

## مقاله پژوهشی

## تأثیر فعالیت هوازی و ویتامین E بر حافظه فضایی و میزان بیان پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی دارای کم‌خوابی مزمن

نصور احمدی<sup>۱\*</sup>، بهروز عبدلی<sup>۱</sup>، محمد سیاح<sup>۲</sup>، مریم گودینی<sup>۱</sup>، فاطمه حافظی<sup>۱</sup>

۱. دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش: ۱۸ مهر ۱۴۰۰

دریافت: ۲۶ مرداد ۱۴۰۰

## چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از این تحقیق تعیین تأثیر فعالیت هوازی و ویتامین E بر حافظه فضایی و میزان بیان پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی دارای کم‌خوابی مزمن بود.

**روش‌ها:** تعداد ۵۶ موش صحرایی نر بالغ از نژاد آلبینو-ویستار به طور تصادفی در گروه‌ها قرار گرفتند. کم‌خوابی مزمن از طریق ۱۸ ساعت محرومیت از خواب به مدت ۴ هفته اعمال شد. فعالیت هوازی شامل ۴ هفته دویدن بر روی تردمیل بود. ویتامین E به صورت محلول در روغن کنجد از طریق گاوژ به موش‌ها خوراندن شد. در پایان هفته چهارم، آزمون ماز آبی موريس برای سنجش یادگیری و حافظه فضایی انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین کرب در هیپوکامپ از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به اکتساب در ماز آبی موريس، از آزمون آنالیز واریانس مرکب (۳ × ۵) و برای آنالیز داده‌های مربوط به کاوش در ماز آبی موريس و میزان بیان پروتئین کرب از آنالیز واریانس یک‌سویه استفاده شد. از آزمون‌های تعقیبی بونفرونی و توکی به ترتیب برای مقایسه‌های درون گروهی و بین گروهی استفاده شد.

**یافته‌ها:** کم‌خوابی مزمن تأثیر مخرب معنی‌داری بر عملکرد حافظه در مرحله اکتساب و آزمون کاوش و همچنین بیان کرب داشت ( $p < 0.05$ ). ویتامین E تأثیر معنی‌داری بر حافظه فضایی و بیان پروتئین کرب در موش‌های با کم‌خوابی مزمن نداشت. فعالیت هوازی با تأثیر معنی‌داری که بر عملکرد حافظه در مرحله اکتساب و آزمون کاوش و بیان پروتئین کرب موش‌های با کم‌خوابی مزمن داشت ( $p < 0.05$ )، باعث جبران اثرات مخرب کم‌خوابی شد. همراه شدن ویتامین E با فعالیت هوازی بر میزان بیان پروتئین کرب موش‌های با کم‌خوابی مزمن تأثیر معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ) اما در آزمون رفتاری تأثیری بیشتر از فعالیت هوازی نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** یک دوره فعالیت هوازی تأثیر مخرب کم‌خوابی بر یادگیری و حافظه فضایی در موش‌ها را جلوگیری می‌کند. تجویز ویتامین E به تنهایی تأثیری بر اختلال حافظه و یادگیری ناشی از کم‌خوابی ندارد و اثرات مفید فعالیت ورزشی را نیز افزایش نمی‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** تردمیل، خواب، ورزش، ویتامین E، یادگیری

## مقدمه

میرسد به اختلالات خواب حساس است، "هیپوکامپ" است. سطوح پایین نورونز هیپوکامپی<sup>۱</sup> و کاهش حجم هیپوکامپ که در اثر کم‌خوابی ایجاد می‌شود، منجر به اختلال حافظه می‌شود، [۲]. برخی گزارشات نشان داده‌اند که چرخه خواب/بیداری،

خواب یک ریتم بیولوژیک روزانه محسوب می‌شود که به‌عنوان یک پدیده فراگیر بسیار مهم زیستی در تمامی مهره‌داران دیده می‌شود. به خوبی ثابت شده است که محرومیت از خواب اثرات منفی روانی دارد و در عملکرد شناختی اختلال ایجاد می‌کند [۱]. یکی از مناطق مغز که به‌نظر

<sup>1</sup> Hippocampal neurogenesis

افزایش استفاده از فناوری در شب، در میزان خواب افراد تاثیر گذاشته و در طولانی مدت عارضه‌ای به نام محدودیت مزمن خواب را به وجود می‌آورد. این موضوع باعث به خطر افتادن تندرستی بخش عمده‌ای از جوامع توسعه‌یافته و در حال توسعه شده است. بیشتر تحقیق‌های انجام شده بر نقش مثبت فعالیت بدنی و ریزمغذی‌ها در بهبود عملکرد شناختی تاکید دارند، اما هیچ تحقیقی به مقایسه تاثیر ترکیب فعالیت بدنی و مکمل غذایی آنتی‌اکسیدان بر عملکرد شناختی در حیواناتی که دچار اختلالات شناختی ناشی از کم‌خوابی مزمن شده‌اند، نپرداخته است. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تاثیر فعالیت بدنی و مکمل ویتامین E بر یادگیری و حافظه فضایی و شاخص کرب در هیپوکامپ موش‌های دارای کم‌خوابی بود.

