



Research Article

Effect of Eight Weeks of Interval Training on Amyloid Precursor Protein (APP) Gene Expression in Hippocampal Tissue in Methamphetamine-dependent Rats (Crystal)

Ahad Shafiei Bafti¹, Amir Hossein Haghighi^{2*}, Majid Asadi-Shekaari³, Roya Askari⁴, Hamid Marefati⁴

¹ Ph.D Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

² Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

³ Professor, Neuroscience Research Center, Neuropharmacology Research Institute, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

***Corresponding author:** Amir Hossein Haghighi, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran. E-mail: ah.haghighi@hsu.ac.ir

DOI: [10.32592/nkums.15.1.79](https://doi.org/10.32592/nkums.15.1.79)

How to Cite this Article:

Shafiei Bafti A, Haghighi A H, Asadi-Shekaari M, Askari R, Marefati H. Effect of Eight Weeks of Interval Training on Amyloid Precursor Protein (APP) Gene Expression in Hippocampal Tissue in Methamphetamine-dependent Rats (Crystal). J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(1):79-88. DOI: 10.32592/nkums.15.1.79

Received: 08 November 2022

Accepted: 06 February 2023

Keywords:

Amyloid precursor protein
Cognitive function
METH
Moderate interval training

Abstract

Introduction: Methamphetamine (METH) is a stimulant drug that causes memory and learning disorders. The present study aimed to investigate the effect of eight weeks of interval training on APP gene expression in hippocampal tissue and open field test in methamphetamine-dependent rats.

Method: In this experimental research, 32 rats were assigned to four equal groups of saline, primary methamphetamine (METH-1), methamphetamine+training (METH+MIT), and secondary methamphetamine (METH-2). The METH was injected at the dose of 5 mg/kg body weight for 21 days. The exercise program (5 sessions per week) included interval training (4 sets of 4 minutes with moderate intensity and 2 minutes of active rest between sets) on a treadmill. At the end of the injection and training period, the hippocampus tissue of the rats was extracted to evaluate gene expression changes. An open-field behavioral test was also conducted. The data were analyzed using the one-way ANOVA at the significance level of $P \leq 0.05$.

Results: Methamphetamine significantly increased APP gene expression in METH-1,2 groups compared to saline (respectively; $P \leq 0.007$ and $P \leq 0.005$). The total distance and movement speed of rats in METH-1 and 2 groups had a significant decrease compared to saline (respectively, $P \leq 0.004$ and $P \leq 0.026$). The MIT led to a significant reduction of APP compared to METH-1,2 groups (respectively, $P \leq 0.041$ and $P \leq 0.028$). Movement speed in the MIT group increased significantly compared to the METH-1 group ($P \leq 0.008$).

Conclusion: Methamphetamine reduced cognitive performance (learning and memory), and according to the results, MIT probably improved cognitive performance. Nonetheless, further studies are necessary to reach definitive conclusions.



بررسی اثر ۸ هفته تمرین تناوبی بر بیان ژن پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP) بافت هیپوکامپ در موش های صحرایی وابسته به متامفتامین (شیشه)

احمد شفیع بافتی^۱، امیرحسین حقیقی^{۲*}، مجید اسدی شکاری^۳، رویا عسکری^۴، حمید معرفتی^۴

^۱ دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
^۲ استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
^۳ استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نورو فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
^۴ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
* نویسنده مسئول: امیرحسین حقیقی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران. ایمیل:

ah.haghighi@hsu.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.15.1.79

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷
مقدمه: متامفتامین، نوعی داروی محرک است که مصرف آن سبب اختلال حافظه و یادگیری می شود. هدف تحقیق حاضر، بررسی اثر ۸ هفته تمرین تناوبی بر بیان ژن پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP) بافت هیپوکامپ و آزمون میدان باز موش های صحرایی وابسته به متامفتامین بود.	واژگان کلیدی: پروتئین پیش ساز آمیلوئید تمرین تناوبی عملکرد شناختی متامفتامین
روش کار: در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی، ۳۲ موش صحرایی به ۴ گروه مساوی، سالین، متامفتامین اولیه (METH-1)، متامفتامین+تمرین (METH+MIT) و متامفتامین ثانویه (METH-2) تقسیم شدند. متامفتامین به مقدار ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به مدت ۲۱ روز تزریق شد. برنامه تمرین (۵ جلسه در هفته) شامل دویدن تناوبی (۴ ست ۴ دقیقه ای با شدت متوسط و ۲ دقیقه استراحت فعال بین ست ها) روی تردمیل بود. در پایان دوره تزریق و تمرین، برای ارزیابی تغییرات بیان ژنی، بافت هیپوکامپ رت ها استخراج شد. همچنین، آزمون رفتاری میدان باز انجام شد. داده ها با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه در سطح معناداری $P \leq 0.05$ تحلیل شدند.	
یافته ها: متامفتامین باعث افزایش معنادار بیان ژن APP در گروه های متامفتامین اولیه و ثانویه، نسبت به گروه سالین شد ($P \leq 0.007$) ($P \leq 0.005$). مسافت کل و سرعت حرکت موش ها در گروه های متامفتامین اولیه و ثانویه، نسبت به سالین کاهش معناداری داشت (به ترتیب، $P \leq 0.004$ و $P \leq 0.026$). MIT منجر به کاهش معنادار APP نسبت به گروه های متامفتامین اولیه و ثانویه شد (به ترتیب، $P \leq 0.041$ و $P \leq 0.028$). سرعت حرکت در گروه متامفتامین+تمرین، نسبت به گروه متامفتامین اولیه افزایش معناداری داشت ($P \leq 0.008$).	
نتیجه گیری: متامفتامین باعث کاهش عملکرد شناختی (یادگیری و حافظه) شده است. با توجه به نتایج، انجام تمرینات تناوبی با شدت متوسط، احتمالاً عملکرد شناختی را بهبود داده است. اگرچه، تحقیقات بیشتری برای دست یافتن به نتایج قطعی ضروری است.	

مقدمه

هیپرترمی و غیره در آن دخیل هستند [۲، ۳]. یکی از مسیرهایی که اخیراً مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته، نقش متامفتامین و تأثیر آن بر کاهش فعالیت مسیر پیام رسانی انسولین در سیستم عصبی مرکزی و به دنبال آن، کاهش عملکرد شناختی و حافظه است [۴].

