌های ورزش بلندمدت اثر بیشتری بر بهبودی حافظه رت‌های مسموم‌شده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در دوره هفت‌روزه دارد.





شکل ۱- جایگاه تقریبی محل کاتول وارد شده به طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ

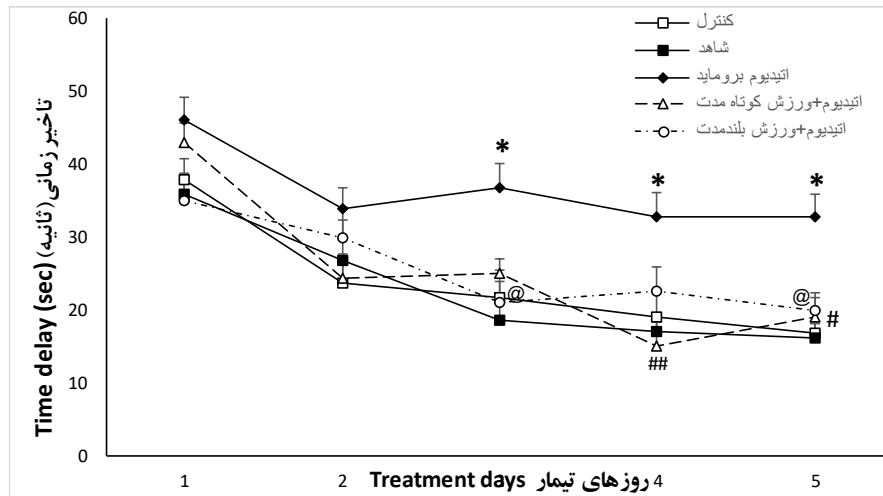
**Figure 1-** The approximate location of the inserted cannula to the left side of the CA1 area of the hippocampus

جدول ۱- اثر دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت بر زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو در ماز آبی موریس در موش صحرائی نر ( $P>0.05$ )

**Table 1-** The effect of short and long-term exercise sessions on the time spent and the distance traveled to find the platform in the Morris water maze in male rats ( $P>0.05$ )

روزهای آزمایش Test days					روزهای آزمایش Test days					گروه‌ها Groups
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
634	426	345	250	280	38	23.8	21.6	19	16.8	کنترل Control
583	442	332	353	292	30	25.8	18.3	22.2	18.2	ورزش کوتاه-مدت Short-term exercise
612	362	253	217	225	26	19.3	17.7	17.5	16.1	ورزش بلندمدت Long-term exercise
میانگین مسافت طی‌شده برای رسیدن به سکو (سانتی‌متر) Average distance traveled to reach the platform (cm)					میانگین زمان طی‌شده برای رسیدن به سکو (ثانیه) Average time taken to reach the platform (sec)					