## مواد و روش‌ها حیوانات

تعداد ۵۶ سر موش صحرایی چهارهفته‌ای نر از نژاد ویستار از دانشگاه شهید بهشتی ایران تهیه شد. موش‌ها در محیطی با میانگین دمای  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در قفس‌های ۵ تایی مخصوص نگهداری شدند. تمام موش‌ها به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها زیر نظر کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید بهشتی با کد اخلاقی (SBU.ICBS 1014/95) انجام گرفت. آزمودنی‌ها پس از یک هفته آشنایی با آزمایشگر و محیط آزمایشگاه، به صورت تصادفی به هفت گروه ۸ تایی شامل کم‌خوابی مزمن، کم‌خوابی مزمن-ویتامین E، کم‌خوابی مزمن-روغن کنجد، کم‌خوابی مزمن-فعالیت‌هوازی، کم‌خوابی مزمن-فعالیت‌هوازی-روغن کنجد، کم‌خوابی مزمن-فعالیت‌هوازی-ویتامین E و کنترل (خواب طبیعی-فعالیت‌هوازی-ویتامین E) تقسیم شدند.

## فعالیت هوازی

جهت فعالیت هوازی حیوانات از تردمیل مخصوص موش صحرایی ساخت شرکت دانش‌ساز ایران‌یان استفاده شد. دوره سازگاری با فعالیت، یک هفته، هر روز به مدت ۵ دقیقه دویدن بر روی تردمیل با سرعت ۷-۵ متر بر دقیقه بود. پروتکل فعالیت هوازی به مدت چهار هفته انجام شد و بدین صورت بود

بیان برخی ژن‌ها که در شکل‌پذیری سیناپس و حافظه نقش دارند، مانند فاکتورهای نروتروفیک مشتق از مغز<sup>۲</sup>، سیناپس‌ها، کلسیم کالمودولین کیناز<sup>۳</sup> و کرب را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳]. کرب یک فاکتور رونویسی است که واسطه بسیاری از عملکردهای آدنوزین منوفسفات حلقوی در بیان ژنی بوده و نقش مهمی در بقا، ذخیره‌سازی حافظه و شکل‌پذیری سیناپسی دارد [۳]. درحالی‌که کم‌خوابی در سطح فاکتورها و پروتئین‌های مشتق از مغز اختلال ایجاد می‌کند، در مقابل فعالیت بدنی میزان آن‌ها را افزایش می‌دهد [۴]. نشان داده شده که یک هفته فعالیت بدنی منجر به افزایش سطوح فاکتور نروتروفیک مشتق از مغز و کرب در هیپوکامپ گردیده و پس از آن حافظه فضایی نیز بهبود می‌یابد [۵]. با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد که پروتئین کرب نقش عملکردی زیادی در بهبود حافظه و یادگیری از طریق ورزش دارد. مکانیسم اساسی که از طریق آن ورزش می‌تواند حافظه را افزایش دهد، شامل افزایش نورونز هیپوکامپ، اندازه هیپوکامپ و سطوح فاکتورهای نروتروفیک مشتق از مغز است که ناشی از شکل‌پذیری سیناپسی بوده و نیاز به دخالت بی‌شمار مولکول‌های دخیل در نگه‌داری و تنظیم عملکرد مغز دارد [۶]. مطالعات نشان داده‌اند افزایش فاکتورهای نروتروفیک مشتق از مغز باعث افزایش یادگیری و متقابلاً کاهش آن تاثیر منفی بر یادگیری دارد [۷]. این حقیقت که ورزش باعث افزایش فاکتورهای نروتروفیک مشتق از مغز می‌شود نشان‌دهنده این امر است که ورزش پتانسیل یادگیری را به واسطه افزایش این مولکول افزایش می‌دهد [۸].

ریزمغذی‌ها می‌توانند بر کارکرد شناختی در تمام سنین تاثیر بگذارند. مکمل‌های غذایی زیادی برای حفظ و بهبود شناخت پیشنهاد شده‌اند. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان باعث افزایش پارامترهای چندگانه شکل‌پذیری سیناپسی هیپوکامپ می‌شوند و این پارامترها با بهبود حافظه فضایی همبستگی دارند [۹]. ویتامین E، یکی از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی در سلول‌های پستانداران است. ارتباط بین مصرف ویتامین E و کارکرد مغز در اوایل رشد به اثبات رسیده است [۱۰]. شیوه زندگی و عوامل شغلی مانند ساعات طولانی کار، رفت و آمدها، نوبت‌های کاری، خانواده و تعهدات اجتماعی و

<sup>2</sup> Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

<sup>3</sup> Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase II (CaM Kinase II)

## آزمون رفتاری

برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها از آزمون ماز آبی موریس<sup>۶</sup> استفاده شد. چهار روز قبل از پایان پروتکل محرومیت از خواب، همه گروه‌ها از ساعت ۱۸ در معرض تمرین ماز آبی موریس قرار می‌گرفتند. هر موش به مدت سه روز (هر روز ۴ کوشش<sup>۷</sup>) مورد آموزش قرار گرفت (مرحله اکتساب). روز چهارم، هم‌زمان با آخرین روز پروتکل، سکو برداشته شد و آزمون کاوش<sup>۸</sup> (یادداری) گرفته شد [۱۴]. آزمون یادداری یک کوشش شامل ۶۰ ثانیه شنا کردن آزاد بود. بعد از آن حیوان از آب برداشته می‌شد. در مرحله اکتساب، فاکتورهای مسافت طی شده<sup>۹</sup> و مدت زمان تاخیر در یافتن سکوی پنهان<sup>۱۰</sup> و سرعت شنا کردن<sup>۱۱</sup>، و در آزمون یادداری، مدت زمان ماندن در ربع هدف اندازه‌گیری شد. در روز آخر، پروتکل آزمون سکوی آشکار<sup>۱۲</sup> به منظور بررسی توانایی‌های حسی-حرکتی و انگیزشی و سیستم بینایی برای تکمیل تکلیف اجرا شد تا بتوان تغییرات در عملکرد را به یادگیری فضایی و نه عوامل غیرشناختی نسبت داد.