گیرنده های انسولین (Insulin receptor: IR) به شدت در نواحی پیاپی، هیپوکامپ و هیپوتالاموس پخش می شوند و فسفوریلاسیون خودکار فعالیت های پایین دستی، یعنی پروتئین سوبسترای گیرنده انسولین (Insulin receptor substrate: IRS) را آغاز می کنند که متعاقباً، اینوزیتول تری فسفاتید-کیناز (Phosphoinositide 3-kinase: PI3K) و پروتئین کیناز

متامفتامین (Methamphetamine: METH) دارویی محرک و اعتیادآور است که بلافاصله پس از مصرف، باعث فعال سازی سیستم های خاصی در مغز می شود. در سال های اخیر، متامفتامین به دلیل داشتن خواص تحریکی، توهمزها، احساس لذت و سرخوشی، مورد توجه مردم، به ویژه جوانان و نوجوانان قرار گرفته است. ترکیب اصلی متامفتامین، $C_9H_{13}N$ است که سیستم دوپامینی مغز را به شدت تحریک می کند [۱]. هرچند مکانیسم های تخریب سلول های عصبی، در نتیجه مصرف متامفتامین، در سیستم عصبی مرکزی به طور دقیق مشخص نشده است، تحقیقات نشان داده اند که استرس اکسیداتیو، القای آپوپتوز، فعال سازی میکروگلیا،

که مرکز شناخت و حافظه است و احتمال افزایش ابتلای این افراد به بیماری آلزایمر بیشتر می‌شود. لذا، راهکارهای پیشگیری و بهبوددهنده متعددی برای اثرات نوروتوکسیک متامفتامین مطرح شده است.

یکی از این راهکارها، ورزش (فعالیت بدنی منظم) است. فعالیت جسمانی به‌عنوان یک مداخله، برای کاهش اثرات مخرب متامفتامین مطرح است [۱۲]. متامفتامین عملکرد طبیعی مغز را مختل می‌کند و ورزش از این اختلال جلوگیری می‌کند یا آن را کاهش می‌دهد. Cho و Kang (۲۰۱۴) نشان دادند که ۶ هفته تمرین روی نوار گردان، باعث بهبود پیام‌دهی و کاهش معنادار Aβ1-42 در مغز موش‌های آلزایمری شده با استروپتوزوتوسین می‌شود [۱۳]. Liu و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که تعداد و اندازه پلاک‌های آمیلوئیدی و همچنین، سطح Aβ1-42 در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری، پس از ۵ ماه تمرین روی نوار گردان کاهش معناداری یافت [۱۴]. Baker و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فعالیت‌های ورزشی در افراد مسن باعث افزایش تجزیه APP می‌شود. در واقع، تمرینات ورزشی از طریق افزایش پروتئولیز APP از مسیرهای غیر آمیلوئیدساز منجر به این تجزیه می‌شود [۱۵]. احتمالاً، ورزش به‌طور مستقیم، متابولیسم APP را با استفاده از افزایش فعالیت نورونی تعدیل می‌کند. در واقع، پردازش APP توسط پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) و فسفولیپاز C، افزایش می‌یابد و این مسیرها از طریق ورزش فعال می‌شوند [۱۶].

با این حال، نقش مداخله‌گر تمرینات تناوبی با شدت متوسط بر شاخص آسیب هیپوکامپ ناشی از متامفتامین هنوز مشخص نیست؛ زیرا تاکنون پژوهشی در این زمینه انجام نشده است. سنجش اثر مصرف متامفتامین بر یکی از شاخص‌های مهم در ایجاد بیماری آلزایمر (APP) همراه با اثر تمرینات ورزشی ضروری است. بنابراین، با توجه به اثرات مضر متامفتامین بر مغز، همچون ایجاد نوروتوکسیسیته و مرگ نورونی، این سؤال مطرح می‌شود که آیا تمرینات ورزشی با تأثیر بر متابولیسم APP در هیپوکامپ که شاخص مهمی در عملکرد شناختی (یادگیری و حافظه) است، مؤثر است یا خیر. بنابراین، هدف تحقیق حاضر، بررسی اثر ۸ هفته تمرین MIT بر بیان ژنی APP بافت هیپوکامپ و آزمون میدان باز در موش‌های صحرایی وابسته به متامفتامین (شیشه) بود.

روش کار

حیوانات

در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی، ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار، با میانگین وزنی 180 ± 20 گرم از مرکز آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شد. موش‌ها تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و درجه حرارت 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات با روش تصادفی ساده، به ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه سالین (Saline)، گروه متامفتامین اولیه (METH-1)، گروه متامفتامین+تمرین تناوبی با شدت متوسط (METH+MIT) و گروه متامفتامین ثانویه (METH-2) تقسیم

B (Protein kinase B: Akt) را فعال می‌کنند. بنابراین، مسیر PI3K/Akt در مغز، یک سیگنالینگ مهم انسولین است که مسئول محافظت از سلول‌های عصبی، یادگیری و عملکردهای حافظه است [۵]. فعال‌سازی Akt، یکی از مولکول‌های کلیدی را در پایین‌دست مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt غیرفعال می‌کند و در شرایط پاتولوژیک جدی، از جمله نقص شناختی مربوط به بیماری آلزایمر (Alzheimer Disease: AD) نقش دارد [۶]. علاوه بر این، سیگنالینگ مهم داخلی دیگر، مسیر MAPK/ERK است که نقشی اساسی در شکل‌گیری بیماری آلزایمر ایفا می‌کند، که نشان‌دهنده پیچیدگی مسیر انسولین در تنظیم تغییرات پاتولوژیک مانند بیماری آلزایمر است.

گزارش‌های اخیر عنوان کرده‌اند که با قرار گرفتن مکرر موش‌ها در معرض متامفتامین، نقایص شناختی آشکار در آزمون رفتاری ماز Y شکل، همراه با اختلال سیگنالینگ انسولین (IR/IRS2/PI3K/Akt/GSK-3β) به‌وجود می‌آید [۴]. با این حال، اثرات متامفتامین در مسیر سیگنالینگ انسولین و بیان پروتئین‌های پاتولوژیک مرتبط با بیماری آلزایمر، از جمله پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) و p-tau، به‌خوبی شناخته نشده است [۴]. با اتصال انسولین به گیرنده خود، فعالیت تیروزین کینازی زیر واحد بتا آغاز می‌شود و به‌دنبال آن، مسیرهای پایین‌دستی Akt و PI3K فعال می‌شوند. فعال شدن این مسیر، باعث افزایش پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) و کاهش عملکرد شناختی می‌شود [۷، ۳].