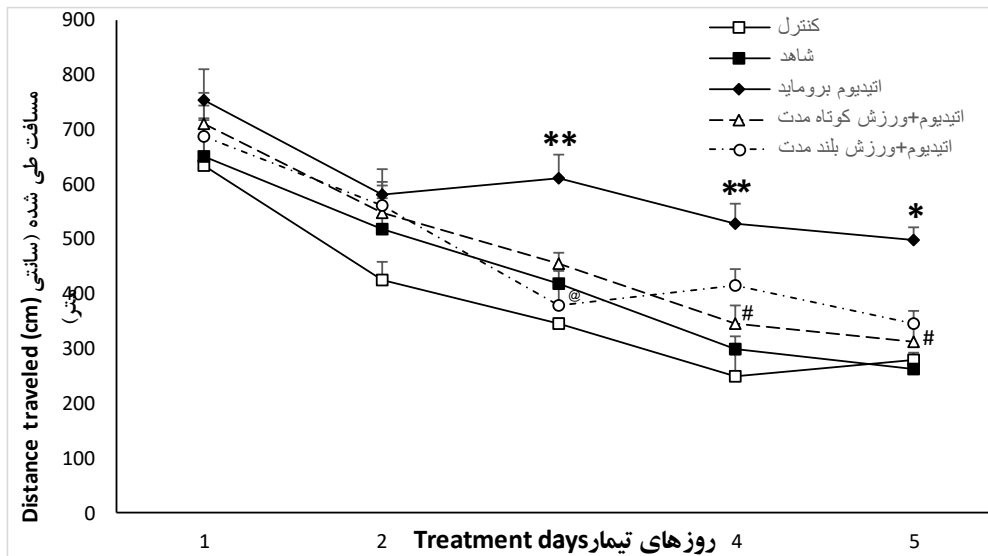


شکل ۲- اثر تزریق اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در دوره هفت‌روزه در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز و نیز برهم‌کنش دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت با تزریق اتیدیوم بروماید بر زمان سپری‌شده برای یافتن سکو در ماز آبی موریس در موش صحرائی نر

\* $P < 0.05$  نشان‌دهنده مقایسه گروه اتیدیوم بروماید با گروه کنترل است، #  $P < 0.05$ ، ##  $P < 0.01$  و @  $P < 0.05$  به ترتیب نشان‌دهنده مقایسه گروه‌های ورزش کوتاه‌مدت + تزریق اتیدیوم بروماید و نیز ورزش بلندمدت + تزریق اتیدیوم بروماید با گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید است.

**Figure 2-** The effect of injection of ethidium bromide 0.01 in a period of 7 days in the CA1 region of the hippocampus of the left side of the brain and also the interaction of short and long-term exercise periods with injection of ethidium bromide on the time spent to find the platform in the Morris water maze in rats male. \* $P < 0.05$  indicates the comparison of the ethidium bromide group compared to the control group. # $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and @  $P < 0.05$ , respectively, represent the comparison of short-term exercise + ethidium bromide injection and long-term exercise + ethidium bromide injection groups compared to the receiving group ethidium bromide.





شکل ۳- اثر تزریق اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در دوره هفت روزه در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف چپ مغز و نیز برهم کنش دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت با تزریق اتیدیوم بروماید بر مسافت طی شده برای یافتن سکو در ماز آبی موریس در موش صحرایی نر  
 نشان‌دهنده مقایسه گروه اتیدیوم بروماید با گروه کنترل است،  $P < 0.05$  و  $P < 0.05$  \*  
 به ترتیب نشان‌دهنده مقایسه گروه‌های ورزش کوتاه‌مدت + تزریق اتیدیوم بروماید و نیز ورزش بلندمدت + تزریق اتیدیوم بروماید با گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید است.

**Figure 3- The effect of injection of ethidium bromide 0.01 in a period of 7 days in the CA1 region of the hippocampus of the left side of the brain and also the interaction of short and long-term exercise periods with injection of ethidium bromide on the distance traveled to find the platform in the Morris blue maze in rats male.** \*  $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  indicate the comparison of the ethidium bromide group compared to the control group. #  $P < 0.05$  and @  $P < 0.05$ , respectively, represent the comparison of short-term exercise + ethidium bromide injection and long-term exercise + ethidium bromide injection groups compared to the group receiving ethidium bromide.

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تأثیر تزریق اتیدیوم بروماید به ناحیه CA1 هیپوکامپ برای ایجاد نمونه‌های تجربی مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس، تأثیر اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت دو هفته‌ای و بلندمدت دوماهه بر موش‌های صحرایی در دستگاه تردمیل و نیز برهم‌کنش اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلند-





