University of Birjand

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport Research Paper

Fall 2024, 12(31), 8-19

Received: May 21, 2023 Revised: Jun 28, 2023 Accepted: Jul 03, 2023

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport

The effect of moderate intensity continuous training on *C/EBPβ* and *mTOR* gene expression related to autophagy in the frontal cortex of methamphetamine-dependent rats

Fakhreddin Izadimanesh[1], Amir Hossein Haghighi[2*], Seyed Alireza Hosseini Kakhk[3], Majid Asadi- shekaari [4], Hamid Marefati[5]

1. Ph.D Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
2. Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
3. Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Professor at Neuroscience Research Center, Neuropharmacology Institute, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
5. Associate Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Abstract

Background and Aim: Autophagy is a protected lysosome-dependent cellular degradation process that helps maintain homeostasis and metabolic adaptation of the cell. The aim of the present study was to investigate the effect of moderate intensity continuous training on the expression of *C/EBPβ* and *mTOR* genes related to autophagy in the frontal cortex of methamphetamine-dependent rats. **Materials and Methods**: Thirty two male Wistar rats were randomly divided into four equal groups (n=8) of saline, primary methamphetamine, secondary methamphetamine, and methamphetamine-training. Methamphetamine was injected in the amount of five mg/kg for 21 days. The exhausted endurance test and the average maximum speed of the rats were calculated in order to design the training program as it included 24 minutes of running with an intensity of 60-65% of the maximum speed on the treadmill for eight weeks (five sessions per week). At the end, to evaluate gene expression changes, *C/EBPβ-mTOR* indices were extracted from the frontal cortex tissue of the rats. The results were extracted using one-way analysis of variance at a significance level of $p \leq 0.05$. **Results:** Methamphetamine injection in the primary and secondary methamphetamine groups indicated a significant increase in *C/EBPβ* gene expression compared to the saline group (p=0.001 and p=0.005, respectively), but in the group early methamphetamine showed a significant decrease in *mTOR* gene expression compared to the saline group (p=0.04). Moreover, moderate intensity continuous training in the methamphetamine-exercise group indicated a significant decrease in *C/EBPβ* gene expression compared to the primary methamphetamine group (p=0.04), but as compared to the primary and secondary methamphetamine groups showed significantly increased *mTOR* gene expression. **Conclusion**: Methamphetamine injection could probably increases the expression of *C/EBPβ* autophagic gene in the frontal cortex of the brain; while continuous exercises with moderate intensity, as a preventive strategy, can moderate and regulate autophagy caused by methamphetamine, through increasing *mTOR* gene expression in the brain.

Keywords: Continuous training, Expression of autophagy genes, Methamphetamine, Frontal cortex.

Cite this article:
Izadimanesh, F., Haghighi, A.H., Hosseini Kakhk, S.A., Asadi- shekaari, M., & Marefati, H. (2024). The effect of moderate intensity continuous training on C/EBPβ and *mTOR* gene expression related to autophagy in the frontal cortex of methamphetamine-dependent rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 12***(31), 8-19.**

*** Corresponding Author, Address: Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran;**
E mail: ah.haghighi@hsu.ac.ir

https://doi.org/10.22077/jpsbs.2024.6397.1795

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee **Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport (JPSBS)**. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

نشریه مطالعات کاربردی علوم‌زیستی در ورزش مقاله پژوهشی
پاییز ۱۴۰۳، دوره ۱۲، شماره ۳۱، ص ۱۹-۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۲
نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش
دانشگاه بیرجند

تأثیر تمرین تداومی با شدت متوسط بر بیان ژن‌های *C/EBPβ* و *mTOR* مرتبط با اتوفاژی در قشر پیشانی موش‌های صحرایی وابسته به HTME

فخرالدین ایزدی منش[۱]، امیرحسین حقیقی[۲*]، سید علیرضا حسینی کاخک[۳]، مجید اسدی شکاری[۴]، حمید معرفتی[۵]