## آنالیز فاکتور نورویبولوژیکی کرب

بلافاصله بعد از پایان آزمایشات، حیوانات توسط دی‌اتیل اتر بیهوش شدند. پس از قطع گردن به وسیله گیوتین، بلافاصله هیپوکامپ از جمجمه خارج شد و در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس به منظور اندازه‌گیری شاخص کرب، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این تحقیق به منظور بررسی بیان پروتئین کرب از روش وسترن بلات<sup>۱۳</sup> استفاده گردید. فرآیند این تست شامل جدا سازی کل پروتئین‌ها بر اساس اندازه با استفاده از الکتروفورز در ژل، انتقال کافی پروتئین‌های جدا شده به یک بستر جامد مثل نیتروسولولز، و شناسایی اختصاصی پروتئین‌های هدف با آنتی‌بادی مناسب، می‌باشد. مرحله ظهور فیلم و کمی‌سازی داده‌ها توسط نرم‌افزار (Image J) انجام شد [۱۵].

که موش‌ها در هفته اول و دوم دو ست ۱۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه؛ هفته سوم، سه ست ۱۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه و هفته چهارم، ۴ ست ۱۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه بر روی تردمیل می‌دویدند. موش‌ها بین هر ست ۵ دقیقه استراحت می‌کردند و در زمان استراحت به آب دسترسی داشتند [۱۱].

## پروتکل محرومیت از خواب

بی‌خوابی بر اساس روش مطالعه قبلی و با استفاده از دستگاه سکوی چندگانه<sup>۴</sup> ایجاد شد [۱۲]. جهت ایجاد کم‌خوابی مزمن، موش‌ها ۱۸ ساعت در روز و به مدت ۴ هفته، از خواب محروم شدند. به این موش‌ها اجازه داده می‌شد تنها ۶ ساعت در شبانه‌روز از ساعت ۱۲:۰۰ تا ساعت ۱۸:۰۰ بخوابند. حیوانات از شروع دوره تاریکی (ساعت ۱۸:۰۰) تا ساعت ۱۲:۰۰ در دستگاه قرار می‌گرفتند. این دستگاه شامل یک مخزن آب با ابعاد (۱۲۳ × ۴۴ × ۴۴ سانتی‌متر) و با ۱۵ سکوی دایره‌ای به قطر (۶/۵ سانتی‌متر) بود که حدود ۲ سانتی‌متر از سکوها بیرون از سطح آب قرار داشتند. تعداد سکوها بیشتر از تعداد موش‌ها بوده و موش‌ها آزادانه می‌توانستند در اطراف حرکت کنند. این روش متکی به تون عضلانی است و زمانی که حیوانات به مرحله خواب می‌رسیدند، تون عضلاتشان را از دست می‌دادند و با آب تماس پیدا کرده و بیدار می‌شدند. در طول دوره محرومیت از خواب، آب و غذای کافی در دسترس موش‌ها قرار داده می‌شد.

## مکمل دهی

ویتامین E (آلفا توکوفرول، ساخت شرکت سیگما، آلمان) با روش گاواژ<sup>۵</sup> دو ساعت قبل از انجام فعالیت هوازی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن یکبار در روز به موش‌ها خورانده می‌شد. دوز ویتامین E براساس مطالعات گذشته تعیین شد [۱۳]. از روغن کنجد به عنوان حلال ویتامین E استفاده شد. میزان مورد نیاز ویتامین هر موش در ۰/۵ میلی‌لیتر روغن کنجد حل می‌شد. پروتکل مکمل دهی و فعالیت بدنی در تمام گروه‌ها بین ساعت ۸ صبح تا ۱۲ ظهر اجرا شد.

<sup>7</sup> Multiple platform device

<sup>5</sup> Gavage

<sup>6</sup> Morris water maze

<sup>7</sup> Trial

<sup>8</sup> Probe trial

<sup>9</sup> Distance moved

<sup>10</sup> Latency to find hidden platform

<sup>11</sup> Swimming speed

<sup>12</sup> Visible platform

<sup>13</sup> Western Blotting

## آنالیز آماری

برای توصیف آماری داده‌های مربوط به متغیرهای تحقیق، از میانگین و خطای معیار میانگین استفاده شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به اکتساب در ماز آبی موریس، از آزمون آنالیز واریانس مرکب ( $5 \times 3$ ) و برای آنالیز داده‌های مربوط به کاوش در ماز آبی موریس و میزان بیان پروتئین کرب از آنالیز واریانس یک‌سویه استفاده شد. از آزمون‌های تعقیبی بونفرونی<sup>14</sup> و توکی<sup>15</sup> به ترتیب برای مقایسه‌های درون گروهی و بین گروهی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق نسخه ۲۵ نرم‌افزار آماری SPSS در سطح معنی‌داری  $\alpha = 0.05$  انجام شد.