اگرچه، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که آمیلوئید بتا و پروتئین پیش‌ساز (APP) آن در مغز، نقش‌های فیزیولوژیکی دارند، تجمع آن‌ها در مغز عامل مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر است. تصور می‌شود که تجمع آمیلوئید بتا در مغز، در نتیجه نبود تعادل در تولید و پاک‌سازی (Clearance) آن از مغز ایجاد می‌شود، ولی مولکول APP در نورون‌ها، به‌مقدار زیادی تولید و به‌سرعت نیز متابولیزه می‌شود [۸، ۳]. در چندین مطالعه، عملکردهایی برای APP همچون نقش در اتصالات سلولی، رشد سلول، تحرک رشد رو به جلوی زوائد عصبی، مهاجرت نورونی، تولید سیناپس، پلاستیسیته سیناپسی و بقای سلول گزارش شده است. با این وجود، نقش APP در سیستم عصبی مرکزی، به‌طور کامل شناخته نشده و نیازمند مطالعات بیشتری است [۸-۱۰].

بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تشکیل آمیلوئید بتا، مقدمه‌ای برای اثرات بیماری‌زایی تائو است و جلوگیری از تشکیل آمیلوئید بتا، به کاهش تشکیل تائو منجر می‌شود. اگرچه، پروتئین تائو در مسیر ایجاد بیماری آلزایمر، در پایین‌دست آمیلوئید بتا قرار گرفته است، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد مولکول تائو در القای آبشار پیام‌رسانی ناشی از آمیلوئید بتا نقش دارد و احتمالاً به‌وسیله APP میانجی‌گری می‌شود [۱۱]. در واقع، زمانی که متامفتامین مصرف شود، مسیر پیام‌رسانی انسولین را در بافت‌های مختلف مغز، به‌خصوص هیپوکامپ مختل می‌کند و در نتیجه، میزان تولید APP به‌میزان زیادی افزایش می‌یابد و در نهایت، آمیلوئید بتا و تائو افزایش می‌یابند. در نتیجه، تخریب نورونی در هیپوکامپ ایجاد می‌شود

شدند.

در ساعت مشخصی در طول روز انجام شد [۱۸]. تمرینات تناوبی با شدت متوسط (۶۰ تا ۶۵ درصد سرعت بیشینه) با شیب صفر انجام شد. مدت تمرین در هر جلسه ۳۶ دقیقه بود که شامل ۶ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۲۰ درصد سرعت بیشینه بود. برنامه اصلی از دو بخش تناوب متوسط با شدت ۶۰ تا ۶۵ درصد سرعت بیشینه (۴ تناوب، ۴ دقیقه‌ای) و تناوب سبک با شدت ۳۰ درصد سرعت بیشینه (۴ تناوب، ۲ دقیقه‌ای) اجرا شد (جدول ۱).

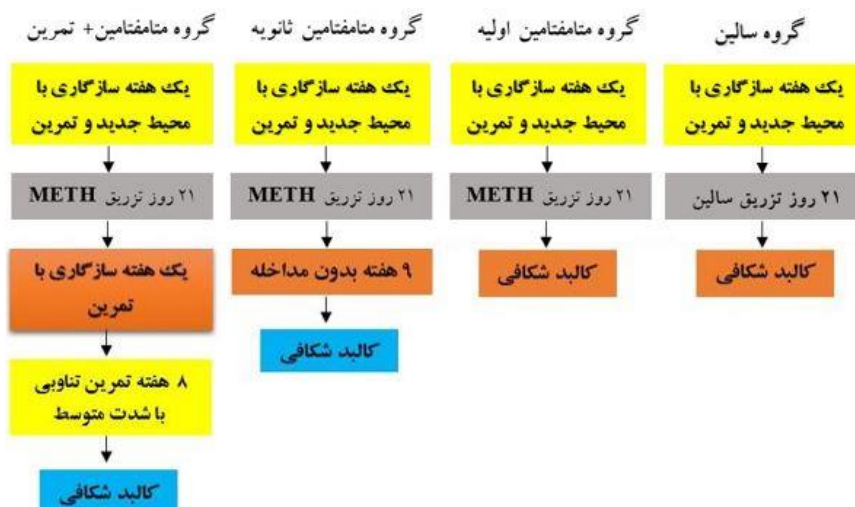
آزمون رفتاری میدان باز

آزمون میدان باز در انتهای دوره‌های ۲۱ روز تزریق و ۸ هفته تمرینات ورزشی، از موش‌های صحرایی گرفته شد. این آزمون برای ارزیابی عملکرد شناختی (یادگیری و حافظه) موش‌های صحرایی انجام شد. برای انجام این آزمون، از یک جعبه رو باز استفاده شد که کف آن با خطوطی، به چندین مربع مساوی تقسیم‌بندی شده بود. پهنه این جعبه، به دو ناحیه محیط و مرکز تقسیم شد. حرکت و محل موش با دوربین دیجیتال تعبیه‌شده در بالای جعبه، ردگیری و ثبت شد و در نرم‌افزار مربوطه محاسبه و تحلیل شد. برای انجام آزمون، حیوان به آرامی و به صورت تصادفی، در یکی از چهار گوشه دستگاه قرار داده و به او اجازه داده شد تا محیط دستگاه را آزادانه به مدت ۵ دقیقه کاوش کند. بعد از انجام آزمون، موش‌ها به قفس‌هایشان منتقل شدند. کف و دیواره‌های

سپس، رت‌ها به مدت ۱ هفته، دوره آشنایی با محیط آزمایشگاه و نوار گردان را انجام دادند. تزریق درون صفاقی محلول سالین (۰/۹ درصد تزریقی) و متامفتامین هیدروکلراید (خلوص >۹۶ درصد مرکز ملی مواد مخدر کرمان، ایران) به ترتیب در گروه‌های سالین، متامفتامین اولیه و ثانویه و متامفتامین+تمرین انجام شد. متامفتامین با دُز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه یک بار به مدت ۲۱ روز (دُز کلی تزریق ۱۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم) القا شد [۱۷]. همچنین، این ۴ گروه براساس برنامه و طرح شکل ۱، تحت مطالعه قرار گرفتند.