۱. دانشجوی دکتری 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 گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴. استاد مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نورو فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
۵. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اتوفاژی، یک فرآیند تخریب وابسته به لیزوزوم حفاظت شده است که به حفظ هموستاز و سازگاری متابولیکی سلول کمک می‌کند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تمرین تداومی با شدت متوسط بر بیان ژن‌های *C/EBPβ* و *mTOR* مرتبط با اتوفاژی، در قشر پیشانی موش‌های صحرایی وابسته به HTME بود. **روش تحقیق:** تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، به طور تصادفی به چهار گروه مساوی (n=۸) سالین، HTME اولیه، HTME ثانویه، و HTME - تمرین تقسیم شدند. HTME به مقدار پنج میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۲۱ روز تزریق شد. آزمون وامانده ساز و میانگین سرعت بیشینه موش‌ها برای طراحی برنامه تمرین محاسبه و برنامه تمرین شامل ۲۴ دقیقه دویدن با شدت ۶۰-۶۵ درصد سرعت بیشینه بر روی نوارگردان، به مدت هشت هفته (پنج جلسه در هفته) انجام شد. در پایان، برای ارزیابی تغییرات بیان ژنی شاخص‌های *mTOR* و *C/EBPβ*، بافت قشر پیشانی موش‌های صحرایی استخراج شد. نتایج با استفاده از روش تحلیل واریانس یک راهه در سطح معنی داری $p\leq ۰/۰۵$ استخراج گردید. **یافته ها:** تزریق مت آمفتامین در گروه‌های مت آمفتامین اولیه و ثانویه، منجر به افزایش معنی دار بیان ژن *C/EBPβ* نسبت به گروه سالین شد (به ترتیب با $p=۰/۰۰۱$ و $p=۰/۰۰۵$)؛ اما در گروه مت آمفتامین اولیه نسبت به گروه سالین، منجر به کاهش معنی دار بیان ژن *mTOR* شد ($p=۰/۰۴$). تمرینات تداومی با شدت متوسط در گروه مت آمفتامین-تمرین، منجر به کاهش معنی دار بیان ژن *C/EBPβ* نسبت به گروه HTME اولیه شد ($p=۰/۰۴$)؛ اما نسبت به گروه‌های HTME اولیه و ثانویه، موجب افزایش معنی دار بیان ژن *mTOR* گردید. **نتیجه‌گیری:** احتمالاً تزریق مت آمفتامین باعث تشدید بیان ژن اتوفاژیک *C/EBPβ* در قشر پیشانی مغز می‌شود؛ در حالی که تمرینات تداومی با شدت متوسط، می‌تواند به عنوان یک راهکار پیشگیرانه، باعث تعدیل و تنظیم اتوفاژی ناشی از مت آمفتامین، از طریق افزایش بیان ژن *mTOR* در مغز شود.

واژه های کلیدی: تمرین تداومی، بیان ژن‌های اتوفاژی، مت آمفتامین، قشر پیشانی.

* نویسنده مسئول، آدرس: سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی؛
ایمیل: ah.haghighi@hsu.ac.ir
https://doi.org/10.22077/jpsbs.2024.6397.1795

مقدمه

مت آمفتامین[1] (METH) یک داروی غیرقانونی بسیار اعتیاد آور است که به طورگسترده‌ای، مورد سوء مصرف قرار می‌گیرد (کاروالهو[2] و دیگران، ۲۰۱۲). این ماده به عنوان یک محرک روانی– حرکتی، با نتایج فیزیولوژیکی قوی در سیستم عصبی محیطی و مرکزی شناخته شده که منجر به اختلالات جسمی و روانی می‌شود (گونزالز[3] و دیگران، ۲۰۱۰). سوء مصرف این ماده با آپوپتوزیس، استرس اکسیداتیو و سمیت عصبی ناشی از METH همراه است و باعث مسمومیت عصبی در مناطق مختلف مغز می‌شود (دِنگ[4] و دیگران، ۲۰۰۱). چندین مطالعه از بروز مسمومیت تحریکی (ترشح بیش از حد گلوتامات)، افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، تولید رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکساید، فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزیسی، تجزیه پروتئین‌های اسکلتی و آسیب DNA، بر اثر مسمومیت با METH؛ پشتیبانی کرده‌اند (یاماموتو[5] و دیگران، ۲۰۱۰). یکی از مکانیسم‌های مسمومیت ناشی از METH، استرس اکسیداتیو است. متابولیت‌های اکسیداتیو مشتق شده از METH، سیگنال‌های مختلفی را در سلول‌ها فعال می‌کنند که به مرگ سلول از طریق آپوپتوزیس منتهی می شود. در طی این فرآیند، METH باعث اختلال در سیستم یوبی کوئیتین-پروتئازوم[6] می‌شود و یک فعال‌سازی مشخص از اتوفاژی[7] را ایجاد می‌کند (پاسکوالی[8] و دیگران، ۲۰۰۸).

