

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۲۰، تیر ۱۴۰۰، ۴۳۴-۴۱۵

اثر ۶ هفته تمرین ترکیبی بر فاکتورهای NeuN و NF200 و تعداد سلول‌های زنده CA1 هیپوکمپ موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار: یک مطالعه تجربی

پیمان حسن نژاد ملومه^۱، علیرضا علمیه^۲، محمدرضا فدائی جافی^۳

دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ترکیب تمرین مقاومتی و استقامتی تأثیر متنوعی بر بافت مغز دارد. هدف از مطالعه حاضر تعیین تغییرات بافتی و فاکتورهای NeuN و NF200 در ناحیه CA1 هیپوکمپ متعاقب ۶ هفته تمرین ترکیبی در موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۰ موش صحرائی به ۶ گروه کنترل و تمرین جوان (۲ هفته)، کنترل و تمرین میانسال (۸ هفته) و کنترل و تمرین پیر (۲۴ ماهه) تقسیم شدند. گروه‌های تمرین ورزشی به مدت ۶ هفته با برنامه ترکیبی، تمرین داده شدند. برای بررسی تغییرات بافتی هیپوکمپ از روش کریزل ویوله، بیان ژن NeuN و NF200 از روش Real time-PCR و هم‌چنین پروتئین NF200 از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t مستقل و آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

یافته‌ها: نسبت به گروه‌های کنترل، گروه‌های تمرین جوان ($p=0/005$) و میانسال ($p=0/008$) افزایش معنی‌دار سلول‌های زنده عصبی و هم‌چنین گروه‌های تمرین جوان ($p=0/003$)، میانسال ($p<0/001$) و پیر ($p=0/021$) افزایش معنی‌دار پروتئین NF200 بافت هیپوکمپ را نشان دادند. در بررسی بین گروه‌های تمرین، گروه جوان افزایش معنی‌دار پروتئین NF200 را نسبت به گروه‌های میانسال و پیر داشت ($p<0/001$). بین سه گروه تمرین در بیان ژن NeuN و NF200 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

نتیجه‌گیری: ۶ هفته تمرین ترکیبی در سنین جوانی و میانسالی تأثیر بیشتری بر سلول‌های زنده عصبی می‌گذارد. هم‌چنین این تمرینات بهبود قابل توجه در پروتئین NF200 (بدون تغییر معنی‌دار در ژن) ایجاد کرد. به نظر می‌رسد این تفاوت تحت تأثیر مراحل اندازه‌گیری و منابع ترشح دیگر باشد.

واژه‌های کلیدی: هیپوکمپ، تمرین ورزشی، موش صحرائی ویستار

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- نویسنده مسئول) گروه تربیت بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تلفن: ۰۱۳-۴۴۲۲۷۰۶۰، دورنگار: ۰۱۳-۴۴۲۲۷۰۶۰، پست الکترونیکی: elmieh1592@gmail.com

۳- گروه تربیت بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

مقدمه

اثرات محافظت عصبی ناشی از ورزش با مکانیسم‌های مولکولی متنوع در مطالعات تشریح شده است [۱]. بیشتر مطالعات به بررسی فاکتورهای نوروتروفیک از جمله فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF) پرداخته و تنظیم مثبت آن را با تمرین ورزشی در بافت مغزی و هیپوکمپ تأیید کرده‌اند [۲]. با این وجود تمرین ورزشی در سنین مختلف می‌تواند مسیرهای مولکولی مختلف را تنظیم و تأثیرات تقویتی و درمانی نیز بر جای گذارد. آنتی‌ژن هسته‌ای عصبی (Neuronal Nuclei; NeuN) یک پروتئین هسته‌ای ویژه در نورون مهره‌داران است [۳] که بیان آن در مغز انسان بالغ و در CNS موش در حال رشد مورد تأیید قرار گرفته است [۳]. بیان شده که NeuN به عنوان یک مارکر خاص از سلول‌های عصبی بالغ بوده و افزایش آن در محافظت عصبی می‌تواند مؤثر باشد [۴]. Kim و همکاران نشان دادند ورزش تردمیل با افزایش بیان NeuN از اختلالات حافظه کوتاه مدت ناشی از التهاب مغزی پیش‌گیری می‌کند زیرا که NeuN بلوغ عصبی را تسهیل می‌کند [۵]. با این وجود اطلاعات اندکی در رابطه با تغییرات NeuN در مدل‌های مختلف تمرینی در سنین مختلف وجود دارد. مطالعات محدودی نیز نقش نوروفیلانمنت ۲۰۰ مغز را با تمرین ورزشی مورد بررسی قرار داده‌اند [۶]. نوروفیلانمنت‌ها دسته‌ای از فیلامنت‌های بینابینی هستند که در سلول‌های عصبی یافت می‌شوند. آن‌ها ساختار اسکلت سلولی را تشکیل و به خصوص در آکسون‌ها بسیار زیاد یافت

می‌شوند. نورون‌های نخاعی پروتئین‌های نوروفیلانمنت با وزن مولکولی کم (۶۸ کیلو دالتون)، متوسط (۱۵۵ کیلو دالتون) و بالا (۲۰۰ کیلو دالتون) را بیان می‌کنند [۷]. نوروفیلانمنت ۲۰۰ (Neurofilament; NF200) به طور معمول به عنوان نشانگر ایمونوهیستوشیمیایی برای ساختار و عملکرد سلول‌های عصبی در بافت مغز و نخاع استفاده می‌شود [۷]. در مطالعات نشان داده شده که از دست دادن NF200 در قشر مغز با تخریب بیشتر در شرایط ایسکمیک همراه می‌باشد [۸]. کاهش در NF ممکن است نشان دهنده تغییر مداوم در اسکلت سلولی باشد که با ویژگی‌های مورفوپاتولوژیک در آکسون آسیب دیده همراه است [۹]. NF200 عنصر اصلی رشته‌های عصبی هستند و از دست دادن گسترده این پروتئین می‌تواند عملکرد نوروفیلانمنت را در سلول‌های عصبی به خطر بی‌اندازد [۱۰]. لذا تغییرات تخریب این فاکتور می‌تواند آسیب‌های بافت مغز را به همراه داشته باشد [۱۰]. در رابطه با تأثیر تمرین ورزشی بر ساختار بافتی به ویژه بافت هیپوکمپ مطالعات زیادی انجام شده است [۱۱]. محققان بر این باورند که ورزش می‌تواند فعالیت سیستم عصبی را افزایش داده و نورون‌زایی را در این بافت گسترش دهد [۱۲]. هم‌چنین نشان داده شده تأثیر مثبت فعالیت بدنی بر سلول‌های مغزی و هیپوکمپ (به عنوان محلی برای حافظه و یادگیری) مربوط به بهبود شکل‌پذیری عصبی، نورون‌زایی و ترمیم نورون‌های آسیب دیده است که به نوبه خود منجر به بهبود ساختاری و بافتی می‌شود [۱۳]. معمولاً عملکرد حافظه در سنین مختلف متفاوت بوده و تقویت آن در هر رده سنی می‌تواند بر کیفیت

خاموشی ۶ عصر)، دما (22 ± 3 سانتی گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگره‌داری شدند. تعداد ۵-۳ موش صحرایی در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی متر به گونه‌ای نگره‌داری شدند به طوری که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل نگره‌داری و کشتار موش‌های صحرایی بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت انجام شد (کد اخلاق IR.IAU.RASHT.REC.1399.024). حیوانات پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه در سه گروه جوان (شروع از ۲ و ۳ هفتگی تا پایان ۶ هفته تمرین)، میانسال (شروع از ۸ هفتگی تا پایان ۶ هفته تمرین) و پیر (شروع از ۲۴ ماهگی تا پایان ۶ هفته تمرین) تقسیم بندی شدند [۱۸] که هر گروه شامل ۵ سر موش صحرایی کنترل بدون ورزش و ۵ سر موش صحرایی با تمرین ورزشی بود.