مدت با تزریق اتیدیوم بروماید بر تغییرات حافظه فضایی بررسی شد. در این پژوهش نتایج به‌دست‌آمده از تزریق دارو نشان داد، تزریق دوز به‌کاررفته اتیدیوم بروماید به ناحیه CA<sub>1</sub> هیپوکامپ رت‌ها به‌عنوان عامل دمیلیناسیون، به‌صورت معناداری به کاهش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی در موش‌های صحرایی نر بالغ منجر می‌شود؛ به‌طوری‌که از روز سوم به بعد در آزمون آبی موریس در رت‌های این گروه، زمان و مسافت لازم برای یافتن سکو در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. این یافته بیانگر کاهش حافظه فضایی در موش‌های صحرایی تیمار شده با این دارو است. یافته‌های این بخش از مطالعه حاضر با نتایج پژوهش‌های قبلی همخوانی دارد. گزارش شده است که هفت روز بعد از تزریق اتیدیوم بروماید، مسافت و زمان طی‌شده در آزمون ماز آبی موریس، به‌عنوان پارامترهای مرتبط با حافظه در رت‌های درمان‌شده با این دارو در مقایسه با گروه کنترل به‌طور درخور توجهی افزایش یافت (۳۲، ۲۶). همچنین تزریق اتیدیوم بروماید به ساقه مغز رت‌ها موجب دمیلیناسیون نورون‌های این ناحیه و کاهش رفتار حرکتی آن‌ها می‌شود؛ به‌طوری‌که این رت‌ها در آزمون پیاده‌روی شعاعی در محفظه آبی، قدم‌های کمتری در مقایسه با حیوانات دمیلینه‌نشده برداشتند (۳۳). مطالعات متعددی ارتباط بین بروز استرس اکسیداتیو و تخریب و تضعیف حافظه نشان داده‌اند (۲). در مطالعات قبلی پیشنهاد کردیم، بروز استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ مغز می‌تواند از مکانیسم‌های مؤثر در توجیه اثرات دمیلیناسیون سمی ناشی از اعمال اتیدیوم بروماید در مدل تجربی موش‌های صحرایی باشد (۳۴، ۳۲).

تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش درباره اثر اعمال دوره‌های ورزش کوتاه‌مدت و بلندمدت بر حافظه فضایی در موش صحرایی نشان داد، اعمال ورزش اجباری کوتاه‌مدت دوهفته‌ای در دستگاه تردمیل مخصوص روی موش‌های صحرایی نر در روزهای آزمایش، پارامترهای مسافت طی‌شده و زمان یافتن سکوی پنهان را در مقایسه با گروه کنترل تغییر نداد. این یافته بیانگر تأثیرنداشتن این دوره ورزش بر حافظه فضایی این جوندگان است. همچنین اعمال ورزش بلندمدت موجب کاهش مختصر در زمان و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو در روزهای آزمایش در مقایسه با گروه کنترل شد، اما این تغییرات معنادار نبود و نمی‌توان آن را به معنای تقویت و بهبودی حافظه فضایی در رت‌ها توصیف کرد. گزارش‌های متناقضی از مطالعات پژوهشگران قبلی درباره اثرات مثبت و منفی اعمال ورزش در حیوانات ذکر شده است. مشابه با مطالعه حاضر، ملو<sup>۱</sup> و همکاران گزارش کردند که ورزش اجباری کوتاه‌مدت بر حافظه فضایی تأثیر ندارد (۳۵). درعین‌حال، مطالعات حیوانی نشان داده‌اند، افزایش