اتوفاژی یک مسیر کاتابولیک بسیار محافظتی و تنظیمی است که برای حفظ هموستاز انرژی سلول و تنظیم رشد سلول، بسیار مهم است. این مکانیزم، به عنوان یک مکانیزم رایج فیزیولوژیکی شناخته شده است که ممکن است به عنوان ابزاری برای بقا در کوتاه مدت عمل کند و در اثر گرسنگی (محرومیت از مواد مغذی اسید آمینه) هیپوکسی و استرس متابولیکی ایجاد نماید (آن[9] و دیگران، ۲۰۱۴؛ جانسن و لامارک[10]، ۲۰۱۱). مشخصه اصلی فرآیند اتوفاژی، جداسازی[11] محتوای سیتوپلاسمی از طریق تشکیل وزیکول‌های غشای دوگانه[12] است که با واسطه مجموعه‌ای از پروتئین‌های مربوط به اتوفاژی حفظ می‌شود (روح بخش و دیگران ۲۰۱۶). پروتئین‌های اتصالی تقویت کننده CCAAT[13] (C/EBP)، یک خانواده از فاکتورهای رونویسی طبقه زیپ لوسین پایه[14] (bZIP)) هستند که شش عضو از آن در پستانداران شناسایی شده‌اند؛ مانند *C/EBPβ*. با تنظیم رونویسی از مجموعه‌های خاص ژن‌ها، *C/EBPβ* با یک روش خاص سلولی، در برنامه‌های سلولی مانند تمایز، تکثیر، مرگ و بقای سلول، و متابولیسم انرژی شرکت می‌کند (نرلو[15] و دیگران، ۲۰۰۷؛ رامجی[16] و دیگران، ۲۰۰۲؛ اسکریم[17] و دیگران، ۲۰۰۴).

تعدادی از مطالعات، درگیری *C/EBPβ* در مرگ عصبی را بررسی کرده‌اند (ژو[18] و دیگران، ۲۰۱۸). در مطالعه‌ای، ژو و دیگران (۲۰۱۸) دریافته اند که *C/EBPβ* با مهار اتوفاژی و آپوپتوزیس ناشی از METH، از میزان سمیت عصبی ناشی از METH می‌کاهد. مطالعات اخیر گزارش داده‌اند که مهار *C/EBPβ* توسط RNA تداخل کننده[19] (RNAi) یا الیگونوکلئوتیدهای ضد حس، باعث کاهش مرگ عصبی ناشی از محرومیت از عامل رشد یا قرارگرفتن در معرض اِن متیل دی آسپارتات[20] (*NMDA*) در سلول‌های گرانولی مخچه موش می‌شود، روندی که نشان می‌دهد *C/EBPβ* در برنامه‌های مرگ عصبی شرکت می‌کند (بریفالت[21] و دیگران، ۲۰۱۵؛ پن[22] و دیگران، ۲۰۱۳). از طرف دیگر، نشان داده شده که فعال شدن مسیر پیام دهی *mTOR* می‌تواند آپوپتوزیس سلول توموری را کاهش دهد و مهار فعالیت *mTOR* با افزایش تشکیل اتوفاگوزوم ها، باعث ایجاد اتوفاژی می‌گردد (راویکومار[23] و دیگران، ۲۰۱۰). مطالعات قبلی نشان داده اند که METH، قادر به ایجاد اتوفاژی در سیستم دوپامینرژیک[24] است. به خوبی مشخص شده است که *mTOR* سیگنال‌های خارج سلولی را برای تنظیم تکثیر و رشد سلول ادغام می‌کند (بای و جیانگ[25]، ۲۰۱۰). طبق مطالعات قبلی، *mTOR* یک هدف مهم در اتوفاژی ناشی از METH است (لی[26] و دیگران، ۲۰۱۲). در این مطالعات، نشان داده شد که قرار گرفتن در معرض METH باعث کاهش

1. Methamphetamine
2. Carvalho
3. Gonzales
4. Deng
5. Yamamoto
6. Ubiquitin–Proteasome system
7. Autophagy
8. Pasqali
9. An
10. Johansen & Lamark
11. Sequestration
12. Double-membrane vesicles
13. CCAAT-enhancer binding proteins
14. Basic-leucine zipper
15. Nerlov
16. Ramji & Foka
17. Schrem
18. Xu
19. RNA interference
20. N-Methyl-D-Aspartate
21. Brifault
22. Pan
23. Ravikumar
24. Dopaminergic system
25. Bai & Jiang
26. Li

mTOR فسفریله می‌شود. نتایج یک مطالعه دیگر نشان داده که قرارگرفتن در معرض METH، باعث کاهش *mTOR* فسفریله و افزایش بیان نشانگرهای اتوفاژی *Beclin-1* و *LC3-II* می‌شود (ژو و دیگران، ۲۰۱۷). هوانگ[1] و دیگران (۲۰۱۹)، در مورد مکانیسم مولکولی *C/EBPβ* این گونه عنوان کرده‌اند که *C/EBPβ* در اتوفاژی ناشی از METH از طریق محور پیام دهی *C/EBPβ /DDIT4/ TSC2/ mTOR* عمل می‌کند و دخالت آن در آپوپتوزیس ناشی از METH از طریق مسیر سیگنال‌دهی آپوپتوزیس میتوکندریایی مرتبط با *Trib3 /Parkin /α-syn*، در هر نورون دوپامینرژیک موش صحرائی، اتفاق می‌افتد.