برنامه تمرینی به مدت ۶ هفته به صورت ترکیب تمرین مقاومتی روی نردبان و هوازی روی نوارگردان حیوانی (تجهیز گستر ایرانیان، مدل ۲۰۱۶) انجام شد. تمرین مقاومتی شامل ۳ جلسه تمرین در هفته (شنبه، دوشنبه، چهارشنبه) به مدت ۶ هفته بود که هر جلسه ۳ نوبت و هر نوبت شامل ۴ بار بالا رفتن از نردبان مخصوص به ارتفاع ۱ متر و ۲۶ پله با فاصله ۴ سانتی متر پله‌ها از هم بود. بین هر نوبت ۳۰ ثانیه استراحت برای حیوانات در نظر گرفته شده بود. پس از بستن وزنه به دم حیوانات، وادار به صعود از نردبان عمودی شدند. اصل اضافه بار با افزایش درصد وزن بدن به صورت هفتگی انجام می‌شد

زندگی آن دوره نیز مؤثر باشد. از جهتی نیز تقویت حافظه در سنین پایین‌تر و میانسالی می‌تواند به پیش‌گیری از بیماری‌های زوال عقلی در سنین بالاتر کمک کند زیرا که نشان داده شده انجام منظم تمرین ورزشی در سنین مختلف می‌تواند در پیش‌گیری و به تأخیر انداختن بیماری آلزایمر نیز مؤثر باشد [۱۴]. متغیرهای مختلفی از جمله نوع، شدت و فرکانس ورزش وجود دارد که ممکن است بر اثربخشی ورزش به عنوان یک روش محافظت از نورون در انسان تأثیر بگذارد [۱۵]. استفاده از تمرینات ترکیبی مقاومتی و استقامتی تأثیرات متنوعی دارد. بیشتر مطالعات در بررسی تأثیر تمرین ورزشی بر هیپوکمپ فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از مغز را ارزیابی کرده‌اند [۱۶]. با این وجود مطالعات در رابطه با تغییرات NF200 و NeuN هیپوکمپ با تمرین ورزشی به ویژه تمرین ترکیبی محدود است [۱۷]. لذا در این مطالعه هدف تعیین تأثیر ۶ هفته تمرین ترکیبی بر تعداد سلول‌های زنده هیپوکمپ، بیان ژن NeuN و همچنین بیان ژن و بیان پروتئین NF200 در ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش‌های صحرایی ویستار جوان، میانسال و پیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود که در زمستان ۱۳۹۹ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی رشت انجام شد. تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران در سه رده سنی تهیه شدند و پس از انتقال موش‌های صحرایی به محیط آزمایشگاه، حیوانات در شرایط کنترل شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع

بدین صورت که در هفته اول میزان وزنه بسته شده به دم حیوان ۳۰ درصد و به تدریج از هفته دوم ۷۰ درصد، هفته سوم ۱۰۰ درصد، هفته چهارم ۱۲۰ درصد، هفته پنجم ۱۴۰ درصد و هفته ششم ۱۶۰ درصد وزن بدن آن‌ها بود [۱۹]. برای تمرین استقامتی نیز در ابتدا حیوانات به مدت ۳ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوار گردان قرار گرفتند. تمرینات برای ۳ جلسه در هفته (یکشنبه، سه شنبه و پنج شنبه) و در روزهای متناوب با تمرینات مقاومتی و به مدت ۶ هفته انجام شد. شدت تمرین در هفته اول معادل ۵۰ درصد حداکثر سرعت بود. که به تدریج در هفته ششم به ۸۰ درصد رسید. مدت زمان تمرین در هر جلسه تمرینی ۳۰ دقیقه بود [۱۹].

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، کلیه موش‌های صحرایی با تزریق کتامین (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلارین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس خون از قلب حیوان گرفته شد. پس از اطمینان از قربانی شدن حیوان با رعایت اصول اخلاقی بافت برداری انجام شد. برای برداشتن بافت مغز، جمجمه از ناحیه قدامی و خلفی باز شده و با کمک درز میانی، جمجمه شکافته شده و سپس بافت مغز با بالاترین حساسیت خارج شد. پس از خروج بافت مغز از ناحیه هیپوکمپ مغز به دو قسمت قدامی و خلفی تقسیم شد به گونه‌ای که هیپوکمپ در دو بافت قرار داشت. سپس قسمت قدامی برای اندازه‌گیری های بافتی به فرمالین ۱۰ درصد منتقل شده و قسمت خلفی نیز برای اندازه‌گیری بیان ژن، در

نرمال سالین ۹ درصد شست و شو و در میکروتیوب به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد [۲۰].

در این مطالعه از رنگ‌آمیزی Cresyl violet برای رنگ آمیزی اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌ها استفاده شد که در این روش اجسام نیسل به رنگ بنفش - آبی دیده می‌شوند. پس از فیکس کردن، غالب گیری و برش توسط دستگاه میکروتوم (model kd-3390 Germany) به ضخامت ۷ میکرون، نمونه‌ها روی لام قرار داده شده و پس از شفاف سازی و آبدهی، نمونه‌ها با Cresyl violet یک درصد رنگ آمیزی شدند. این رنگ‌آمیزی معمولاً برای شناسایی نکروز در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود. سپس با استفاده از فتومیکروسکوپ نوری (64105, Zeiss, Germany) و بزرگنمایی ۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ بافت هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شمارش سلولی در یک میلی‌متر مربع هیپوکمپ، از نرم‌افزار Image J (version 1.51r; NIH, Maryland, USA) استفاده شد [۲۱].

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. برای این کار، میزان ۲۰۰ لاندا کیاژول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه (INC246, MEMMERT, Germany) شد. پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد خرد شد و به منظور لیز نمونه‌ها میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت ۱ دقیقه به آن‌ها اضافه شد. محلول حاصل، با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ

قرار گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان NeuN و NF200 از روش کمی Real time-PCR انجام شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های NeuN و NF200 در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن انجام شد. از ژن گلیسرآلدئید-۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به روش زیر محاسبه شد.

به این صورت که ابتدا سیکل آستانه ژن مورد نظر هر نمونه را از سیکل آستانه ژن خانه گردان همان نمونه کم شد ($\Delta Ct = Ct \text{ Target} - Ct \text{ Housekeeping}$) در مرحله بعد، ΔCt هر نمونه را از نمونه‌ای که نسبت به آن نیاز بود مقایسه شود کم کرده، منفی عدد به دست آمده را به توان دو رسانده و بیان نسبی ژن NLRP1 را به دست می‌آوریم [۲۰].

$\Delta\Delta Ct - E = 2$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Target} - \Delta Ct \text{ Reference}$)
توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ زیر گزارش شده است.

(Germany, HETTICH, EBA200) گردید. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. نمونه‌ها در سانتیفریوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن ۱ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. مایع رویی تخلیه گردید و پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. میزان ۲۰ لاند آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده

جدول ۱- جدول توالی پرایمرها برای RT-Pcr

Gene name	Oligo sequence 5'-3'
NeuN	F: 5' CTTGTTAAAATGCCAGTCCC 3' R: 5' CTCAGCACCATAAAAATCCATC 3'
NF200	F: 5' CTCCTCCCTCTTCTGCTCT 3' R: 5' CTCCTCCCTCTTCTGCTCT 3'
GAPDH	F: 5' GTGCCGTTGAATTTGCCGTG 3' R: 5' GGAGAGTGTTCCTCGTCCC 3'

قسمتی از بافت مغز حیوانات بلافاصله استخراج و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از تثبیت نمونه‌ها، بافت‌های قالب‌گیری شده در پارافین توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر گرفته شد. برش‌های به‌دست آمده به منظور بازیابی آنتی ژنی، در بافر TBS1X (pH=۹/۲) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها استفاده گردید پس از شست و شو با PBS، سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده ضد NF200 (۱ به ۱۰۰) با PBS به مدت یک شب به نمونه اضافه گردید و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شست و شو با PBS آنتی بادی ثانویه متصل شده با رنگ FITC اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. در نهایت به منظور رنگ آمیزی هسته، به نمونه‌ها DAPI اضافه شد. در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت (Olympus، CX23، Japan) و با لنز ۴۰۰ برای تأیید مارکرها مشاهده شدند [۲۲].