پروتکل تمرین

قبل از اجرای برنامه تمرینی، موش‌های صحرایی، آزمون ورزشی فزاینده را تا مرز خستگی انجام دادند. ابتدا، ۵ دقیقه گرم کردن به صورت خیلی آهسته انجام شد که تقریباً معادل با ۸ متر در دقیقه روی تردمیل بود. بعد از گرم کردن، آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی با سرعت ۱۰ متر در دقیقه شروع شد و به ازای هر ۳ دقیقه، ۳ متر بر سرعت تردمیل افزوده شد تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند [۱۸]. سپس، میانگین سرعت بیشینه موش‌های صحرایی در گروه متامفتامین+تمرین، برای طراحی برنامه تمرین محاسبه شد. تمرینات گروه متامفتامین+تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته، روی نوار گردان مخصوص جوندگان



شکل ۱. نمایش شماتیک اجرای مداخلات مطالعه

جدول ۱. پروتکل تمرین تناوبی با شدت متوسط (MIT)

هشتم	هفتم	ششم	پنجم	چهارم	سوم	دوم	اول	روش تمرین، هفته
تناوب متوسط								
۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	تعداد تناوب
۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	زمان هر تناوب (دقیقه)
۳۰	۲۸	۲۶	۲۴	۲۲	۲۰	۱۸	۱۶	سرعت هر تناوب (متر بر دقیقه)
استراحت فعال								
۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	تعداد تناوب
۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	زمان هر تناوب (دقیقه)
۱۳	۱۳	۱۲	۱۲	۱۱	۱۱	۱۰	۱۰	سرعت هر تناوب (متر بر دقیقه)

جدول ۲. پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

ژن هدف	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	دما (C°)
APP	5'-GCGGCAACAGGAACAACCTTT-3'	5'-TGCCGTCGTGGGAAACAC-3'	۵۷/۳۰
GAPDH	5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	۵۹/۴۰

متوالی به صورت دنا تورا سیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد.

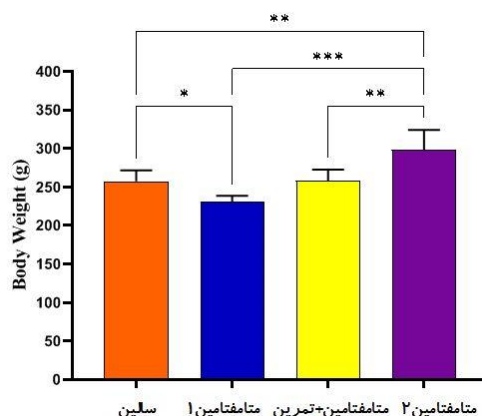
توالی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از نرم افزار آنالین Primer-BLAST (NCBI) طراحی شد. همچنین، از ژن *GAPDH* به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۲). تجزیه و تحلیل داده ها بر اساس مقایسه چرخه آستانه (CT) انجام شد. منحنی تکثیر هر واکنش PCR با منحنی تکثیر ژن مرجع *GAPDH* مربوطه نرمالیزه شد. در این مطالعه، اختلاف CT به دست آمده از نمونه های آزمایش و نمونه های کنترل، محاسبه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع به دست آمد.

روش آماری

تمام نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شد. برای بررسی توزیع نرمال بودن داده ها، از آزمون شاپیرو ویلیک و برای مقایسه تفاوت بین گروه ها، از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری $P \leq 0.05$ استفاده شد. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد.

یافته ها

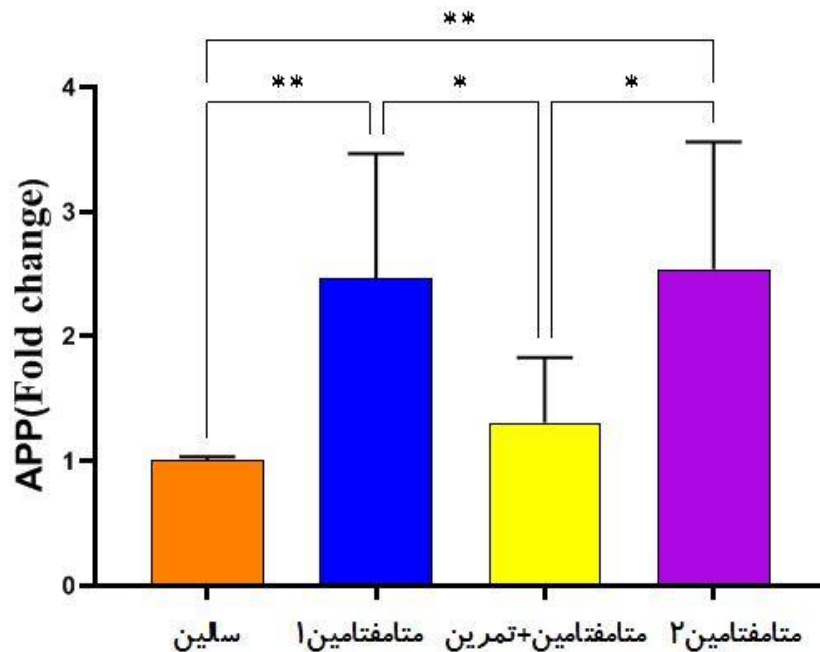
تغییرات وزن موش ها در پایان دوره ۲۱ روز تزریق متامفتامین و ۸ هفته تمرین در گروه ها تجزیه و تحلیل آماری شد. مصرف متامفتامین در گروه متامفتامین اولیه ($P \leq 0.048$)، باعث کاهش معنادار میانگین وزنی موش های صحرایی نسبت به گروه سالین شد. البته بین وزن گروه سالین و متامفتامین+تمرین ($P \leq 0.999$) اختلاف معناداری مشاهده نشد. وزن نهایی گروه متامفتامین ثانویه در پایان ۸ هفته تمرینات تناوبی، در مقایسه با گروه سالین ($P \leq 0.002$)، متامفتامین اولیه ($P \leq 0.001$) و متامفتامین+تمرین ($P \leq 0.004$) افزایش معناداری داشت (شکل ۲).