فعالیت ورزشی دارای فواید بی‌شماری برای سلامتی است که می‌توان به افزایش طول عمر، محافظت در برابر بیماری‌های قلبی - عروقی، دیابت، سرطان و بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی اشاره کرد. بسیاری از مزایای سلامتی مربوط به انجام فعالیت‌های ورزشی، با عملکردهای شناخته شده محافظتی مسیر سلولی اتوفاژی، هم پوشانی دارند (میزوشیما[2] و دیگران، ۲۰۰۸؛ لوین و کرومر[3]، ۲۰۰۸). از این رو، می‌توان گفت که برخی از مزایای سلامتی ورزش ممکن است به دلیل فعال‌شدن اتوفاژی باشد (هی[4] و دیگران، ۲۰۱۲). در مطالعه ای که توسط لوید[5] و دیگران (۲۰۱۷) بر روی موش ها انجام شده است، دویدن داوطلبانه، افزایش بیشتر میزان *p-mTOR*، هم در نورون‌ها و هم در گلیای قشر جلو پیشانی، جسم مخطط، هیپوکامپ، هیپوتالاموس و آمیگدال را در مقایسه با دویدن اجباری؛ در پی داشته است. این نتایج همچنین نشان داد که سیگنال‌دهی *mTOR* به ورزش حساس است و افزایش این سیگنال‌دهی، می‌تواند به اثرات مفید ورزش بر عملکرد شناختی، حرکتی و سلامت روان کمک کند. در مطالعه ای شفیعی و دیگران (۲۰۲۲)، ضمن بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت متوسط بر بیان ژن و وضعیت آنتی اکسیدانی هیپوکامپ موش‌های صحرایی وابسته به METH، افزایش معنی دار حافظه فضایی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را گزارش کرده اند. یکی از مناطق مهم حرکتی در مغز، قشر پیشانی است که جزو مسیر مزوکورتیکال در سیستم دوپامینرژیک مغز می‌باشد. با توجه به اینکه بین دوپامین و تمام رفتارها شامل فعالیت حرکتی، رابطه وجود دارد و فعالیت‌بدنی مستلزم ترکیب و انتشار دوپامین در گره‌های پایه[6] است؛ این مسیر که در قشر پیشانی مغز قرار دارد، می‌تواند هم در انجام فعالیت‌بدنی و هم در برخی از ویژگی‌های مربوط به ایجاد اعتیاد، دخیل باشد (اِبیسن و بِرِکت[7]، ۲۰۱۷). با توجه به موارد ذکر شده، هم METH و هم فعالیت ورزشی، می‌توانند باعث القاء اتوفاژی در مغز شوند، با این تفاوت که اتوفاژی دارای عملکردی دوگانه است. یعنی از یک طرف باعث افزایش مدت و میزان بقای سلول؛ و از طرف دیگر و در مراحل پیشرفته، موجب مرگ سلول می‌شود (شرز و الازار[8]، ۲۰۰۷). اتوفاژی یک فرآیند ضروری برای عملکرد طبیعی بافت‌ها می‌باشد و در صورت تنظیم، می‌تواند از طریق تخریب پروتئین‌های دناتوره شده[9] و تولید اسیدهای آمینه در سلول، زمینه اصلی رشد و بقای سلول را فراهم کند (جوکار و شرافتی مقدم، ۲۰۱۹). با توجه به نتایج مطالعات انجام شده، METH باعث ایجاد اتوفاژی با اثرات منفی (ایجاد سمیت عصبی و در نهایت، از بین بردن سلول های عصبی) می‌شود؛ اما تمرینات ورزشی می‌توانند نقش کلیدی در تنظیم پروتئین‌های درگیر در مسیر اتوفاژی داشته باشند و تنظیم اتوفاژی از این طریق، می‌تواند عامل مؤثری در سازوکارهای سلولی و مولکولی باشد (جوکار و شرافتی مقدم، ۲۰۱۹؛ آقا علی نژاد و هاشمی جوکار، ۲۰۱۹).