## یافته‌ها

بین گروه‌های کم‌خوابی با کم‌خوابی-روغن کنجد و همچنین گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی با گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی-روغن کنجد در هیچ‌کدام از فاکتورهای مسافت و زمان در مرحله اکتساب، زمان در آزمون کاوش و میزان بیان پروتئین کرب تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۱ تا ۳). بنابراین روغن کنجد تاثیری بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها در آزمون ماز آبی موریس و همچنین بر بیان کرب نداشت. با توجه به اینکه سرعت حرکت یکی از فاکتورهای است که بر مسافت طی شده و مدت زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان تاثیر می‌گذارد، ابتدا سرعت شنا بین گروه‌های مختلف مقایسه شد. نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در فاکتور سرعت وجود ندارد. به علاوه، مرحله سکوی آشکار نیز به منظور اطمینان از توانایی حسی-حرکتی و انگیزشی و سیستم بینایی آزمودنی‌ها برای اجرای تکلیف انجام شد که بر اساس آزمون آنوا یک‌سویه، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در فاکتور زمان لازم برای یافتن سکوی آشکار مشاهده نشد [ $F(4, 35) = 2/27, p = 0/08$ ].

## مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان

نتایج آزمون تحلیل واریانس مرکب ( $5 \times 3$ ) نشان داد که تعامل معنی‌داری بین روزهای اکتساب و گروه مشاهده نشد [ $F(6/79, 59/43) = 1/21, p = 0/31$ ] اما اثر اصلی روزهای

<sup>14</sup> Bonferroni<sup>15</sup> Tukey

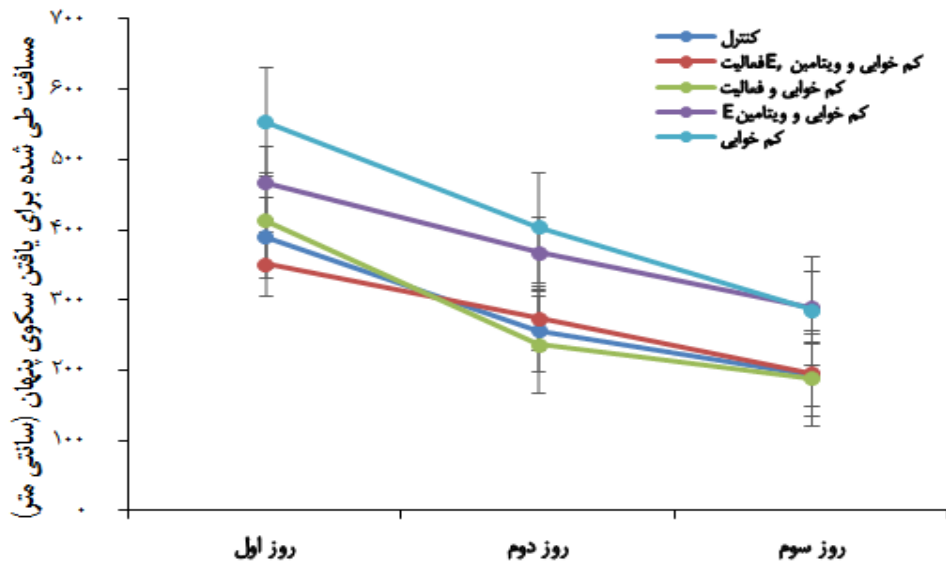
اکتساب معنی‌دار بود [ $F(1/7, 59/43) = 92/49, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در تمام گروه‌ها در طی سه روز اکتساب به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ )، نمودار ۱). هم‌چنین، اثر اصلی گروه معنی‌دار بود [ $F(1, 35) = 8/43, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه‌های کم‌خوابی-فعالیت-ویتامین E، کم‌خوابی-فعالیت و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما این گروه‌ها به طور معنی‌داری مسافت کمتری را برای یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه‌های کم‌خوابی و کم‌خوابی-ویتامین E طی کردند.

## زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان

نتایج آزمون تحلیل واریانس مرکب ( $5 \times 3$ ) نشان داد که تعامل معنی‌داری بین روزهای اکتساب و گروه مشاهده نشد [ $F(6/35, 55/60) = 0/697, p = 0/66$ ] اما اثر اصلی روزهای اکتساب معنی‌دار بود [ $F(1/7, 59/43) = 84/24, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد میانگین مدت زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان در تمام گروه‌ها در طی سه روز اکتساب به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). هم‌چنین، اثر اصلی گروه معنی‌دار بود [ $F(1, 35) = 8/98, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه‌های کم‌خوابی-فعالیت-ویتامین E، کم‌خوابی-فعالیت و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما این گروه‌ها به طور معنی‌داری زمان کمتری را برای یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه‌های کم‌خوابی و کم‌خوابی-ویتامین E سپری کردند.

## آزمون کاوش

در آزمون کاوش، نتایج تحلیل واریانس یک‌سویه در ارتباط با مدت زمان ماندن موش‌ها در ربع دایره هدف در شرایط برداشته شدن سکو، تفاوت معنی‌داری را نشان داد [ $F(4, 35) = 10/14, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین مدت زمان ماندن در ربع دایره هدف در گروه‌های کم‌خوابی-فعالیت هوازی ویتامین E، کم‌خواب-فعالیت هوازی، و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p = 0/63$ ). قابل ذکر است که این گروه‌ها نسبت به گروه‌های کم‌خوابی و



**نمودار ۱-** مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در ماز آبی موريس در طی روزهای اکتساب. میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در تمام گروه‌ها در طی سه روز اکتساب به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). بین گروه‌های کم‌خوابی-فعالیت-ویتامین E، کم‌خوابی-فعالیت و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما این گروه‌ها به طور معنی‌داری مسافت کمتری را برای یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه‌های کم‌خوابی و کم‌خوابی - ویتامین E طی کردند ( $p < 0/05$ ).