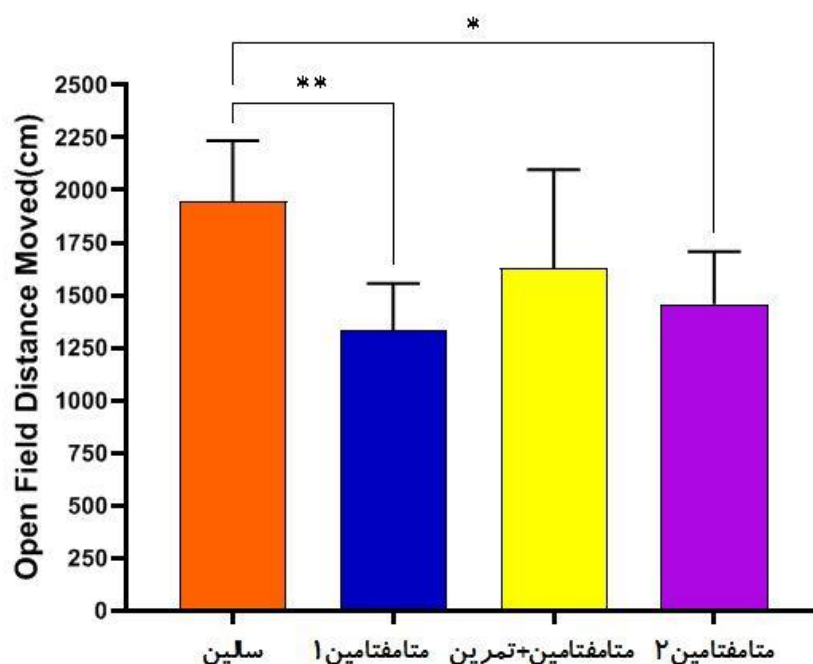
شکل ۲. تغییرات وزن موش های صحرایی در گروه های سالین، متامفتامین اولیه، متامفتامین+تمرین و متامفتامین ثانویه * اختلاف معنادار گروه سالین را با گروه متامفتامین اولیه نشان می دهد؛ ** اختلاف معنادار گروه متامفتامین ثانویه را با گروه های متامفتامین+تمرین و سالین نشان می دهد؛ *** اختلاف معنادار گروه متامفتامین ثانویه را با گروه متامفتامین اولیه نشان می دهد.

تمرین و سالیन مشاهده نشد ($P \leq 0.0007$) (شکل ۳).
نتایج آزمون رفتاری میدان باز نشان داد که تزریق متامفتامین باعث کاهش معنادار شاخص مسافت پیموده شده کل، به ترتیب در گروه‌های متامفتامین اولیه و ثانویه ($P \leq 0.004$) ($P \leq 0.0026$) در مقایسه با گروه سالین شده است (شکل ۴).

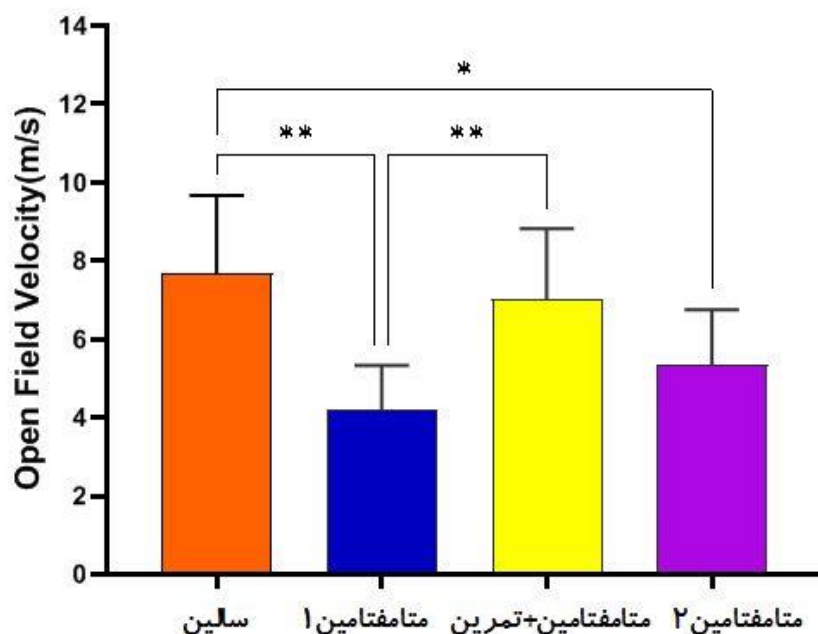
همچنین، افزایش بیان ژن شاخص *APP* به ترتیب در گروه متامفتامین اولیه و ثانویه ($P \leq 0.007$) ($P \leq 0.005$)، در مقایسه با گروه سالین معنادار بود. تمرینات تناوبی با شدت متوسط، به ترتیب باعث کاهش معنادار بیان ژن *APP* نسبت به گروه‌های متامفتامین اولیه و ثانویه ($P \leq 0.028$) ($P \leq 0.041$) شد. اختلاف معناداری بین گروه متامفتامین+



شکل ۳. تغییرات بیان ژن شاخص *APP* در گروه‌های سالین، متامفتامین اولیه، متامفتامین+تمرین و متامفتامین ثانویه
* اختلاف معنادار گروه متامفتامین+تمرین را با گروه‌های متامفتامین اولیه و ثانویه نشان می‌دهد؛ ** اختلاف معنادار گروه سالین را با گروه‌های متامفتامین اولیه و ثانویه نشان می‌دهد.



شکل ۴. تغییرات شاخص مسافت پیموده شده کل در آزمون میدان باز در گروه‌های سالین، متامفتامین اولیه، متامفتامین+تمرین و متامفتامین ثانویه
* اختلاف معنادار گروه سالین را با متامفتامین ثانویه نشان می‌دهد؛ ** اختلاف معنادار گروه سالین را با گروه متامفتامین اولیه نشان می‌دهد.



شکل ۵: تغییرات شاخص سرعت حرکت در آزمون میدان باز در گروه‌های سالین، متمافتامین اولیه، متمافتامین+تمرین و متمافتامین ثانویه
* اختلاف معنادار گروه سالین را با گروه متمافتامین ثانویه نشان می‌دهد؛ ** اختلاف معنادار گروه متمافتامین اولیه را با گروه‌های سالین و متمافتامین+تمرین نشان می‌دهد.