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۹ استفاده شد. از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده و نتایج نشان داد که تمام داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند (۰/۰۵).

($P >$). برای ارزیابی تغییرات متغیرها در دو گروه تمرین و کنترل در هر رده سنی از آزمون t مستقل، و همچنین برای ارزیابی متغیرها در گروه‌های تمرینی در سه رده سنی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

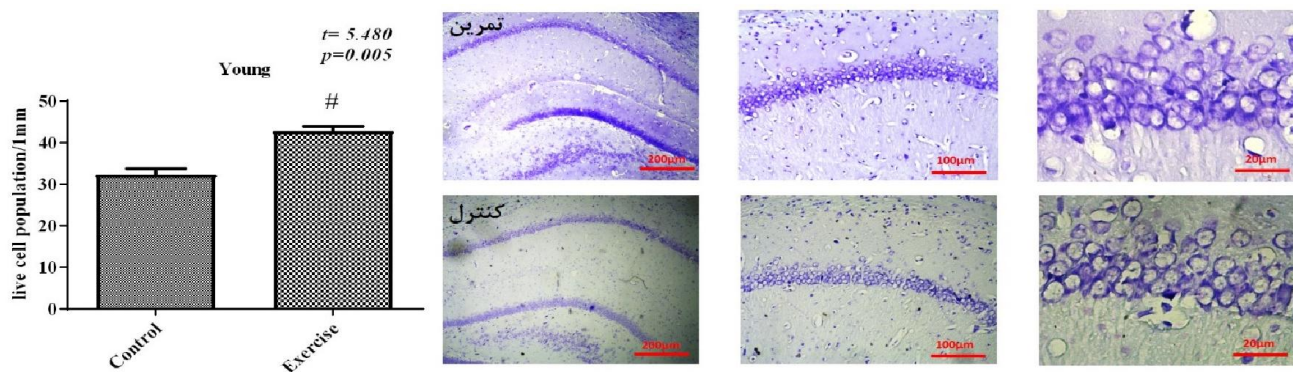
نتایج

در مطالعه حاضر برای بررسی تغییرات بافتی و هیستوپاتولوژیک از روش کریزل ویوله استفاده شد (شکل ۱ و ۲). برای ارزیابی جمعیت سلول‌های زنده در این تصاویر بین گروه‌های تمرین و کنترل در ۳ رده سنی نیز از آزمون t مستقل استفاده شد. بر اساس این نتایج گروه‌های جوان ($p = ۰/۰۰۵$) و ($t = ۵/۴۸۰$) و میانسال ($p = ۰/۰۰۸$ و $t = ۴/۹۰۲$) افزایش معنی‌دار جمعیت سلول‌های عصبی زنده را نسبت به گروه‌های کنترل خود نشان دادند (شکل ۱ الف و ب). این در حالی بود که تعداد سلول‌های عصبی زنده گروه پیر افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل خود نشان نداد و تغییرات آن معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۱ ج).

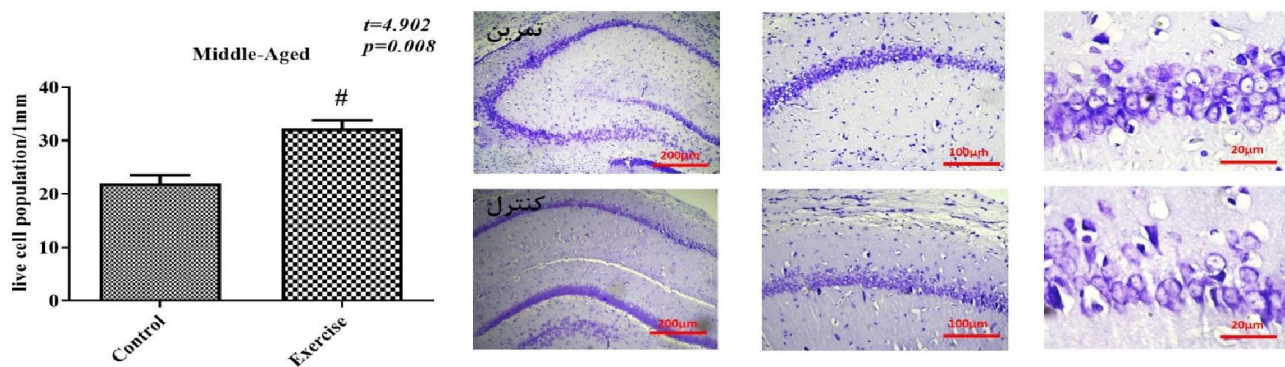
نتایج آزمون Levene نشان داد که واریانس‌های داده‌های گروه کنترل و تمرین در تحقیق همگن بود (گروه جوان: سلول‌های زنده: $p = ۰/۸۱۲$ و $F = ۰/۰۶۵$ ، ژن NeuN: $۰/۹۶۷$ ، $p = ۰/۰۰۱$ و $F = ۰/۰۰۱$ ، ژن NF200: $p = ۰/۷۴۸$ و $F = ۰/۱۱۹$ ، پروتئین NF200: $p = ۰/۶۸۱$ و $F = ۰/۱۹۶$)، (گروه میانسال: سلول‌های زنده: $p = ۰/۸۲۳$ و $F = ۰/۰۵۷$ ، ژن NeuN: $۰/۸۱۲$ ، $p = ۰/۰۶۴$ و $F = ۰/۰۶۴$ ، ژن NF200: $p = ۰/۶۱۴$ و $F = ۰/۲۹۸$ ، پروتئین NF200: $p = ۰/۵۸۷$ و $F = ۰/۳۴۸$)، (گروه پیر: سلول‌های زنده: $p = ۰/۶۴۳$ و $F = ۰/۲۵۰$ ، ژن NeuN: $p = ۰/۰۷۳$ و

آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.
 NF200: $p=0.082$ و $F=5.316$. سطح معنی داری در
 NF200: $p=0.103$ و $F=5.854$ ژن $p=0.005$ و $F=4.429$ پروتئین

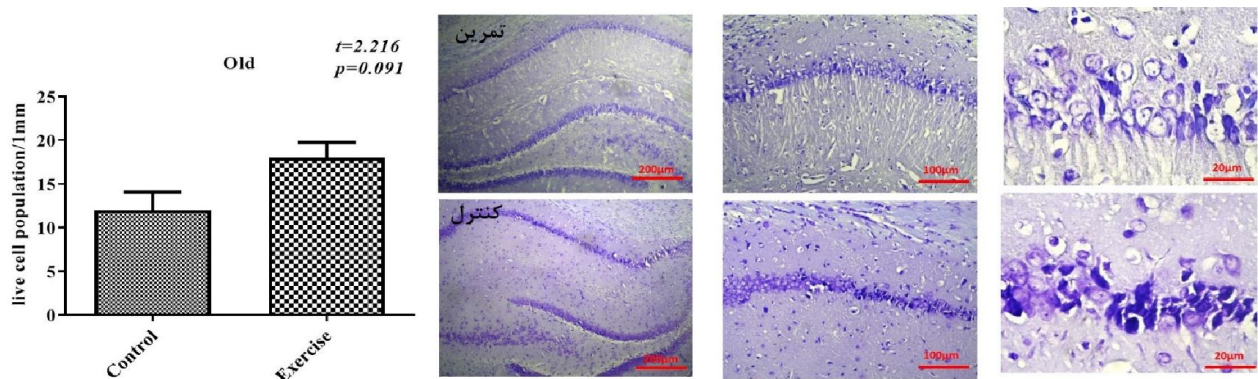
(الف)



(ب)



(ج)