به طور کلی مشخص نیست که METH و تمرینات استقامتی، اتوفاژی را در قشر پیشانی مغز افزایش می دهند یا کاهش؟ و این که تأثیر هر کدام از آن ها بر بیان ژن‌های *C/EBPβ* و *mTOR* مربوط به اتوفاژی چگونه است؟ بر این اساس، هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین تداومی با شدت متوسط، بر بیان ژن‌های *C/EBPβ* و *mTOR* مرتبط با اتوفاژی در قشر پیشانی موش‌های صحرایی وابسته به METH بود.

روش تحقیق

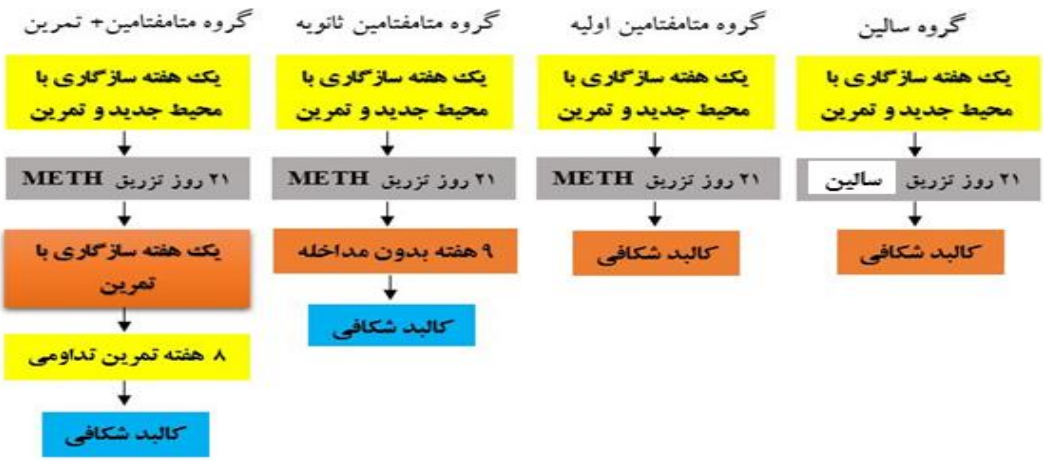
روش تحقیق حاضر از نوع تجربی است. طرح مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه حکیم سبزواری با شناسه IR.HSU.AEC.1401.010 مصوب و اجرا گردید. از میان موش‌های

1. Huang
2. Mizushima
3. Levine & Kroemer
4. He
5. Lloyd
6. Base nodes
7. Ebbesen & Brecht
8. Scherz & Elazar
9. Denaturated

صحرایی نر نژاد ویستار بالغ، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی هفت الی هشت هفته‌ای، با وزن ۲۰۰ تا ۲۳۰ گرم؛ به عنوان نمونه آماری، از مزرعه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شدند. به منظور جلوگیری از تداخل گروه‌ها، در مدت اجرای مداخله تمرینی و کالبدشکافی، قفس های مجزایی با دسترسی آزاد به آب و بسته‌های غذایی، در نظر گرفته شد و در هر قفس، تعداد چهار سر موش، طبق چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری، نگه‌داری شدند. سپس موش‌ها به طور تصادفی به چهار گروه سالین، METH اولیه، METH ثانویه، و METH + تمرین، تقسیم شدند. در ادامه، به مدت ۲۱ روز، روزانه ۵ میلی گرم METH (خلوص کمتر از ۹۶ درصد) حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین فیزیولوژیک (کلرید سدیم ۰/۹ درصد)، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی، به شکل زیر جلدی به حیوانات تزریق شد (عبداله و دیگران، ۲۰۲۰). در این مدت به طور همزمان، هر روز نیم میلی‌لیتر محلول سالین فیزیولوژیک به موش‌های صحرایی گروه سالین تزریق گردید. گروه METH اولیه بعد از ۲۱ روز تزریق، همراه با گروه سالین کشته شدند و برای مقایسه با گروه سالین مورد استفاده قرار گرفتند تا مشخص شود بعد از تزریق، اعتیاد صورت گرفته است یا خیر؟ اما گروه METH ثانویه، بعد از ۲۱ روز تزریق باقی ماندند تا در پایان دوره تمرینی، با گروه تمرین+ METH، مقایسه شوند تا مشخص گردد که آیا تمرین اثر گذار بوده است یا نه؛ و اثر زمان هم مورد بررسی قرار گیرد.