[۲۱]. شفاهی و همکاران (۲۰۱۹)، کاهش حافظه فضایی و غیرفضایی را به واسطه کوچک شدن هیپوکامپ مغز و مرگ سلولی نورون‌ها را با متمافتامین گزارش کردند [۲۲]. با اتصال انسولین به گیرنده مربوطه، دو مسیر اصلی PI3K/AKT و MAPK فعال می‌شود. به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر، تزریق متمافتامین، مسیر پیام‌رسانی انسولین را مختل کرده و منجر به افزایش بیان ژن $GSK-3\beta$ شده است و در نهایت، افزایش APP را به دنبال داشته است که با مطالعه Chen و همکاران همسو بوده است [۴].

مطالعات نشان داده است که کاهش انرژی در دسترس موجب اختلال در تولید پروتئین‌های پیش‌ساز آمیلوئید و تجمع پلاک‌های بتا-آمیلوئید می‌شود [۴، ۲۳]. در بیماری آلزایمر، کاهش نورون‌ها در چندین منطقه مهم یادگیری و حافظه، به خصوص در هیپوکامپ اتفاق می‌افتد. بنابراین، مسیر PI3K/Akt در مغز، یک سیگنالینگ مهم انسولین است که مسئول محافظت از سلول‌های عصبی، یادگیری و عملکردهای حافظه است [۲۴]. متمافتامین، فعال‌سازی Akt را غیرفعال می‌کند که یکی از مولکول‌های کلیدی در پایین‌دست مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt است [۶].

پژوهشگران اظهار داشتند که فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق تنظیم فرایند عملکردی پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید و افزایش تخریب و پاک‌سازی $A\beta$ ، به کاهش سطوح بتا آمیلوئید در مغز منجر می‌شود [۱۵]. از این‌رو، نتایج ما بیان می‌کند که فعالیت بدنی برای جلوگیری از تجمع پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید انجام می‌شود. Adlard و همکاران (۲۰۰۵) نیز بیان کردند که تمرین ورزشی، بیان APP و $A\beta$ را در راستای کاهش تولید $A\beta$ میانجیگری می‌کند. در نتیجه، این موضوع

همچنین، تزریق متمافتامین به ترتیب باعث کاهش معنادار شاخص سرعت حرکت در گروه‌های متمافتامین اولیه و ثانویه ($P \leq 0.001$) ($P \leq 0.036$)، در مقایسه با گروه سالین شد. تمرینات تناوبی با شدت متوسط باعث افزایش معنادار سرعت حرکت موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه متمافتامین اولیه شد ($P \leq 0.008$) (شکل ۵).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای متمافتامین در هیپوکامپ موش‌های صحرایی اثرات متعددی دارد. به‌طوری‌که، در آزمون رفتاری، نشان داده شد که آزمون حافظه فضایی میدان باز موش‌های صحرایی با تزریق متمافتامین دچار اختلال شده و در شاخص‌هایی همچون مسافت پیموده‌شده کل و سرعت حرکت، در گروه متمافتامین به‌طور معناداری کاهش داشته‌اند. اما اثر مثبت تمرین MIT منجر به بهبود شاخص‌های مدنظر شد. همچنین، نتایج شاخص بیان ژنی نشان داد که میزان APP همراه با تزریق متمافتامین در بافت هیپوکامپ، افزایش بیان داشته است. تمرین MIT منجر به کاهش بیان آن شد که این موضوع نشان‌دهنده اثر مثبت تمرین بر شاخص مدنظر است.

مطالعات نشان داده‌اند که متمافتامین سبب القای بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی در سلول‌های بدن، نظیر سلول‌های عصبی می‌شود [۲۰]. Izawa و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که متمافتامین در موش‌های صحرایی اسپراگ داوولی، سبب کاهش حافظه، گیجی و فراموشی می‌شود. همچنین، مصرف بلندمدت متمافتامین، سبب تخریب پایانه‌های عصبی دوپامینرژیک و سروتونرژیک در مغز می‌شود

یادگیری و حافظه را در حیوانات تمرین کرده تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۵]. در این راستا، Baker و همکاران (۲۰۱۰) اظهار کردند که ورزش ممکن است افزایش‌دهنده تجزیه APP باشد. از آنجاکه، فعالیت ورزشی بسیاری از فرآورده‌های ژنی را هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین، تعدیل می‌کند، این احتمال وجود دارد که چندین مسیر برای تنظیم سطح آمیلوئید به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم فعال شود [۱۵]. یک احتمال این است که ورزش فعالیت پروتئازوم را به‌طور مثبت تنظیم می‌کند و در نتیجه، تخریب قطعات پروتئولیتیکی APP را در پی خواهد داشت. احتمال دوم این است که ورزش به‌طور مستقیم، متابولیسم APP را با استفاده از افزایش فعالیت نورونی تعدیل می‌کند [۱۶].

از طرف دیگر، اشاره شده است که فعالیت بدنی احتمالاً اختلالات رفتاری را با کاهش مقادیر پپتید β -42، از طریق افزایش ساخت عامل‌های نوروتروفیک BDNF، IGF-1 و NGF که برای بقای نورونی، تکثیر نورونی و شکل‌پذیری سیناپسی اهمیت دارند، بهبود می‌بخشد [۲۶]. همچنین، فعالیت ورزشی پلاک‌های $A\beta$ را کاهش می‌دهد و در افزایش شناخت، یادگیری فضایی (سه‌بعدی)، حافظه، شکل‌پذیری سیناپسی و ایجاد بافت عصبی موش‌های آلزایمری نقش دارد [۲۷]. پژوهشی یافت نشد که به‌طور مستقیم، ارتباط تمرینات ورزشی، متامفتمین و شاخص APP را بررسی کرده باشد. بنابراین، نیاز به تحقیقات بیشتری در ارتباط با نوع، شدت و زمان اثرگذاری تمرینات ورزشی احساس می‌شود.