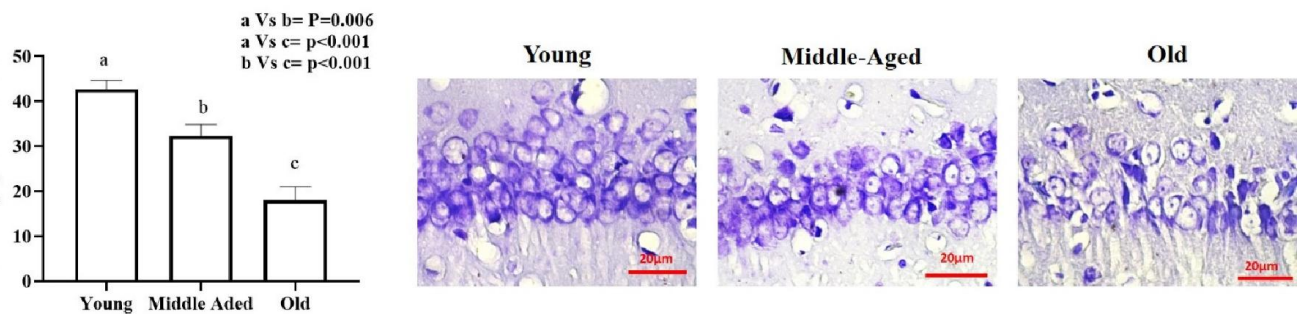


جوان، Middle-Aged: میانسال، Old: پیر

برای بررسی بین گروهی تعداد سلول‌های عصبی زنده (گروه‌های تمرین) در سه رده سنی نیز از آنالیز واریانس یک-طرفه استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که بین گروه‌های مختلف تمرینی در سه رده سنی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F=70/22$ و $p<0/001$). نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که گروه تمرین جوان بیشترین افزایش سلول‌های زنده عصبی را نسبت به گروه‌های تمرین میانسال ($p=0/006$) و پیر ($p<0/001$) داشت. همچنین افزایش سلول‌های زنده عصبی در گروه میانسال نسبت به گروه پیر با تمرین ورزشی معنی‌دار بود ($p<0/001$) (شکل ۲).

شکل ۱- تغییرات هیستوپاتولوژیک بین گروه کنترل

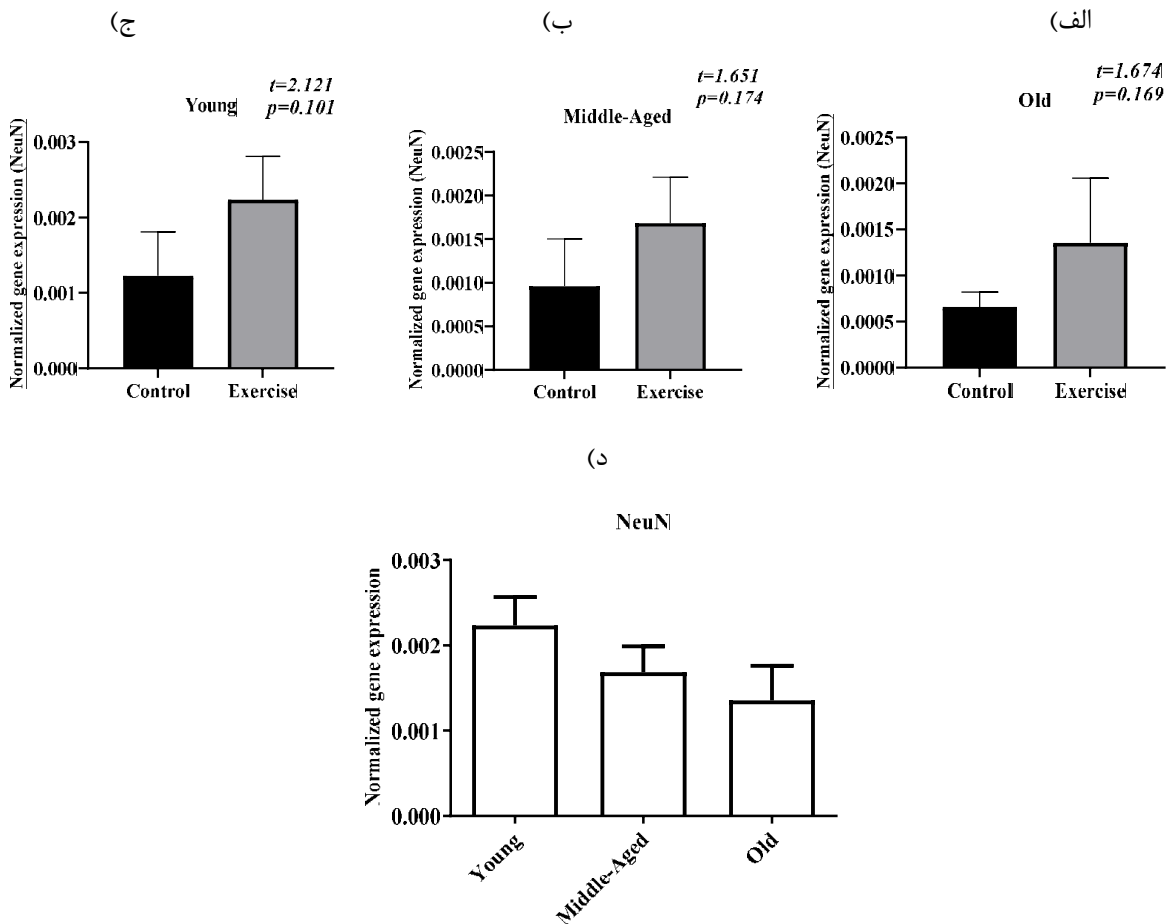
و تمرین در سه رده سنی (الف: جوان، ب: میانسال، ج: پیر) با استفاده از آزمون آماری t مستقل. بزرگنمایی تصویر به ترتیب ۲۰۰، ۱۰۰ و ۲۰ µm. در این رنگ‌آمیزی رنگ بنفش سلول‌های عصبی را نشان می‌دهد. سلول‌های عصبی با هسته روشن زنده و سلول‌های با رنگ تیره مرده به حساب می‌آیند که تعداد سلول‌های زنده در واحد سطح با روش image J محاسبه شده است. داده‌های نمودارها به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. # نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل می‌باشد. Exercise: گروه تمرین، Control: گروه کنترل، Young:



شکل ۲- تغییرات هیستوپاتولوژیک بین گروه‌های

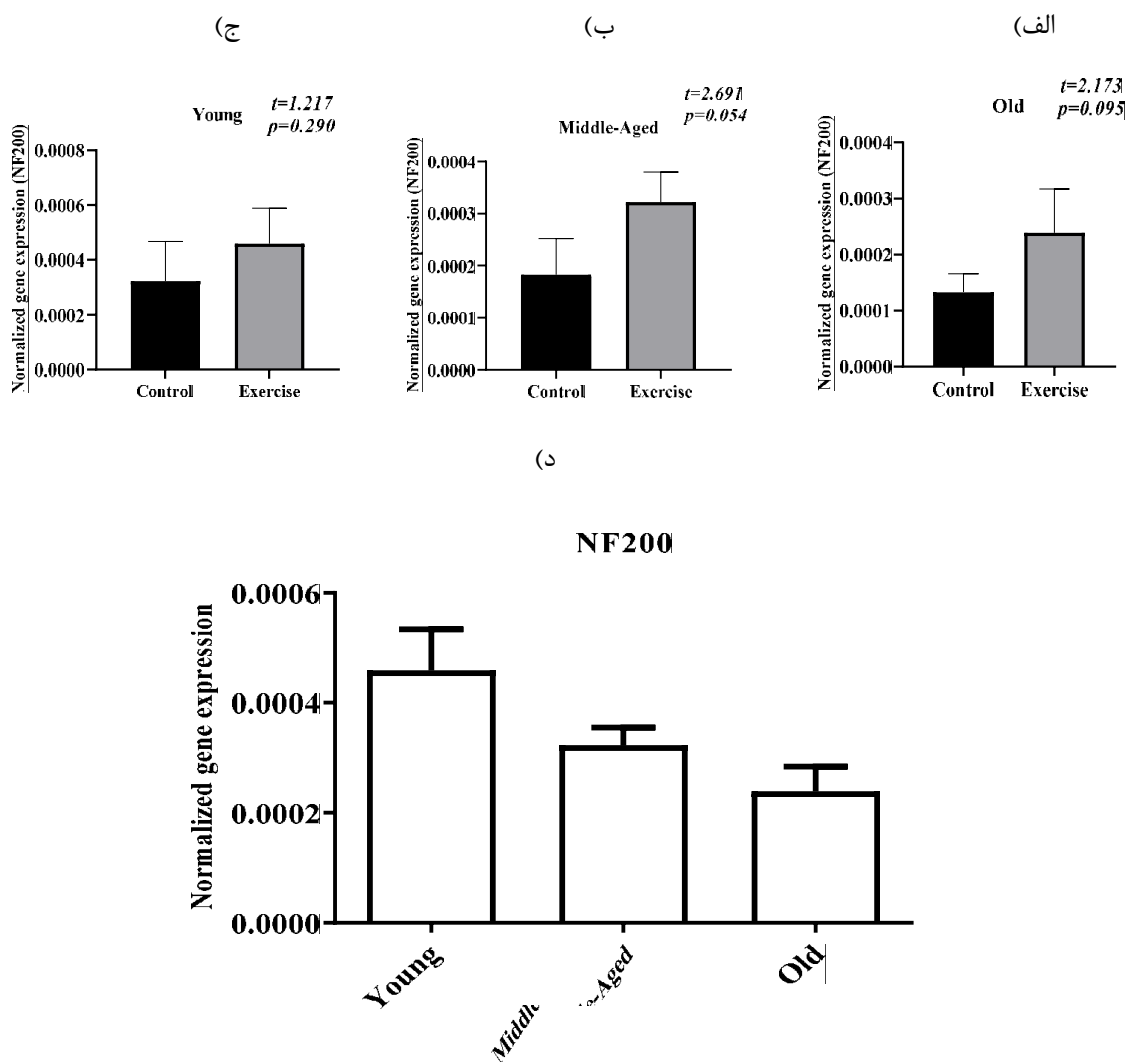
تمرینی در سه رده سنی با استفاده از آنالیز واریانس یک-طرفه. بزرگنمایی تصویر ۲۰ um. در این رنگ‌آمیزی رنگ بنفش سلول‌های عصبی را نشان می‌دهد. سلول‌های عصبی با هسته روشن زنده و سلول‌های با رنگ تیره مرده به حساب می‌آیند که تعداد سلول‌های زنده در واحد سطح با روش image J محاسبه شده است. داده‌های نمودارها به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. Exercise: گروه تمرین، Control: گروه کنترل، Young: جوان، Middle-Aged: میانسال، Old: پیر.

تغییرات بیان ژنی NeuN در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف بین گروه‌های کنترل با گروه‌های تمرینی در سه رده سنی معنی‌دار نیست، به این معنی که تمرین ورزشی تأثیرات معنی‌داری بر بیان NeuN نداشت. برای بررسی بیان ژن NeuN با تمرین ورزشی در سه رده سنی نیز از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که بین سه گروه تمرین در بیان ژن NeuN اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p=0.276$ و $F=1/603$) (نمودار ۱ د).



بیان ژن NF200 نیز در نمودار ۲ نشان داده شده است. همانند NeuN نیز اختلاف بین گروه‌های کنترل با گروه‌های تمرینی در سه رده سنی معنی‌دار نبود، به این معنی که تمرین ورزشی تأثیرات معنی‌داری بر بیان NF200 نداشت. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نیز نشان داد که بین سه گروه تمرین در بیان ژن NF200 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (۰/۰۷۰) (F= ۴/۲۵۵ و p= (نمودار ۲ د).

نمودار ۱- تغییرات بیان ژن NeuN بین گروه کنترل و تمرین در سه رده سنی الف: جوان، ب: میانسال، ج: پیر با استفاده از آزمون آماری t مستقل و همچنین تغییرات NeuN بین گروه‌های تمرینی در سه رده سنی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (د). داده‌های نمودارها به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. Exercise: گروه تمرین، Control: گروه کنترل، Young: جوان، Middle-Aged: میانسال، Old: پیر.



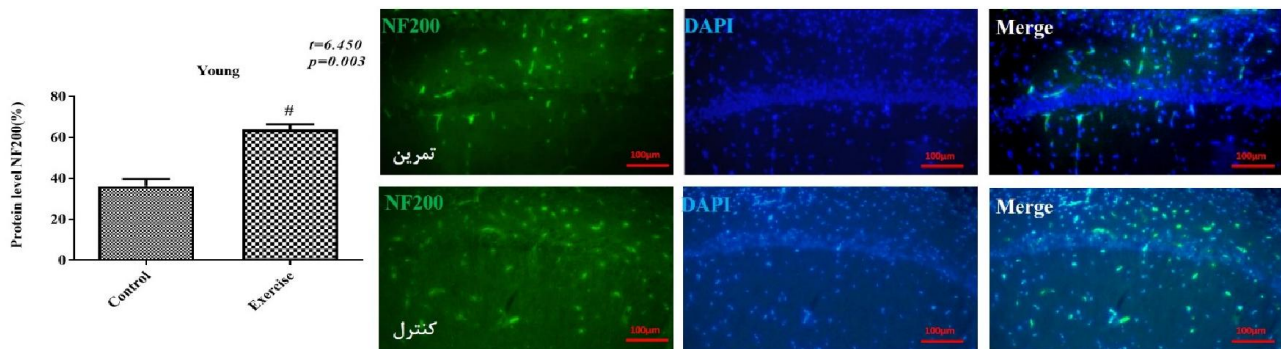
نتایج آزمون t مستقل نشان داد که تمام گروه‌های تمرینی جوان ($p=0/003$)، میانسال ($p=0/001$) و پیر ($p=0/021$) افزایش معنی‌دار NF200 را نسبت به گروه کنترل خود نشان دادند (شکل ۳ الف، ب و ج). نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین گروه‌های مختلف تمرینی (در رده‌های سنی مختلف سنی) در پروتئین NF200 مغز تغییرات معنی‌داری وجود داشت ($p<0/001$ و $F=88/02$). نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که گروه جوان افزایش معنی‌دار پروتئین NF200 را نسبت به گروه‌های میانسال ($p<0/001$) و پیر ($p<0/001$) داشت. افزایش پروتئین NF200 گروه میانسال نسبت به گروه پیر هم‌چنین معنی‌دار بود ($p=0/002$).

نمودار ۲- تغییرات بیان ژن NF200 بین گروه کنترل

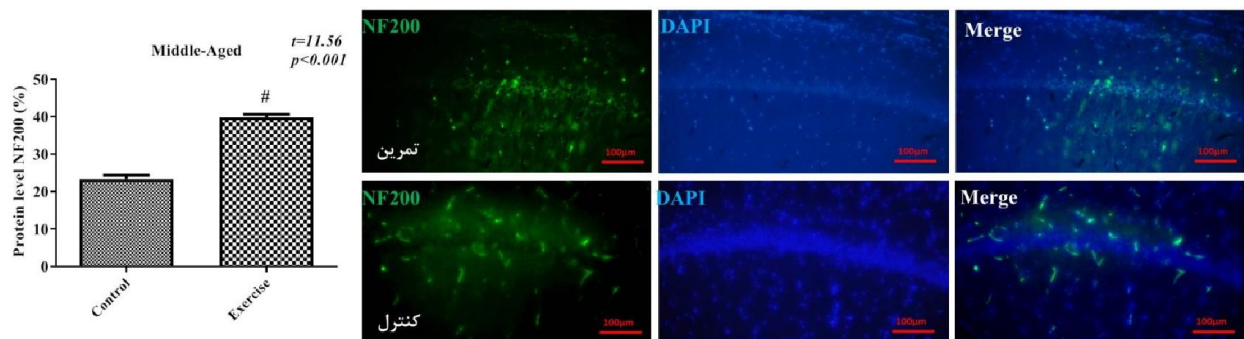
و تمرین در سه رده سنی الف: جوان، ب: میانسال، ج: پیر با استفاده از آزمون آماری t مستقل و هم‌چنین تغییرات NF200 بین گروه‌های تمرینی در سه رده سنی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (د). داده‌های نمودارها به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. Exercise: گروه تمرین، Control: گروه کنترل، Young: جوان، Middle-Aged: میانسال، Old: پیر

تغییرات بیان پروتئین NF200 با روش ایمونوهیستوشیمی نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. در این بخش از نتایج میزان بیان پروتئین NF200 در بافت مغز با رنگ سبز که به دلیلی واکنش آنتی ژن با آنتی بادی مربوطه بوده ارزیابی شد.