ابتدا آزمون ارزیابی حداکثر سرعت برای برآورد سرعت بیشینه انجام شد. بدین منظور، ابتدا پنج دقیقه گرم کردن به صورت خیلی آهسته صورت گرفت که تقریباً معادل با سرعت هشت متر در دقیقه بر روی نوارگردان است، بعد از گرم کردن، آزمون ورزشی فزآینده تا مرز خستگی انجام گردید؛ بدین صورت که با سرعت ۱۰ متر در دقیقه فعالیت شروع شد و به ازای هر دو دقیقه، سه متر بر دقیقه بر سرعت آن افزوده شد تا موش‌ها، دیگر قادر به دویدن نباشند (خلفی و دیگران، ۲۰۱۶). سپس بر مبنای میانگین سرعت بیشینه موش‌های صحرایی، برنامه تمرین طراحی گردید.

پروتکل تمرین تداومی با شدت متوسط در این پژوهش، به مدت هشت هفته و تکرار پنج روز در هفته، بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان به اجرا درآمد. مدت تمرین در هر جلسه ۳۶ دقیقه بود که شامل شش دقیقه گرم‌کردن با شدت ۲۰ درصد سرعت بیشینه، شش دقیقه سردکردن با شدت ۲۰ درصد سرعت بیشینه، و ۲۴ دقیقه برنامه اصلی تمرین تداومی با شدت ۶۰ تا ۶۵ درصد سرعت بیشینه بود. شیب نوارگردان در طول تمامی مراحل تمرین، روی صفر درجه تنظیم گردید. شکل (دیاگرام) یک مراحل مداخلات صورت گرفته را نشان می دهد.



شکل ۱. نمایش شماتیک اجرای مداخلات صورت گرفته در مطالعه حاضر

بعد از ۲۱ روز تزریق METH و محلول سالین فیزیولوژیک، موش‌های صحرایی دو گروه سالین و METH اولیه، توزین گردیدند و از طریق گاز CO_2 بی‌هوش و سپس، کشته شدند. در پایان مطالعه، ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی دو گروه METH ثانویه و METH+تمرین نیز، پس از توزین، از طریق گاز CO_2 بی‌هوش و کشته شدند (بویین[1] و دیگران، ۲۰۱۷). بلافاصله بعد، کالبد شکافی صورت گرفت و بافت قشر پیشانی مغز به دقت برداشته شد و پس از شستشو با آب مقطر؛ جداسازی گردید. نیمی از بافت قشری مغز جهت انجام آزمایش‌های سلولی و مولکولی در میکروتیوب گذاشته شد و در نیتروژن مایع، منجمد گردید و سپس، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، برای بررسی میزان بیان ژن یا mRNA، فریز شد.

بیان هریک از ژن‌های مورد نظر در زمان تحلیل، با استفاده از پرایمرهای Reverse و Forward شرکت سیناکلون (Sinaclon) تعیین شد. استخراج RNA براساس دستورالعمل کیت استخراج RNA، سفارش و ساخت شرکت یکتا تجهیز ایران، با استفاده از محلول‌های کیت استخراج شد و پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده صورت گرفت. برای سنجش RNA استخراج شده، از دستگاه بایوفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۹۲ بود که نشانگر کارایی مناسب RNA می‌باشد. پس از بهینه‌سازی واکنش، cDNA مربوط به گروه‌های مورد آزمایش، مطابق جدول زمانی، تحت واکنش Real-Time PCR قرار گرفت. Ct مربوط به واکنش‌ها، از طریق نرم افزار دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی استخراج گردید و در نهایت، Ct mean سه مرتبه ثبت شد. برای کمّی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ بهره بهره‌داری گردید. به منظور بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR، تمام پرایمرها توسط نرم‌افزار Allele IDv طراحی شدند و از ژن B2M[2] به عنوان کنترل داخلی، استفاده گردید. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه ΔΔCt، میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به Gapdh و حالت کنترل (NTC) که فاقد محیط‌های تمایزی است، سنجیده شد و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$، میزان بیان آن محاسبه گردید.

بخش اول روش‌های آماری مربوط به توصیف ویژگی‌های آزمودنی‌ها و داده‌های خام پژوهش بود که از طریق آمار توصیفی انجام گردید، پس از آن، فرضیه های پژوهش با کمک آمار استنباطی در سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ بررسی شدند. برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها، از آزمون شاپیرو – ویلک[3] استفاده شد. سپس برای مقایسه بین گروهی متغیرهای مورد نظر، از آزمون تحلیل واریانس یک راهه[4] بهره برداری گردید. در ادامه، آزمون تعقیبی توکی[5] برای مقایسه زوجی بین گروه‌ها، بکار گرفته شد. کلیه محاسبات آماری و رسم نمودارها، از طریق نرم‌افزار آماری GraphPad Prism ویرایش ۹ انجام شد.