## 1. Mello



فعالیت‌های بدنی موجب عملکرد شناختی بهتر در رت‌ها و موش‌های سوری می‌شود (۳۶). اعمال دوی اجباری در موش‌های صحرائی موجب افزایش یادگیری و حافظه فضایی بهتر در مقایسه با رت‌های کنترل می‌شود (۳۷). همچنین تمرینات ورزشی هوازی در انسان، اندازه هیپوکامپ قدامی را افزایش می‌دهد و به بهبودی حافظه فضایی منجر می‌شود (۱۹). پژوهشگران برای اثرات مفید ورزش بر دستگاه عصبی، چندین مکانیسم پیشنهاد کرده‌اند (۳۸): دوی اجباری موجب افزایش تغییرات کمی و کیفی در نورون‌های کولینرژیک نوار افقی بروکا در سپتوم می‌شود (۳۸). در حمایت از عملکرد شناختی بهتر، به نظر می‌رسد ورزش می‌تواند نورون‌ها و بیان فاکتورهای تروفیک در بخش‌هایی از مغز را افزایش دهد (۳۷). همچنین فعالیت بدنی موجب تقویت عملکرد هیپوکامپ (۱۴) و افزایش خارهای دندریتی، نورون‌زایی و افزایش جریان خون در شکنج دندانه‌ای و CA1 هیپوکامپ، به‌عنوان مراکز مؤثر در یادگیری و حافظه می‌شود (۳۹، ۴۰)؛ با وجود این، تعدادی از پژوهشگران نیز گزارش کردند که اعمال ورزش اجباری در آزمون‌های پیچیده رفتاری اثرات سوء بر یادگیری و حافظه در موش‌های صحرائی دارد (۴۱). تمرین بدنی شش‌هفته‌ای موجب کاهش سرعت یادگیری موازی رت‌ها در کاری پیچیده می‌شود (۴۱). در این راستا و در تبیین اثرات منفی ورزش بر دستگاه عصبی، برخی از پژوهشگران مکانیسم‌هایی را پیشنهاد کرده‌اند: به این صورت که در مقایسه بین رت‌های دنده‌ای که به مدت شش هفته با تردمیل فعالیت ورزشی داشته‌اند با رت‌های کنترل بدون فعالیت ورزشی، سطح گلوتامات مغزی کاهش می‌یابد (۴۲). تناقض بین نتایج پژوهش‌های قبلی و مطالعه حاضر، ممکن است ناشی از تفاوت در نوع حیوانات مطالعه‌شده و تفاوت در سرعت دوی حیوانات روی دستگاه تردمیل و داوطلبانه یا اجباری بودن ورزش باشد (۳۸، ۴۳).

آزمون انجام‌شده در مطالعه حاضر، رفتاری بود و تفسیر و تبیین روز به روز داده‌های به‌دست‌آمده تاحدی دشوار به نظر می‌رسد؛ بنابراین نتایج به‌دست‌آمده از برهم‌کنش اثر پس‌تیمار ورزش اجباری کوتاه‌مدت و بلندمدت با تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی نشان می‌دهد که اعمال ورزش کوتاه‌مدت دو هفته‌ای، اثر نامناسب اتیدیوم بروماید تزریق‌شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز رت‌ها بر پارامترهای زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو در روزهای چهارم و پنجم آزمون ماز آبی موریس را بهبود بخشید؛ در حالی که اعمال ورزش بلندمدت دوماه بعد از تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز، در روز سوم آزمایش هر دو پارامتر زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو را بهبود داد و در روز پنجم آزمون نیز موجب بهبودی اثر این دارو بر پارامتر زمان سپری‌شده برای یافتن سکو شد. نتایج پژوهش حاضر درباره برهم‌کنش اثر پس‌تیمار ورزش اجباری با داروی مختل‌کننده حافظه نشان می‌دهد، اعمال دوره ورزش بلندمدت