(الف)

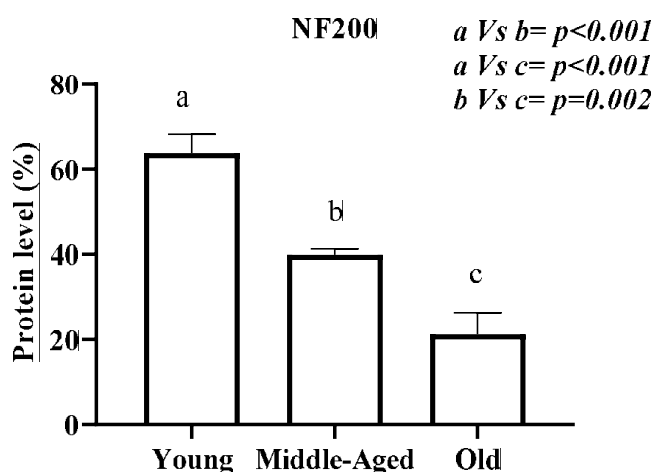


(ب)



(ج)

(د)



رنگ به صورت درصد گزارش گردید. داده‌های نمودارها به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. # نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل می‌باشد. Exercise: گروه تمرین، Control: گروه کنترل، Young: جوان، Middle-Aged: میانسال، Old: پیر.

بحث

چندین مکانیسم بالقوه برای تشریح اثرات محافظت عصبی ناشی از تمرین ورزشی بیان شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به افزایش در سطح فاکتورهای نوروتروفیک [۲۳]، کاهش

شکل ۳- تغییرات بیان پروتئین N200 بین گروه کنترل و تمرین در سه رده سنی الف: جوان، ب: میانسال، ج: پیر با استفاده از آزمون آماری t مستقل و هم‌چنین تغییرات پروتئین N200 بین گروه‌های تمرینی در سه رده سنی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (د). بزرگنمایی ۱۰۰ um. این پروتئین توسط نرم افزار Image J ارزیابی شد و به صورت نمودار درآمد. برای آنالیز نتایج از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. در این رنگ آمیزی هسته سلول‌های به رنگ آبی مشاهده شد. تعداد سلول‌های سبز رنگ نسبت به کل هسته‌های آبی

CA1) در سنین سالمندی با کاهش معنی‌دار جمعیت سلول‌های مرده می‌باشد [۲۸]. به نظر می‌رسد نوع بیماری و هم‌چنین تمرین ورزشی متفاوت از جمله دلایل نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Shamsipour و همکاران باشد. زیرا که این محققان از ماده آمیلوئید بتا برای القاء آلزایمر استفاده کرده اما در مطالعه حاضر رت‌های سالمند بیماری نداشتند. هم‌چنین در مطالعه حاضر از تمرینات ترکیبی در مدت ۶ هفته استفاده شد در حالی که Shamsipour و همکاران از تمرین هوازی تناوبی به مدت ۸ هفته استفاده کردند.

در گذشته اعتقاد بر این بود که توسعه بافت هیپوکمپ و نورون‌زایی، یعنی تولید سلول‌های عصبی جدید از طریق تقسیم سلول‌های بنیادی در مغز رخ می‌دهد و فقط در طی رشد جنینی اتفاق می‌افتد نه بقیه دوره‌های رشدی. با این حال، در دهه‌های اخیر، شواهد تجربی نشان داده است که افزایش سلول‌های عصبی در مغز بزرگسالان و سالمندان در دو منطقه خاص نیز رخ می‌دهد که شامل پیاز بویایی که در درک بویایی کمک می‌کند و هیپوکمپ، که عمدتاً در تقویت حافظه نقش دارد [۲۹]. مطالعه حاضر نیز با تمرین ورزشی افزایش سلول‌های عصبی زنده را در گروه‌های تمرین ورزشی در دو رده سنی نشان داد. همسو با این نتایج Heidarianpour و همکاران در بررسی تغییرات بافتی ناحیه CA3 هیپوکمپ با روش کریزل و یوله در رت‌های دیابتی بعد از تمرین ورزشی استقامتی نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین استقامتی (۵ روز در هفته) قادر به کاهش معنی‌دار سلول‌های مرده در این ناحیه است [۳۰]. هر چند این محققان از مدل دیابتی و تمرینات در

استرس اکسیداتیو [۲۴]، کاهش التهاب عصبی [۲۵] اشاره کرد. انجام تمرینات مختلف استقامتی و قدرتی در سنین مختلف می‌تواند تأثیرات خاصی داشته باشد. بیان شده که در سنین پایین‌تر انجام تمرین ورزشی در بهبود حافظه و توانایی حل مسئله نقش مهمی دارد [۲۶]. این در حالی است که انجام منظم تمرین ورزشی در سنین بالاتر و سالمندی می‌تواند با تقویت حافظه، از بروز برخی بیماری‌های دژنراتیو مغزی پیشگیری کند [۲۷]. لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر تمرین ترکیبی بر تغییرات بافتی و مولکولی ناحیه CA1 هیپوکمپ (تغییرات NeuN و NF200) در سه رده سنی جوان، میانسال و پیر بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۶ هفته تمرین ترکیبی در گروه‌های جوان و میانسال سبب افزایش معنی‌دار جمعیت سلول‌های عصبی زنده نسبت به گروه‌های کنترل خود می‌شود. هم‌چنین در بررسی بین گروه‌های تمرینی در سه رده سنی مشخص شد که گروه تمرین جوان بیشترین افزایش سلول‌های زنده عصبی را نسبت به گروه‌های تمرین میانسال و پیر داشت. هم‌چنین افزایش سلول‌های زنده عصبی در گروه میانسال نسبت به گروه پیر با تمرین ورزشی معنی‌دار بود. این در حالی بود که تمامی این تغییرات با تمرین رزشی در گروه سالمند مطالعه حاضر معنی‌دار نبود. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر اخیراً Shamsipour و همکاران در بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین ورزشی در رت‌های آلزایمری نشان دادند که انجام تمرین ورزشی هوازی تناوبی به تنهایی یا همراه با مصرف پروبیوتیک قادر به بهبود تخریبات بافت هیپوکمپ (ناحیه

مدت زمان طولانی تر استفاده کردند اما به نظر می‌رسد انجام تمرین ورزشی در سنین جوان تر به خوبی قادر به کنترل مرگ سلول‌های عصبی باشد که در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتر است. در هیپوکمپ، سلول‌های بنیادی عصبی تمایز نیافته در ناحیه CA1 واقع شده‌اند و سلول‌های عصبی را به وجود می‌آورند. این سلول‌ها تکثیر شده و به لایه سلول گرانول مهاجرت می‌کنند و به سلول‌های عصبی، آستروگلیا یا الیگودندروسیت‌ها متمایز می‌شوند. لذا افزایش سلول‌های زنده عصبی ناشی از تمرین ورزشی در سنین مختلف می‌تواند در نتیجه تحریک سلول‌های بنیادی عصبی در ناحیه هیپوکمپ نیز باشد که نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد. Eriksson و همکارش شواهد مستقیمی در مورد گسترش سلول عصبی و نورون‌زایی را در بزرگسالان در نمونه انسانی ارائه دادند. آن‌ها با مطالعه نمونه مغز انسانی پس از مرگ متوجه شدند سلول‌های عصبی جدید از سلول‌های مولد تقسیم شده در شکنج دندان دار تولید می‌شود [۳۱]. Spalding و همکاران تخمین زد که حدود ۷۰۰ سلول عصبی جدید در هر هیپوکمپ در روز اضافه می‌شود [۳۲]. لذا با توجه به این‌که گروه تمرین ورزشی افزایش معنی‌دار را نسبت به گروه کنترل نشان داد به نظر می‌رسد تمرین ورزشی ترکیبی نیز به عنوان عامل محرکی در گسترش سلول عصبی در سنین مختلف باشد.