یافته ها

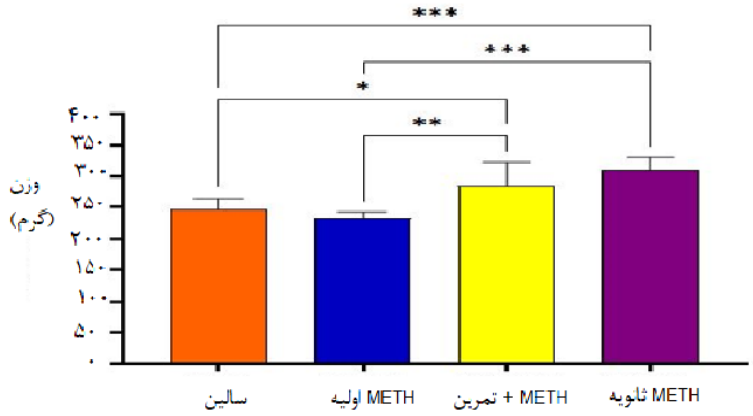
میانگین و انحراف استاندارد وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف، در جدول یک و تغییرات وزنی موش ها در شکل دو، توصیف شده است.

جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد وزن موش های صحرایی در گروه های مختلف

گروه ها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)
کنترل سالین	۲۱۱/۱±۱۱/۴۸	۲۴۷/۳±۱۸/۱۸
METH اولیه	۲۱۶/۱±۱۲/۹۴	۲۳۲/۹±۹/۹۴
METH + تمرین تداومی	۲۱۳/۶±۱۰/۱۵	۲۸۵/۴±۱۶/۹۱
METH ثانویه	۲۱۰/۵±۹/۳۶	۳۰۹/۳±۲۰/۷۹

بر اساس نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی؛ تزریق METH در گروه METH اولیه و METH ثانویه نسبت به گروه سالین، منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن *C/EBPβ* شد (به ترتیب با p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۰۵)؛ اما میزان بیان ژن *C/EBPβ* در گروه METH+ تمرین نسبت به گروه سالین (پس از تزریق METH)، تغییر معنی داری نداشت (p=۰/۳۹). به علاوه، تمرین تداومی با شدت متوسط درگروه METH + تمرین نسبت به گروه METH

1. Boivin
2. Beta 2 Microglobulin
3. Shapiro-Wilk
4. One way - ANOVA
5. Tukey

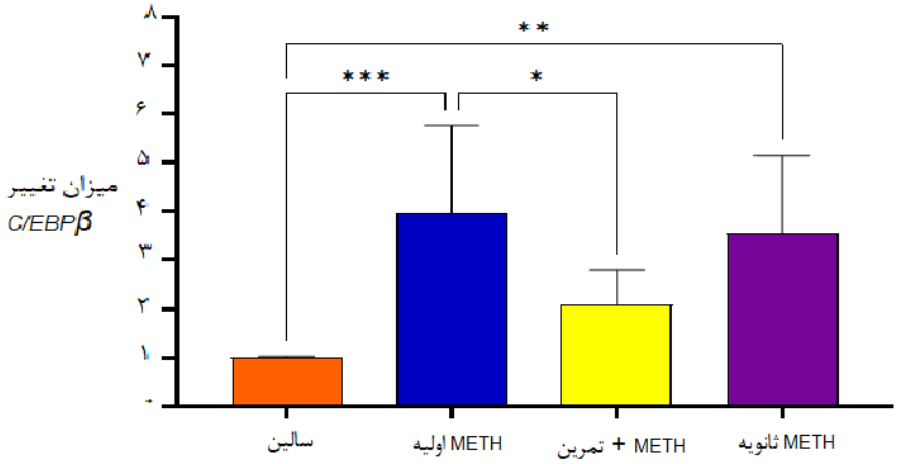


شکل ۲. تغییرات وزن موش‌های صحرائی در گروه‌های مختلف.* نشانه اختلاف معنی دار گروه سالین با گروه METH + تمرین؛ ** نشانه اختلاف معنی دار گروه METH اولیه با گروه METH+ تمرین؛ *** نشانه اختلاف معنی دار گروه METH ثانویه با METH اولیه و سالین؛ سطح معنی داری ۰/۰۵>p.

اولیه، منجر به کاهش معنی دار بیان ژن *C/EBPβ* شد (۰/۰۴=p)؛ اما بیان این ژن بین گروه METH اولیه و METH ثانویه (پس از تمرین تداومی با شدت متوسط)، تفاوت معنی داری نداشت (۰/۹۲=p). با این حال، اختلاف معنی داری در بیان ژن *C/EBPβ*، بین گروه METH+ تمرین با گروه METH ثانویه وجود نداشت (۰/۱۵=p) (شکل سه و جدول دو).