بر بهبودی حافظه رت‌های آسیب‌دیده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید مؤثر است، اما اعمال دوره ورزش کوتاه‌مدت اثر بهتر و بیشتری بر بهبودی حافظه رت‌های مسموم‌شده ناشی از مصرف اتیدیوم بروماید در مصرف هفت‌روزه دارد. بنا به پیش‌فرض اثر مختل‌کننده حافظه اتیدیوم بروماید با مکانیسم افزایش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی (۳۴، ۳۲، ۲)، در مطالعات پیشین نیز برهم‌کنش اثر داروهای آنتی‌اکسیدانی با اثر داروهای مختل‌کننده حافظه و از جمله اتیدیوم بروماید بررسی شده است (۴۴، ۱۱). گزارش شده است که تیمار بلندمدت با استفاده از ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی D3 و E، وسعت دمیلیناسیون القاشده با اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ را به‌طور درخور توجهی کاهش می‌دهد (۱۱). مطالعات پیش‌بالینی بیانگر اثربخشی درمانی چندین داروی گیاهی بر بهبودی اختلالات شناختی بیماری مالتیپل اسکلروزیس است (۴۴). در مطالعه قبلی گزارش کردیم که تزریق درون‌مغزی عصاره گیاه باکوپا مونرو در ناحیه CA1 هیپوکامپ قادر به بهبودی حافظه رت‌های مسموم‌شده ناشی از تزریق سه‌روزه اتیدیوم بروماید است؛ در صورتی که اثر نامناسب تزریق هفت‌روزه اتیدیوم بروماید بر حافظه فضایی را تغییر نداد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر نیز گزارش کردیم، عصاره زعفران می‌تواند اختلال در یادگیری و حافظه و نیز اختلال در پارامترهای استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مدل‌های تجربی ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید را بهبود بخشد (۴۵). مشابه با نتایج مطالعه حاضر، موریس و همکاران در پژوهشی روی افراد مبتلا به بیماری آلزایمر گزارش کردند، بهبودی در آمادگی قلبی-تنفسی باعث افزایش عملکرد حافظه و تغییر حجم مغز می‌شود (۴۶). ورزش هوازی در مراحل اولیه ابتلا به بیماری، به توانایی عملکردی در افراد مبتلا به بیماری آلزایمر کمک می‌کند. آمادگی قلبی-تنفسی ممکن است برای بهبود عملکرد حافظه و کاهش هیپوکامپ مهم باشد (۴۶). افزایش آمادگی قلبی-تنفسی نیز اثرات مضر آمیلوئید مغزی بر شناخت را کاهش می‌دهد (۱۷). شواهد کنونی برای نتیجه‌گیری اینکه ورزش درمانی مؤثر برای بیماری آلزایمر یا زوال شناختی است، کافی نیست (۴۷)، اما با این توضیحات، نتایج پژوهش‌ها درباره اثرات ورزش در این زمینه همچنان امیدوارکننده است (۴۸).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، محدودیت زمانی برای انجام پژوهش و کمبود امکانات و دستگاه‌های آزمایشگاهی برای سنجش دیگر پارامترهای رفتاری و تغییرات بافتی در تکمیل و تأیید نتایج مطالعه بود؛ بنابراین مطالعات بیشتر با شیوه‌های مختلف تجویز داروی اتیدیوم بروماید به‌صورت حاد و مزمن و نیز بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ و دیگر مراکز مغزی مرتبط با حافظه، برای تأیید نقش ورزش در بهبودی مشکلات حافظه و یادگیری پیشنهاد می‌شود.



### پیام مقاله

از مزایای این پژوهش، بررسی اثرات درمان غیردارویی برای اختلالات حافظه و از جمله اثر مفید ورزش در این راستاست. نتایج این پژوهش می‌تواند مکمل دیگر نتایج در این زمینه باشد؛ به این صورت که به جای مصرف دارو می‌توان با افزایش فعالیت بدنی و ورزش کردن، مشکلات حافظه در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس را بهبود بخشید.