پری فرونتال است که هورن<sup>۱۶</sup> (۱۹۹۳) برای اولین بار مطرح و بیان کرد محرومیت از خواب در عملکرد شناختی اختلال ایجاد می‌کند و این اختلال به قشر پری فرونتال بستگی دارد [۱۶]. همچنین اسمیت<sup>۱۷</sup> و همکاران در تحقیق خود نشان دادند حافظه در اعمال مختلف وابسته به هیپوکامپ، از جمله ماز آبی موريس و تکلیف اجتنابی غیرفعال از طریق محرومیت از خواب، تخریب می‌شود [۱۷].

همچنین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در اثر محرومیت ۱۸ ساعته از خواب، پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ موش‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. در راستای این یافته می‌توان به تحقیقی اشاره کرد که تاثیر محرومیت از ویتامین E به طور معنی‌داری مدت زمان بیشتری را در ربع دایره هدف سپری کردند ( $p < 0/05$ ).

خواب را روی سیگنال‌دهی آدنوزین مونو فسفات حلقوی در هیپوکامپ را بررسی کردند. نتایج نشان داد که به واسطه محرومیت از خواب، کرب در مناطق شکنج دندان‌دار هیپوکامپ کاهش یافت [۱۸]. در تحقیقی که کوینلان<sup>۱۸</sup> و همکاران (۲۰۱۳) انجام دادند بیان کردند خواب با برقراری

و کم‌خوابی-ویتامین E به‌طور معنی‌داری مدت زمان بیشتری را در ربع دایره هدف سپری کردند ( $p < 0/05$ ).

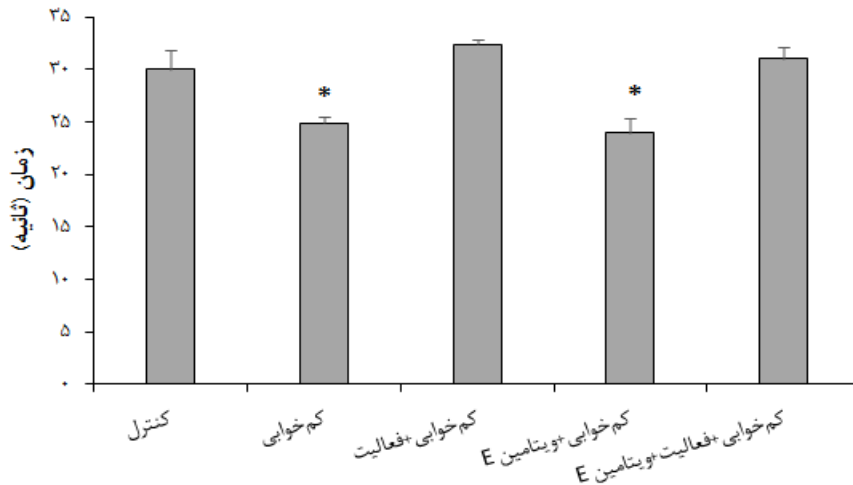
### فاکتور نوروبیولوژیکی کرب

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌سویه نشان داد میزان بیان پروتئین کرب در هیپوکامپ گروه‌های مختلف معنی‌دار بود [ $F(4, 25) = 156/85, p = 0/001$ ]. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان بیان پروتئین کرب در هیپوکامپ گروه کم‌خوابی - فعالیت هوازی - ویتامین E به‌طور معنی‌داری بیشتر از دیگر گروه‌ها بود ( $p < 0/05$ ). به‌علاوه، میزان بیان پروتئین کرب در هیپوکامپ گروه کنترل (خواب نرمال - ویتامین E-فعالیت) و کم‌خوابی-فعالیت هوازی بیشتر از گروه‌های کم‌خوابی، و کم‌خوابی-ویتامین E بود ( $p < 0/05$ ) ولی بین گروه کنترل با گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳).

### بحث

یافته‌های پژوهشی این تحقیق نشان داد که محرومیت از خواب به مدت ۱۸ ساعت کاهش معنی‌داری در عملکرد ماز آبی موريس داشت. این نتایج همسو با فرضیه آسیب‌پذیری

<sup>16</sup> Horne  
<sup>17</sup> Smit  
<sup>18</sup> Quinlan



**نمودار ۲-** مدت زمان ماندن رت‌ها در ربع دایره هدف در آزمون کاوش. بین گروه‌های کنترل، کم‌خوابی-فعالیت هوازی-ویتامین E و کم‌خوابی-فعالیت هوازی، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p = 0/63$ ). این گروه‌ها نسبت به گروه‌های کم‌خوابی و کم‌خوابی-ویتامین E به‌طور معنی‌داری مدت زمان بیشتری را در ربع هدف سپری کردند ( $p < 0/05$ ). \*: تفاوت معنی‌دار گروه‌های کم‌خوابی و کم‌خوابی+ویتامین E با سایر گروه‌ها با  $p < 0/05$ .