گزارش‌های اخیر عنوان کرده‌اند که با قرار گرفتن مکرر موش‌ها در معرض متامفتمین، نقایص شناختی آشکاری در آزمون رفتاری ماز Y شکل، همراه با اختلال سیگنالینگ انسولین (IR/IRS2) و $PI3K/Akt/GSK-3\beta$ پدیدار شده است که افزایش میزان APP را به‌دنبال دارد [۴، ۲۸]. در پژوهش حاضر، تزریق متامفتمین، احتمالاً مسیر پیام‌رسانی انسولین را در هیپوکامپ مختل کرده و منجر به مرگ نورونی شده است. Choi و همکاران (۲۰۰۱) عنوان کردند که زمان و مسافت طی‌شده برای پیدا کردن سکوی مخفی درون ماز آبی موریس، از پارامترهای مهمی هستند که در موش‌های آلزایمری کاهش می‌یابد [۲۹]. در واقع، یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر، نسنجیدن ماز آبی موریس بود. همچنین، مطالعات، بیشتر آثار سودمند تمرین ورزشی را بر حافظه فضایی موش‌ها گزارش کرده‌اند [۳۰، ۳۱]. به‌نظر می‌رسد تمرین MIT تا حدودی بر بهبود حافظه فضایی و همچنین، شناخت محیطی موش‌هایی که متامفتمین استفاده کرده‌اند، تأثیر مفید گذاشته است. البته، برای سنجش حافظه فضایی موش‌های صحرایی از آزمون‌های رفتاری متعددی استفاده می‌شود که یکی از آن‌ها، آزمون میدان باز است.

Somkuwar و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از متامفتمین در مدل‌های حیوانی، به‌دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن، سبب ایجاد

استرس اکسیداتیو و نوروکسیسیتی می‌شود؛ زیرا رادیکال‌های آزاد به‌طور طبیعی، به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داخل سلولی همچون سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز برداشته و حذف می‌شوند [۳۲]. احتمالاً، متامفتمین در هیپوکامپ موش‌های تحقیق حاضر منجر به استرس اکسیداتیو شده و به‌دنبال آن، باعث تخریب نورونی شده است. به‌نظر می‌رسد نوروکسیسیتی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه متامفتمین اتفاق افتاده است؛ زیرا نتایج آزمون‌های رفتاری نشان‌دهنده کاهش فعالیت حرکتی موش‌ها است. Hamakawa و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۳ هفته فعالیت ورزشی، موجب کاهش سطح رادیکال‌های آزاد می‌شود که با کاهش اختلالات حرکتی ناشی از آن همراه خواهد بود [۳۳].

Ogonovszky و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که ورزش با شدت متوسط (۱ ساعت شنا در روز، به‌مدت ۸ هفته) هم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و هم مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو را در بدن افزایش می‌دهد و عملکرد حافظه موش‌های صحرایی را بهبود می‌بخشد [۳۴]. Somkuwar و همکاران (۲۰۱۵) عنوان کردند که فعالیت ورزشی هوازی، با افزایش آنتی‌اکسیدان‌های سلول‌های عصبی، موجب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش مقاومت نورون‌های ناحیه هیپوکامپ در برابر آسیب‌های ناشی از متامفتمین می‌شود [۳۲]. مکانیسم‌های حفاظت‌کننده نورونی فعالیت ورزشی، دیدگاه درمانی نوین و نقطه‌نظر مهم پیشگیرانه‌ای را فراهم می‌کند و به‌عنوان روشی مؤثر و راهبردی مفید، در کاهش عوارض مغزی ناشی از متامفتمین است. Camiletti و همکاران (۲۰۱۳) عنوان کردند که تمرین ورزشی، فعالیت پایه برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مستقیم و غیرمستقیم، انواع گونه‌های اکسیدکننده را خنثی و از سلول‌ها در برابر آسیب استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند [۳۵]. احتمالاً، ۸ هفته تمرین MIT توانسته است میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد و اثرات مخرب استرس اکسیداتیو ناشی از متامفتمین را تعدیل کند [۱۷].

نتیجه‌گیری

عدم سنجش شاخص پروتئینی APP و آزمون‌های رفتاری ماز آبی موریس، از محدودیت‌های پژوهش حاضر بود. تزریق متامفتمین با افزایش APP، احتمالاً باعث ایجاد اختلال در حافظه و یادگیری موش‌های صحرایی می‌شود. ممکن است انجام تمرینات MIT تا حدودی توانسته باشد این شرایط را بهبود بخشد، اگرچه تحقیقات بیشتری برای دست یافتن به نتایج قطعی ضروری است.

سپاسگزاری

محققان از مسئولان مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان و تمامی کسانی که در اجرای تحقیق حاضر همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنند. طرح تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه حکیم

بدینوسیله نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تضاد منافعی با سازمان ها و اشخاص دیگر وجود ندارد.

سبزواری، با شماره IR.HSU.AEC.1401.008 ثبت شد.