### منابع

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis—a review. *Eur J Neurol*. 2018;26(1):27-40.
2. Sengul HS, Şengul Y, Yucel S, Forta H. Cognitive impairment in young multiple sclerosis and essential tremor patients: a comparative study. *J Neurol*. 2016;22(3):109-13.
3. McMurran CE, Zhao C, Franklin RJM. toxin-based models to investigate demyelination and remyelination. In: Lyons D, Kegel L. editors. *Oligodendrocytes: methods in molecular biology*. Humana Press, New York, NY; 2019. pp. 377-96.
4. Kim DS, Kim JY, Han Y. Curcuminoids in neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2012;7(3):184-204.
5. DeLuca GC, Yates RL, Beale H, Morrow SA. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical, radiologic and pathologic. *Brain Pathol*. 2015;25(1):79-98.
6. Kumar N, Sharma N, Khera R, Gupta R, Mehan S. Guggulsterone ameliorates ethidium bromide-induced experimental model of multiple sclerosis via restoration of behavioral, molecular, neurochemical and morphological alterations in rat brain. *Metab Brain Dis*. 2020;36:911-25.
7. Kuypers NJ, James KT, Enzmann GU. Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. *Exp Neurol*. 2013; 247:615-22.
8. Bondan E, Lallo M, Trigueiro A, Ribeir C, Sinhorini I, Graça D. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(5):637-46.
9. Abdel-Salam OME, Khadrawy YA, Mohammed NA, Youness ER. The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2012;23(2):61-8.
10. Goudarzvand M, Choopani S, Shams A, Javan M, Khodaii Z, Ghamsari F, et al. Focal injection of EB as a simple model to study cognitive deficit. *Basic Clin Neurosci*. 2016; 7:63-72.
11. Garabadu D, Singh D. *Ocimum basilicum* attenuates ethidium bromide-induced cognitive deficits and pre-frontal cortical neuroinflammation, astrogliosis and mitochondrial dysfunction in rats. *Metab Brain Dis*. 2020;35(3):483-95.



12. Emeterio EPS, Tramullas M, Hurlé MA. Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *J Neurosci*. 2006;83(7):1352-61.
13. Carlsohn A, Rohn S, Bittmann F, Raila J, Mayer F, Schweigert FJ. Exercise increases the plasma antioxidant capacity of adolescent athletes. *Ann Nutr Metab*. 2008;53(2):96-103.
14. Stranahan A.M, Khalil D, Gould E. Running Induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007; 17:1017–22.
15. Burghardt PR, Pasumarthi RK, Wilson MA, Fadel J. Alterations in fear conditioning and amygdalar activation following chronic wheel running in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 84:306–312.
16. Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement*. 2009;5(4):287–94.
17. Schultz SA, Boots EA, Almeida RP, Oh JM, Einerson J, Korcarz CE, et al. Cardiorespiratory fitness attenuates the influence of amyloid on cognition. *J Int Neuropsychol Soc*. 2015;21(10):841–50.
18. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Arch Neuropsychiatr*. 2011;108(7):3017-22.
19. Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, Tirone F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull*. 2018; 143:181-93.
20. Loprinzi PD, Day S, Deming R. Acute exercise intensity and memory function: evaluation of the transient hypofrontality hypothesis. *Medicina*. 2019;55(8):445.
21. Labban JD, Etnier JL. The effect of acute exercise on encoding and consolidation of long-term memory. *J Sport Exerc Psychol*. 2018; 40:336–42.
22. Rathore A, Lom B. The effects of chronic and acute physical activity on working memory performance in healthy participants: A systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *Syst Rev*. 2017 6:124.
23. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *J Vis Exp*. 2011; (53):2920.
24. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.
25. Pasupuleti MK, Molahally S.S, Salwaji S. Ethical guidelines, animal profile, various animal models used in periodontal research with alternatives and future perspectives. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(4):360–8.
26. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Cambridge: Academic Press; 2006.
27. Goudarzvand M, Choopani S, Shams A, Javan M, Khodaii Z, Ghamsari F, et al. Focal injection of ethidium bromide as a simple model to study cognitive deficit and its improvement. *Basic a Clin Neurosci*. 2016;7(1):63-73.