کردند که مصرف طولانی‌مدت ویتامین E یا کاهش مصرف آن (به اندازه‌ای که سبب کمبود ویتامین E شود)، تاثیری بر حافظه و یادگیری موش‌های مسن ندارد [۲۱]. جیا<sup>۲۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) با مرور پژوهش‌های گذشته، مصرف مکمل‌های غذایی بر عملکرد شناختی افراد بالای ۶۵ سال را بررسی کرده و عدم تاثیر معنی‌دار ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی را بر عملکرد شناختی گزارش کردند [۲۲]. همچنین، در پژوهشی احمدی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند ۸ هفته مصرف ویتامین E تاثیر معنی‌داری بر عملکرد حرکتی و شناختی موش‌های مسن ندارد [۱۴]. در تناقض با این یافته، الزوبی<sup>۲۲</sup> و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی با بررسی تاثیر ویتامین E بر روی حافظه و یادگیری موش‌های محروم از خواب، نشان دادند محرومیت از خواب موجب استرس اکسیداتیو می‌شود و از سوی دیگر ویتامین E خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد که از اختلال حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت ناشی از محرومیت از خواب جلوگیری می‌کند که در توجیه این یافته بیان شد احتمالاً ناشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در هیپوکامپ است [۲۳]. تضادهای موجود بین نتایج تحقیق‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت طول مدت مصرف و یا نوع ویتامین E استفاده شده، باشد. به علاوه، تحقیق حاضر نشان داد که میزان بیان پروتئین کرب در گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی-ویتامین

تعداد نوروترانسمیتری در سیستم‌های کولینرژیک، سروتونرژیک و دوپامینرژیک که از طریق آوران‌ها، هیپوکامپ را متاثر می‌سازند، امکان نورونز را فراهم می‌آورد [۱۹]. پارک<sup>۱۹</sup> و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه خود بیان کردند که در اثر اختلال در خواب، سیناپس II و کلسیم کالمودولین کیناز در هیپوکامپ موش‌های جوان کاهش می‌یابد [۲۰] و به دنبال محدودیت مزمن خواب، سطوح نورونز هیپوکامپی کاهش و در نتیجه فعال‌سازی سلول‌های هیپوکامپ کاهش می‌یابد که این امر باعث اختلال در شکل‌پذیری سیناپسی و سیگنال‌دهی آدنوزین مونوفسفات حلقوی شده و همچنین باعث کاهش بیان پروتئین کرب می‌شود که در نتیجه آن، در حافظه و یادگیری فضایی اختلال ایجاد می‌شود.

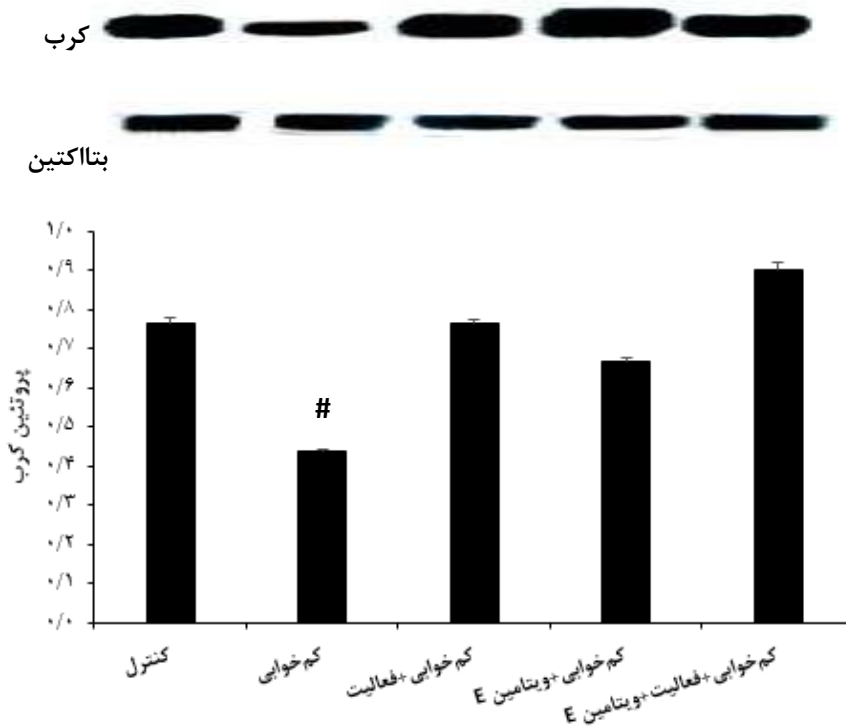
نتایج تحقیق حاضر در حافظه فضایی در ماز آبی موریس نشان داد که گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی-ویتامین E تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کم‌خوابی داشت اما با گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌علاوه، بین گروه‌های کم‌خوابی با گروه کم‌خوابی-ویتامین E تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که این نشان دهنده عدم تاثیر مکمل ویتامین E بر یادگیری و حافظه فضایی در ماز آبی موریس بود. هم راستا با این یافته ایچیتانی<sup>۲۰</sup> و همکاران (۱۹۹۲) مشاهده

<sup>21</sup> Jia

<sup>22</sup> Alzoubi

<sup>19</sup> Park

<sup>20</sup> Ichitani



نمودار ۳- میزان بیان پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ. #: تفاوت معنی دار با تمام گروه‌ها با  $p < 0.05$ .