در بررسی فاکتور NeuN در مطالعه حاضر، مشخص شد ۶ هفته تمرین ورزشی ترکیبی تغییرات معنی‌داری را در این فاکتور ایجاد نکرد. بر خلاف این نتایج، Moon و همکاران نشان دادند که ۲ هفته تمرین ورزشی موش سوری بر روی تردمیل

قادر به افزایش معنی‌دار NeuN در بافت عصبی می‌باشد [۳۳]. به نظر می‌رسد تفاوت در نوع حیوانات (موش سوری در مقابل موش صحرایی) و مدت زمان تمرینی (حاد و مزمن) از جمله دلایل تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با نتایج Moon و همکاران باشد. با این وجود تحقیقات محدودی در زمینه بررسی NeuN با تمرین ورزشی وجود دارد [۱۷] و بیشتر مطالعات نقش سایر فاکتورهای نوروتروفیک نظیر BDNF را در ناحیه هیپوکمپ بررسی کرده‌اند [۳۴] که در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد.

هم‌چنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر ژنی NF200 با تمرین ورزشی تغییر معنی‌داری را در سه رده سنی نشان نداد. این در حالی بود که مقادیر پروتئینی NF200 افزایش معنی‌داری را در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های کنترل نشان داد. هم‌چنین بیشترین افزایش پروتئین NF200 مربوط به گروه جوان بود. از آنجایی که نوروفیلانتها در ایجاد اسکلت سلولی نقش دارند لذا افزایش آن‌ها می‌تواند در استحکام سلول‌های عصبی نیز مؤثر باشد. این در حالی است که کاهش آن‌ها می‌تواند روند تجزیه را تسهیل کند. در این رابطه نشان داده شده که از دست دادن پروتئین‌های NF68 و NF200 به شدت با وقوع پروتئولیز در بافت عصبی همسو می‌باشد [۳۵]. زیرا که نشان داده شده از دست دادن پروتئین NF منجر به فعال شدن کالپین در مدل‌های آسیب نخاعی می‌شود [۳۶]. افزایش NF200 در مطالعه حاضر می‌تواند از جهتی در راستای افزایش استحکام سلول‌های عصبی ناشی از تمرین ورزشی ترکیبی در سنین مختلف باشد. از جهتی نیز

شاخص‌های نکرولی و آپوپتوزی در کنار بررسی سلول‌های مرده در هیپوکمپ، عدم اندازه‌گیری سایر فاکتورهای نوروتروفیک نظیر BDNF و بررسی همبستگی بین فاکتورهای نوروتروفیک، استفاده از مدل‌های بیماری آسیب زنده حافظه در کنار گروه‌های مطالعه حاضر.

نتیجه‌گیری

انجام تمرین ترکیبی در سنین جوانی و میان‌سالی میزان سلول‌های زنده عصبی را در هیپوکمپ افزایش داد. این در حالی بود که تغییرات در ژن‌های NeuN و NF200 غیر معنی‌دار اما پروتئین NF200 افزایش معنی‌دار را با تمرین ترکیبی نشان داد که به نظر می‌رسد تحت تأثیر روش‌های اندازه‌گیری و منابع ترشح دیگر در سایر نقاط مغز باشد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد انجام تمرین ورزشی ترکیبی برای سنین سالمندی بهتر است در مدت زمان طولانی‌تر با رعایت استانداردهای لازم صورت بگیرد تا از فواید آن بهره‌مند شوند. با این وجود در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتر به ویژه بر روی نمونه‌های انسانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از راهنمایی‌های شرکت هیستوژنوتک (تهیه کیت، آموزش روش‌های اندازه‌گیری سلولی و بافتی) تقدیر و تشکر می‌نمایند.

افزایش این فاکتور در سنین سالمندی می‌تواند به گونه‌ای فعالیت پروتئازها را کنترل و از بیماری‌های عصبی پیش‌گیری کند. با این وجود در این مطالعه عملکرد پروتئازی ارزیابی نشد و لذا توصیه می‌شود در مطالعات آتی نیز مورد توجه قرار گیرد. در کنار مکانیزم‌های ذکر شده در رابطه با عدم هماهنگی در بیان ژن و پروتئین NF200 باید به مراحل اندازه‌گیری توجه داشت. بیان ژن معمولاً در مراحل مختلف و روش‌های مختلف کنترل می‌شود که عدم نمایش در یک مرحله حضور آن را ثبت نمی‌کند بنابراین، در بیشتر موارد تغییر در سطح mRNA و سطح پروتئین به دلیل کنترل تنظیم در سطوح مختلف با هم ارتباط زیادی ندارند. با این حال، زیرمجموعه‌هایی وجود دارد که تغییر در سطح mRNA به شدت با تغییر در سطح پروتئین ارتباط دارد و می‌توان پیشنهاد کرد که تنظیم بیان ژن این ژن‌ها در سطوح بالادست ترجمه به شدت کنترل می‌شود و در برخی از زیرمجموعه‌ها کنترل تنظیم در بسیاری از سطوح مختلف نشان دهنده همبستگی ضعیف بین mRNA و سطح پروتئین است [۳۷]. لذا در مطالعه حاضر نیز این عدم هماهنگی بین ژن و پروتئین را می‌توان به مکانیزم‌های اندازه‌گیری نسبت داد.

با این وجود مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی این محدودیت‌ها برطرف شود که از جمله آن‌ها می‌توان اشاره کرد به: عدم اندازه‌گیری

References

- [1] Voss MW, Soto C, Yoo S, Sodoma M, Vivar C, van Praag H. Exercise and hippocampal memory systems. *Trends Cog Sci* (2019); 23(4): 318-33.
- [2] Liu PZ, Nusslock R. Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. *Front Neurosci* 2018; 12 (52): 52-8.
- [3] Tian X, Liu T, Fang B, Wang A, Zhang M, Hussain S, et al. Neun-specific fluorescent probe revealing neuronal nuclei protein and nuclear acids association in living neurons under STED nanoscopy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018; 10(38): 31959-64.
- [4] Blaya MO, Bramlett HM, Naidoo J, Pieper AA, Dietrich WD. Neuroprotective efficacy of a proneurogenic compound after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2014; 31(5): 476-86.
- [5] Kim S-E, Ko I-G, Park C-Y, Shin M-S, Kim C-J, Jee Y-S. Treadmill and wheel exercise alleviate lipopolysaccharide-induced short-term memory impairment by enhancing neuronal maturation in rats. *Mol Med Rep* 2012; 7(1): 31-6.
- [6] Kim Y-M, Seo T-B, Kim C-J, Ji E-S. Treadmill exercise with bone marrow stromal cells transplantation potentiates recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *J Exerc Rehabil* 2017; 13(3): 273-81.
- [7] Lariviere RC, Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 2004; 58(1): 131-48.
- [8] Fang X, Ni J, Su B, An H, Li M, Wang J, et al. Effects of cluster needling of scalp acupuncture on neurofilament protein 200 and signal transducer and activator of transcription 3 in rats with acute cerebral ischemia. *J Tradit Chin Med Sci* 2020; 7(1): 82-6.
- [9] Fournier AJ, Hogan JD, Rajbhandari L, Shrestha S, Venkatesan A, Ramesh K. Changes in neurofilament and microtubule distribution following focal axon compression. *PLoS one* 2015; 10(6): 13-17.
- [10] Liang W, Zhang W, Zhao S, Li Q, Liang H, Ceng R. Altered expression of neurofilament 200 and amyloid- β peptide (1-40) in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Neurol Sci* 2015; 36(5): 707-12.
- [11] Jahangiri Z, Gholamnezhad Z, Hosseini M. The effects of exercise on hippocampal inflammatory cytokine levels, brain oxidative stress markers and memory impairments induced by lipopolysaccharide in rats. *Metab Brain Dis* 2019; 34(4): 1157-69.
- [12] Hong M, Kim M, Kim T-W, Park S-S, Kim M-K, Park YH, et al. Treadmill exercise improves motor function and short-term memory by enhancing synaptic