28. Lee MH. Treadmill exercise enhances nitric oxide synthase expression in the hippocampus of food-deprived rats. *Nutr Res.* 2005; 25:771-9.
29. Redila VA, Christie BR. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neurosci.* 2006; 137:1299-307.
30. Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocamp.* 2007; 17:1017-22.
31. Giralt A, Saavedra A, Carretón O, Xifró X, Alberch J, Pérez-Navarro E. Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease. *Human molecular genetics.* 2011;20(21):4232-47.
32. Aghayi Nojehdeh S, Hatami Nemati H, Malek Ahmadi M, Banan Khojasteh SM, Ahmadi H. The effect of *Bacopa monnieri* on spatial memory impairment and lipid peroxidation induced by local injection of ethidium bromide in the hippocampus of rat. *J Animal Res.* 2021;34(1):28-41.
33. Nassar CCS, Bondan E, Alouche SR. Effects of aquatic exercises in a rat model of brainstem demyelination with ethidium bromide on the beam walking test. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009;67(3A):652-6.
34. Rhimluoye ZM, Alihemati AR, Hatami Nemati H, Hatam Ahmadi H. The effect of NO system on ethidium bromide-induced oxidative stress in the hippocampal formation of male rats. *J Inflamm Diseases.* 2019;23(3):190-201.
35. Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc.* 2008;80(2):301-9.
36. Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav.* 2000;70:425-9.
37. Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng YK, 2003. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neurosci.* 2003; 118:335-45.
38. Anga E-T, Daweb GS, Wong PTH, Moochhala S, Ng Y-K. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 2006;1113(1):186-93.
39. Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM. Et al. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:5638-43.
40. Rex CS, Lauterborn JC, Lin CY, Kramar EA, Roger GA, Gall CM, et al. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol.* 2006; 96:668-677.
41. Braszko JJ, Kamin Ski KA, Hryszko T, Jedynek W, Brzo Sko S. Diverse effects of prolonged physical training on learning of the delayed nonmatching to sample by rats. *Neurosci Res.* 2001; 39:79-84.
42. Lautenschlager NT, Almeida OP. Physical activity and cognition in old age. *Curr Opin Psychiatry.* 2006; 19:190-3.



43. Longoni G, Rocca MA, Pagani E, et al. Deficits in memory and visuospatial learning correlate with regional hippocampal atrophy in MS. *Brain Struct Funct* 2015;220:435–44.
44. Carvalho FB, Gutierrez JM, Bohnert C, Zago AM, Abdalla FH, Viira JM, et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *J Nutr Biochem*. 2015; 26:378–90.
45. Ghaffari Sh, Hatami H, Dehghan Gh. Saffron ethanolic extract attenuates oxidative stress, spatial learning, and memory impairments induced by local injection of ethidium bromide. *Res Pharm Sci*. 2015;10(3):222–32.
46. Morris JK, Vidoni ED, Johnson DK, Van Sciver A, Mahnken JD, Honea RA, et al. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. *PLoS One*. 2017;10(12): e0170547.
47. Forbes D, Forbes SC, Blake CM, Thiessen EJ, Forbes S. Exercise programs for people with dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;4:CD006489.
48. Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and parkinson's disease: a narrative review. *J Clin Neurol*. 2015;11(3):212–9.

### استناد به مقاله

ملکی معصومه، حاتمی نعمتی حمیرا، احمدی حاتم، نصری سما. تأثیر دوره‌های ورزش کوتاه و بلندمدت بر اختلال حافظه ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ مغز موش صحرائی نر. *فیزیولوژی ورزشی*. پاییز ۱۴۰۱؛ ۱۴(۵۵): ۹۴-۷۱. شناسه دیجیتال: 10.22089/SPJ.2022.12871.2193

M. Maleki, H. Hatami Nemati, H. Ahmadi, S. Nasri. The Effect of Short- and Long-Term Exercise Courses on Memory Impairment Induced by Ethidium Bromide Injection in the Hippocampus of the Brain of Male Rats. *Fall 2022; 14(55): 71-94. (In Persian)*. Doi: 10.22089/SPJ.2022.12871.2193