تعارض منافع

References

- Uhlmann S, DeBeck K, Simo A, Kerr T, Montaner JS, Wood E. Crystal methamphetamine initiation among street-involved youth. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2014;**40**(1):31-36. DOI: 10.3109/00952990.2013.836531 PMID: 24191637
- Panenka WJ, Procyshyn RM, Lecomte T, MacEwan GW, Flynn SW, Honer WG, et al. Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug Alcohol Depend*. 2013;**129**(3):167-179. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.11.016 PMID: 23273775
- Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, Kemppainen S, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain-special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Front Neurosci*. 2019;**13**:629. DOI: 10.3389/fnins.2019.00629 PMID: 31275108
- Chen L, Zhou L, Yu P, Fang F, Jiang L, Fei J, et al. Methamphetamine exposure upregulates the amyloid precursor protein and hyperphosphorylated tau expression: The roles of insulin signaling in SH-SY5Y cell line. *J Toxicol Sci*. 2019;**44**(7):493-503. DOI: 10.2131/jts.44.493 PMID: 31270305
- Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*. 2004;**490**(1-3):71-81. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.02.045 PMID: 15094074
- Wang X, Zheng W, Xie JW, Wang T, Wang SL, Teng WP, et al. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. *Mol Neurodegener*. 2010;**5**(1):1-13. DOI: 10.1186/1750-1326-5-46 PMID: 21044348
- Shieh JC, Huang PT, Lin YF. Alzheimer's disease and diabetes: insulin signaling as the bridge linking two pathologies. *Mol Neurobiol*. 2020;**57**(4):1966-1977. DOI: 10.1007/s12035-019-01858-5 PMID: 31900863
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol*. 2015;**130**(1):1-19. DOI: 10.1007/s00401-015-1449-5 PMID: 26063233
- Jacobsen KT, Iverfeldt K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2009;**66**(14):2299-2318. DOI: 10.1007/s00018-009-0020-8 PMID: 19333550
- O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;**34**:185-204. DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613 PMID: 21456963
- Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Götz J. Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathol*. 2015;**129**(2):207-220. DOI: 10.1007/s00401-014-1371-2 PMID: 25492702
- Jung S, Kim Y, Kim M, Seo M, Kim S, Kim S, et al. Exercise pills for drug addiction: forced moderate endurance exercise inhibits methamphetamine-induced hyperactivity through the striatal glutamatergic signaling pathway in male Sprague Dawley rats. *Int J Mol Sci*. 2021;**22**(15):8203. DOI: 10.3390/ijms22158203 PMID: 34360969
- Kang EB, Cho JY. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and β -amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2014;**18**(1):89-96. DOI: 10.5717/jenb.2014.18.1.89 PMID: 25566443
- Liu H, Zhao G, Zhang H. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behav Brain Res*. 2013;**256**:261-272. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.08.008 PMID: 23968591
- Baker LD, Frank LL, Foster-Schubert K, Green PS, Wilkinson CW, McTiernan A, et al. Aerobic exercise improves cognition for older adults with glucose intolerance, a risk factor for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;**22**(2):569-579. DOI: 10.3233/JAD-2010-100768 PMID: 20847403
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 2002;**25**(6):295-301. DOI: 10.1016/s0166-2236(02)02143-4 PMID: 12086747
- Shafiei A, Haghighi AH, Askari R, Keyhani A, Nabavizadeh MS, Asadi-Shekaari M. Effects of moderate-intensity interval training on gene expression and antioxidant status in the hippocampus of methamphetamine-dependent rats. *Neurotox Res*. 2022;**40**(5):1455-1463. DOI: 10.1007/s12640-022-00532-4 PMID: 35781220
- Khalafi M, Shabkhiz F, Azali Alamdari K, Bakhtiyari A. Irisin response to two types of exercise training in type 2 diabetic male rats. *J Arak Uni Med Sci*. 2016;**19**(6):37-45.
- Habr SF, Bernardi MM, Conceição IM, Freitas TA, Felício LF. Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. *Psychol Neurosci*. 2011;**4**:115-121. DOI: 10.3922/j.psns.2011.1.013
- Shukla M, Vincent B. The multi-faceted impact of methamphetamine on Alzheimer's disease: From a triggering role to a possible therapeutic use. *Ageing Res Rev*. 2020;**60**:101062. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101062 PMID: 32304732
- Izawa JI, Yamanashi K, Asakura T, Misu Y, Goshima Y. Differential effects of methamphetamine and cocaine on behavior and extracellular levels of dopamine and 3, 4-dihydroxy-phenylalanine in the nucleus accumbens of conscious rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;**549**(1-3):84-90. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.08.031 PMID: 16979160
- Shafahi M, Vaezi G, Shajiee H, Sharafi S, Khaksari M. Effects of crocin on learning, spatial memory impairment and necrosis cells death in rats hippocampus area in methamphetamine induced neurotoxicity. *JKH*. 2019;**14**(1).
- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Cicotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*. 2009;**12**(12):1567-1576. DOI: 10.1038/nn.2433 PMID: 19935655
- Hayati M, Zarghoshi J, Dabirifar G, Yousefi M, Omid M. The effect of different training periods on beta-amyloid 42 index in hippocampus of streptozotocin-induced diabetic male rats. *SPMI*. 2021;**13**(3):127-137.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005;**25**(17):4217-4221. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0496-05.2005 PMID: 15858047
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2001;**21**(5):1628-1634. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-05-01628.2001 PMID: 11222653
- Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res*. 2007;**184**(2):124-132. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.06.027 PMID: 17698211
- Valian N, Ahmadiani A, Dargahi L. Increasing methamphetamine doses inhibit glycogen synthase kinase 3 β activity by stimulating the insulin signaling pathway in substantia nigra. *J Cell Biochem*. 2018;**119**(10):8522-8530. DOI: 10.1002/jcb.27082 PMID: 30011098
- Choi SH, Park CH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, et al. Memory impairment and cholinergic dysfunction by centrally administered A β and carboxyl-terminal fragment of

- Alzheimer's APP in mice. *FASEB J*. 2001;**15**(10):1816-1818. DOI: [10.1096/fj.00-0859fje](https://doi.org/10.1096/fj.00-0859fje) PMID: [11481240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11481240/)
30. Eskandarnejad M, Rezaei F. The effect of aerobic exercise on neural networks of attention and working memory. *J Shefaye Khatam*. 2018;**6**(2):31-40. DOI: [10.29252/shefa.6.2.31](https://doi.org/10.29252/shefa.6.2.31)
 31. He Xf, Liu DX, Zhang Q, Liang Fy, Dai Gy, Zeng JS, et al. Voluntary exercise promotes glymphatic clearance of amyloid beta and reduces the activation of astrocytes and microglia in aged mice. *Front Mol Neurosci*. 2017;**10**:144. DOI: [10.3389/fnmol.2017.00144](https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00144) PMID: [28579942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28579942/)
 32. Somkuwar SS, Staples MC, Fannon MJ, Ghofranian A, Mandyam CD. Evaluating exercise as a therapeutic intervention for methamphetamine addiction-like behavior. *Brain Plast*. 2015; **1**(1):63-81. DOI: [10.3233/BPL-150007](https://doi.org/10.3233/BPL-150007) PMID: [29765835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29765835/)
 33. Hamakawa M, Ishida A, Tamakoshi K, Shimada H, Nakashima H, Noguchi T, et al. Repeated short-term daily exercise ameliorates oxidative cerebral damage and the resultant motor dysfunction after transient ischemia in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2013;**53**(1): 8-14. DOI: [10.3164/jcbn.12-72](https://doi.org/10.3164/jcbn.12-72) PMID: [23874064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874064/)
 34. Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, et al. The effects of moderate-, strenuous-and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int*. 2005;**46**(8):635-640. DOI: [10.1016/j.neuint.2005.02.009](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.02.009) PMID: [15863241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15863241/)
 35. Camiletti-Moirón D, Aparicio V, Aranda P, Radak Z. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scand J Med Sci Sports*. 2013;**23**(4):202-212. DOI: [10.1111/sms.12065](https://doi.org/10.1111/sms.12065) PMID: [23495801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23495801/)