فضایی می‌شود [۱۵]. لوپرینزی<sup>۲۳</sup> و همکاران (۲۰۲۱) در یک مطالعه مروری تبیین کردند که تمرین جسمانی باعث افزایش شناخت و حافظه در انسان می‌شود [۲۴]. یافته‌های این تحقیق در تضاد با تحقیق ژنگ<sup>۲۴</sup> و همکاران (۲۰۰۴) است که مشاهده کردند فعالیت بدنی بر حافظه فضایی موش‌های صحرایی تاثیر نداشته است. همچنین، در انسان اثرات مفید فعالیت هوازی بر عملکرد شناختی مشاهده نشده است [۲۵]. این تضاد را می‌توان چنین استدلال کرد که در زمانی که تخریب شناختی قابل ملاحظه‌ای در یادگیری رخ داده باشد و یا عاملی مانع ایجاد یادگیری شده باشد، اثرات مثبت فعالیت هوازی چشمگیرتر و معنی دار است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیان پروتئین کرب در گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی نسبت به گروه کم‌خوابی بیشتر بود ولی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. در واقع می‌توان گفت فعالیت هوازی توانسته اثر مخرب کم‌خوابی بر بیان پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ را جبران کند. همچنین، در

E به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کم‌خوابی، کم‌خوابی-فعالیت هوازی و کنترل بود که این یافته نشان می‌دهد علاوه بر این که تعامل هم‌زمان فعالیت هوازی و ویتامین E اثر مخرب کم‌خوابی را جبران کرده، بلکه تاثیری بیشتر از فعالیت هوازی داشته است که این نشان‌دهنده تاثیر ویتامین E بر بیان پروتئین کرب در بافت هیپوکامپ است.

از دیگر یافته‌های این پژوهش این بود که گروه کم‌خوابی-فعالیت هوازی به‌طور معنی‌داری از گروه کم‌خوابی عملکرد بهتری در مازآبی موریس داشتند که بیانگر تاثیر معنی‌دار فعالیت هوازی بر بهبود حافظه فضایی در موش‌های دارای کم‌خوابی مزمن است. همچنین، بین گروه کم‌خوابی و فعالیت هوازی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که این نشان می‌دهد فعالیت هوازی توانسته اثرات مخرب کم‌خوابی را خنثی کند. این یافته با تحقیق خدادادی و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی دارد که نشان دادند فعالیت هوازی، یادگیری و حافظه فضایی موش‌های جوان را به‌طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد. چنین تحلیل شد که فعالیت هوازی از طریق شکل‌پذیری سیناپسی باعث افزایش بیان کرب و در نتیجه بهبود حافظه

<sup>23</sup> Loprinzi

<sup>24</sup> Zheng

شده است. از همکاری اساتید و کارکنان محترم این بخش سپاسگزاریم.

تحقیقی که خدادادی و همکاران (۲۰۱۵) انجام دادند نشان دادند که فعالیت هوازی می‌تواند اثرات منفی کم‌خوابی در بیان پروتئین کرب را خنثی کند [۱۵].

## ملاحظات مالی

برای اجرای این پایان نامه از هیچ موسسه‌ای کمک مالی دریافت نشده است.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## نقش نویسندگان

ن: مشاوره، طراحی پروتکل، آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها؛  
ب: نظارت و راهنمایی مطالعه؛ م: مشاوره، بحث و  
ویرایش نسخه پیش‌نویس مقاله؛ م: گ: انجام مطالعه؛ ف: ح:  
انجام مطالعه.

## فهرست منابع

- McCoy JG, Strecker RE, The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiol Learn Mem* 96 (2011) 564-582.
- Novati A, Hulshof HJ, Koolhaas JM, Lucassen PJ, Meerlo P, Chronic sleep restriction causes a decrease in hippocampal volume in adolescent rats which is not explained by changes in glucocorticoid levels or neurogenesis. *Neuroscience* 190 (2011) 145-155.
- Nakagawa S, Kim J-E, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang Y-J, Nestler EJ, Duman RS, Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22 (2002) 3673-3682.
- Zielinski MR, Davis JM, Fadel JR, Youngstedt SD, Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise training on anxiety, spatial memory, and associated neurobiological measures in mice. *Behav Brain Res* 250 (2013) 74-80.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20 (2004) 2580-2590.
- Fernandes J, Balieiro LGZ, Peixinho-Pena LF, de Almeida AA, Venancio DP, Scorza FA, de Mello MT, Arida RM, Aerobic exercise attenuates inhibitory avoidance memory deficit induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Res* 1529 (2013) 66-73.

## نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر بر اثربخشی فعالیت هوازی بر بهبود حافظه فضایی در موشهایی که یادگیری و حافظه فضایی آن‌ها توسط کم‌خوابی دچار اختلال شده بود تاکید می‌کند و به نظر می‌رسد بتوان از فعالیت هوازی به عنوان یک راهبرد مناسب برای بهبود عملکرد شناختی مختل شده استفاده کرد. ویتامین E قادر به مهار اختلال حافظه ناشی از کم‌خوابی مزمن نبود.

## سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم‌ها مریم گودینی و فاطمه حافظی است که با همکاری بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انسیتیتو پاستور ایران انجام

- Baird JF, Gaughan ME, Saffer HM, Sarzynsky MA, Herter TM, Fritz SL, Stewart JC, The effect of energy-matched exercise intensity on brain-derive neurotrophic factor and motor learning. *Neurobiol Learn Mem* 156 (2018) 33-44.
- Loprinzi PD, Does brain-driven neuro-trophic factor mediate the effects of exercise on memory? *Physician Sports Med* 47 (2019) 1-11.
- Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandeia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ, Neurobiology of exercise. *Obesity* 14 (2006) 345-356.
- Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci* 18 (2000) 367-81.
- Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, Alkadhi K, The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiol Dis* 45 (2012) 1153-1162.
- Wang L, Song Y, Li F, Liu Y, Ma J, Mao M, Wu F, Wu Y, Li S, Guan B, Liu X, Effects of Wen Dan Tang on insomnia-related anxiety and levels of the brain-gut peptide Ghrelin. *Neural Regen Res* 9 (2014) 205-212.
- Comin D, Gazarini L, Zannoni JN, Milani H, de Oliveira RMW, Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric



- oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behav Brain Res* 210 (2010) 38-45.
14. Ahmadi N, Aslankhani M, Naghdi N, The Effect of Vitamin E Supplement on Motor Activity and Spatial Learning in Aged Rats. *J Mot Learn Dev* 5 (2013) 71-89 [in persian].
  15. Khodadadi Z, Influence of chronic sleep restriction and aerobic exercise on spatial memory, and associated neurobiological measures in the hippocampus of adult rats [dissertation]. School of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Beheshti Univ., 2015.
  16. Horne JA, Human sleep, sleep loss and behaviour. Implications for the prefrontal cortex and psychiatric disorder. *Br J Psychiatry* 162 (1993) 413-419.
  17. Smith C, Rose GM, Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 59 (1996) 93-97.
  18. Poulsen D, Standing D, Bullshields K, Spencer K, Micevych P, Babcock A, Overexpression of hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II improves spatial memory. *J Neurosci Res* 85 (2007) 735-739.
  19. Quinlan MG, Almey A, Caissie M, LaChappelle I, Radiotis G, Brake WG, Estradiol and striatal dopamine receptor antagonism influence memory system bias in the female rat. *Neurobiol Learn Mem* 106 (2013) 221-229.
  20. Park DS, Yoon DW, Yoo WB, Lee SK, Yun CH, Kim SJ, Kim JK, Shin C, Sleep fragmentation induces reduction of synapsin II in rat hippocampus. *Sleep Biol Rhythms* 12 (2014) 135-144.
  21. Ichitani Y, Okaichi H, Yoshikawa T, Iyata Y, Learning behaviour in chronic vitamin E-deficient and-supplemented rats: radial arm maze learning and passive avoidance response. *Behav Brain Res* 51 (1992) 157-164.
  22. Jia X, McNeill G, Avenell A, Does taking vitamin, mineral and fatty acid supplements prevent cognitive decline? A systematic review of randomized controlled trials. *J Hum Nutr Diet* 21 (2008) 317-336.
  23. Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, Damaj IM, Salah HA, The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Behav Brain Res* 226 (2012) 205-210.
  24. Loprinzi PD, Roig M, Etnier J, Tomporowski PD, Voss M, Acute and chronic exercise effects on human memory: what we know and where to go from here. *J Clin Med* 10 (2021) 4812.
  25. Zheng XG, TB, LuoXJ, Yang XY, Sui N, Novelty seeking behavior and stress induced locomotion in rat of juvenile period differentially related to morphine place conditioning in their adulthood. *Behav Processes* 65 (2004) 15-23.

## Research paper

## Effect of aerobic activity and vitamin E on spatial memory and CREB protein expression in hippocampal tissue of rats with chronic sleep restriction

Nassour Ahmadi<sup>1\*</sup>, Behrouz Abdoli<sup>1</sup>, Mohammad Sayyah<sup>2</sup>, Maryam Godini<sup>1</sup>, Fatemeh Hafezi<sup>1</sup>

1. School of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2. Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 17 August 2021

Accepted: 10 October 2021

## Abstract

**Background and Aim:** The aim of this study was to determine the effect of aerobic activity and vitamin E on spatial memory and CREB protein expression in the hippocampal tissue of young rats with chronic sleep restriction.

**Methods:** Fifty-six healthy adult male Albino-Wistar rats were randomly assigned into the groups. Chronic sleep restriction was applied through 18 hours of sleep deprivation for 4 weeks. Aerobic activity included 4 weeks of running on a treadmill. Vitamin E dissolved in sesame oil was fed to rats by gavage. At the end of the fourth week, the Morris Water Maze test was performed to measure spatial learning and memory. Western blotting technique was used to measure the expression of CREB protein in the hippocampus. Mixed analysis of variance ( $5 \times 3$ ) was used to analyze the data related to acquisition in the Morris Water Maze and one-way analysis of variance was used to analyze the data related to the probe of the Morris Water Maze and the expression of CREB protein. Bonferroni and Tukey post hoc tests were used for within- and between-group comparisons, respectively.

**Results:** Chronic sleep restriction significantly impaired memory function during the acquisition phase and probe test as well as CREB expression ( $p < 0.05$ ). Vitamin E had no significant effect on spatial memory and CREB protein expression in rats with chronic insomnia. Aerobic activity prevented the deleterious effects of chronic sleep restriction on memory function during the acquisition phase, probe test and the CREB protein expression ( $p < 0.05$ ). Finally, vitamin E along with aerobic activity had a significant effect on the expression of CREB protein in chronic sleep restricted rats ( $p < 0.05$ ) but in the behavioral test showed no greater effect than aerobic activity ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that a period of aerobic activity prevents the deleterious effect of sleep restriction on learning and memory impairment in rats. Vitamin E alone had no effect on memory impairment in sleep-deprived rats. Moreover, it did not increase the positive effects of aerobic activity on the memory impairment of the sleep-deprived rats.

**Keywords:** Treadmill, Sleep, Exercise, Vitamin E, Learning

Please cite this article as follows:

Ahmadi N, Abdoli B, Sayyah M, Godini M, Hafezi F, Effect of aerobic activity and vitamin E on spatial memory and CREB protein expression in hippocampal tissue of rats with chronic sleep restriction. *Iran J Physiol Pharmacol* 5 (2021) 150-159.

\*Corresponding author: n\_ahmadi@sbu.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-5161-8949)