- plasticity and neurogenesis in photothrombotic stroke mice. *Int Neurol J* 2020; 24(1): 28-35.
- [13] Matura S, Fleckenstein J, Deichmann R, Engeroff T, Füzéki E, Hattingen E, et al. Effects of aerobic exercise on brain metabolism and grey matter volume in older adults: results of the randomised controlled SMART trial. *Transl Psychiatry* 2017; 7(7): 11-27.
- [14] Lin T-W, Tsai S-F, Kuo Y-M. Physical exercise enhances neuroplasticity and delays Alzheimer's disease. *Brain Plast* 2018; 4(1): 95-110.
- [15] Terashi T, Otsuka S, Takada S, Nakanishi K, Ueda K, Sumizono M, et al. Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats. *Neurol res* 2019; 41(6): 510-8.
- [16] El Hayek L, Khalifeh M, Zibara V, Abi Assaad R, Emmanuel N, Karnib N, et al. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neuros* 2019;39(13):2369-82.
- [17] Chen D, Zhang Y, Zhang M, Chang J, Zeng Z, Kou X, et al. Exercise Attenuates Brain Aging by Rescuing Down-Regulated Wnt/ β -Catenin Signaling in Aged Rats. *Front Aging Neurosci* 2020; 12 (4):105-12
- [18] Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013; 4(6): 624-31.
- [19] Kim H-J, So B, Son JS, Song HS, Oh SL, Seong JK, et al. Resistance training inhibits the elevation of skeletal muscle derived-BDNF level concomitant with improvement of muscle strength in zucker diabetic rat. *J Exerc Nutrition Biochem* 2015; 19(4): 281-8.
- [20] Safakheil M, Safakheil H. The effect of exosomes derived from bone marrow stem cells in combination with rosuvastatin on functional recovery and neuroprotection in rats after ischemic stroke. *J Mol Neurosci* 2020; 34(5): 1-14.
- [21] Mi DH, Fang HJ, Zheng GH, Liang XH, Ding YR, Liu X, et al. DPP-4 inhibitors promote proliferation and migration of rat brain microvascular endothelial cells under hypoxic/high-glucose conditions, potentially through the SIRT1/HIF-1/VEGF pathway. *CNS Neurosci Ther* 2019; 25(3): 323-32.
- [22] Montes S, Juárez-Rebollar D, Nava-Ruiz C, Sánchez-García A, Heras-Romero Y, Rios C, et al. Immunohistochemical study of Nrf2-antioxidant response element as indicator of oxidative stress induced by cadmium in developing rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 20(15): 42-50.

- [23] Heisz JJ, Clark IB, Bonin K, Paolucci EM, Michalski B, Becker S, et al. The effects of physical exercise and cognitive training on memory and neurotrophic factors. *J Cogn Neurosci* 2017; 29(11): 1895-907.
- [24] Vanzella C, Neves JD, Vizuete AF, Aristimunha D, Kolling J, Longoni A, et al. Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats. *Behav Brain Res* 2017; 3(34): 78-85.
- [25] Song S-H, Jee Y-S, Ko I-G, Lee S-W, Sim Y-J, Kim D-Y, et al. Treadmill exercise and wheel exercise improve motor function by suppressing apoptotic neuronal cell death in brain inflammation rats. *J Exerc Rehabil* 2018; 14(6): 911-9.
- [26] Labonte-Lemoyne E, Curnier D, Ellemberg D. Exercise during pregnancy enhances cerebral maturation in the newborn: a randomized controlled trial. *J Clin Exp Neuropsychol* 2017; 39(4): 347-54.
- [27] Kurucz A, Bombicz M, Kiss R, Priksz D, Varga B, Hortobágyi T, et al. Heme oxygenase-1 activity as a correlate to exercise-mediated amelioration of cognitive decline and neuropathological alterations in an aging rat model of dementia. *Biomed Res Int* 2018; 20(18): 44-9.
- [28] Shamsipour S, Sharifi G, Taghian F. An 8-Week Administration of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus plantarum Combined with Exercise Training Alleviates Neurotoxicity of A β and Spatial Learning via Acetylcholine in Alzheimer Rat Model. *J Mol Neurosci* 2021; 17(11): 1-11.
- [29] Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(9): 188-92.
- [30] Heidarianpour A, Mohammadi F, Keshvari M, Mirazi N. Ameliorative effects of endurance training and Matricaria chamomilla flowers hydroethanolic extract on cognitive deficit in type 2 diabetes rats. *Biomed Pharmacother* 2021; 13(5): 1112-20.
- [31] Eriksson P, Perfilova S. BJÖRK-ERIKSON & FH GAGE. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4(11): 1313-7.
- [32] Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013; 153(6): 1219-27.
- [33] Moon HY, Yoon KJ, Lee WS, Cho H-S, Kim D-Y, Kim J-S. Neural maturation enhanced by exercise-induced extracellular derivatives. *Scien Rep* 2020; 10(1): 1-11.

- [34] Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol & behav* 2018;18(4):6-11.
- [35] Postmantor R, Hayes RL, Dixon CE, Taft WC. Neurofilament 68 and neurofilament 200 protein levels decrease after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; 11(5): 533-45.
- [36] Lee Y, Lee BH, Yip W, Chou P, Yip B-S. Neurofilament proteins as prognostic biomarkers in neurological disorders. *Curr Pharm Des* 2019; 25(43): 4560-9.
- [37] Davies E, Stankovic B, Vian A, Wood AJ. Where has all the message gone? *Plant Sci J* 2012; 185(12): 23-32.

The Effect of 6 Weeks of Combination Training on NeuN and NF200 Factors and the Number of Living Cells in the CA1 Region of the Hippocampus of Male Wistar Rats: An Experimental Study

P. Hasannejad Malome¹, A. R. Elmieh², M. R. Fadaie Chafi³

Received: 10/03/21 Sent for Revision: 05/04/21 Received Revised Manuscript: 12/05/21 Accepted: 16/05/21

Background and Objectives: The combination of resistance and endurance training has a variety of effects on brain tissue. The aim of this study was to determine the tissue changes and NeuN and NF200 factors in the CA1 region of the hippocampus after 6 weeks of combination training in male Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 30 rats were divided into 6 groups: young control and training (2 weeks), middle-aged control and training (8 weeks), and old control and training (24 months). Exercise groups were trained for 6 weeks with a combined program. To examine hippocampal tissue changes, gene expression of NeuN and NF200 and also NF200 protein, crystal violet method, real time-PCR method and immunohistochemistry were respectively used. Independent t-test and one-way ANOVA were used to analyze the data.

Results: Compared to the control groups, the young ($p=0.005$) and middle-aged ($p=0.008$) exercise groups had a significant increase in living nerve cell and also the training groups of young ($p=0.003$), middle-aged ($p<0.001$) and old ($p=0.021$) showed a significant increase in NF200 protein in hippocampal tissue. In the study between the training groups, the young group had a significant increase in NF200 protein compared to the middle-aged and old groups ($p<0.001$). There was no significant difference among the three exercise groups in the expression of NeuN and NF200 genes ($p>0.05$).

Conclusion: 6 weeks of combined training at young and Middle Ages have a better effect on living nerve cells. These exercises also significantly improved NF200 protein (without significant changes in genes). This difference seems to be influenced by measurement steps and other secretory sources.

Key words: Hippocampus, Exercise, Wistar rat

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Rasht approved the study (IR.IAU.RASHT.REC.1399.024).

How to cite this article: Hasannejad Malome P, Elmieh A R, Fadaie Chafi M R. The Effect of 6 Weeks of Combination Training on NeuN and NF200 Factors and the Number of Living Cells in the CA1 Region of the Hippocampus of Male Wistar Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2021; 20 (4): 415-34. [Farsi]

1- PhD Student in Sport Physiology, Dept. of Physical Education, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran

ORCID: 0000-0003-2871-3531

2- Dept. of Physical Education, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran, ORCID: 0000-0003-3740-2241

(Corresponding Author) Tel:(013) 44227060,, Fax: (013) 44227060, E-mail: elmieh1592@gmail.com

3- Dept. of Physical Education, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran, ORCID: 0000-0002-0536-1521