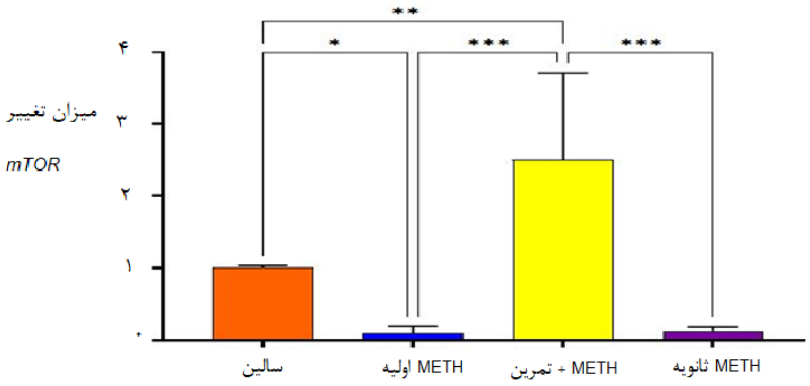
جدول ۲. مقایسه بیان ژن ***C/EBPβ*** و ***mTOR*** در گروه های مختلف موش های صحرایی

گروه ها		ارزش p برای متغیر *C/EBPβ*	ارزش p برای متغیر *mTOR*
گروه کنترل سالین	گروه METH اولیه	p=۰/۰۰۱	p=۰/۰۴
	گروه METH+تمرین	p=۰/۳۹	p=۰/۰۰۱
	گروه METH ثانویه	p=۰/۰۰۵	p=۰/۰۵
گروه METH اولیه	گروه METH+تمرین	p=۰/۰۴	p=۰/۰۰۱
	گروه METH ثانویه	p=۰/۹۲	p=۰/۹۹
گروه METH +تمرین تداومی	گروه METH ثانویه	p=۰/۱۵	p=۰/۰۰۱



شکل ۳. تغییرات شاخص ژنی ***C/EBPβ*** قشر پیشانی موش‌های صحرائی درگروه‌های مختلف.* نشانه اختلاف معنی دار گروه METH اولیه با گروه METH + تمرین در سطح ۰/۰۴=p؛ ** نشانه اختلاف معنی دار گروه METH ثانویه با گروه سالین در سطح ۰/۰۰۵=p و ***نشانه اختلاف معنی دار گروه METH اولیه با گروه سالین در سطح ۰/۰۰۱=p.

بر اساس نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی؛ تزریق METH در گروه METH اولیه نسبت به گروه کنترل سالین منجر به کاهش بیان ژن *mTOR* شده است (p=۰/۰۴)؛ اما این اختلاف در گروه METH ثانویه با گروه سالین از لحاظ آماری معنی دار نبود (p=۰/۰۵). از طرفی، میزان بیان ژن *mTOR* در گروه METH+ تمرین نسبت به گروه سالین افزایش داشت و از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۶). همچنین نتایج مشخص کرد که تمرین تداومی با شدت متوسط در گروه METH + تمرین نسبت به گروه HTME اولیه، منجر به افزایش بیان ژن *mTOR* شده است که این اختلافات از لحاظ آماری معنی دار بود (p=۰/۰۰۱)؛ اما میزان بیان ژن *mTOR* بین گروه METH اولیه و گروه METH ثانویه، تفاوت معنی داری نداشت (p=۰/۹۹). همچنین اختلاف معنی‌داری در کاهش بیان ژن *mTOR*، پس از تمرین تداومی با شدت متوسط، بین گروه METH +تمرین با گروه METH ثانویه وجود داشت (p=۰/۰۰۱) (شکل چهار و جدول دو).



شکل ۴. تغییرات بیان ژنی *mTOR* قشر پیشانی موش‌های صحرائی درگروه‌های مختلف.* نشانه اختلاف معنی دار گروه METH اولیه با گروه سالین در سطح p=۰/۰۴؛ ** نشانه اختلاف معنی دار گروه METH + تمرین با گروه سالین در سطح p=۰/۰۰۶ و*** نشانه اختلاف معنی دار گروه METH ثانویه و اولیه با گروه METH + تمرین در سطح p=۰/۰۰۱.

بحث

طبق یافته‌های تحقیق حاضر، تزریق METH موجب افزایش معنی دار بیان ژن *C/EBPβ* و کاهش معنی دار بیان ژن *mTOR* در موش های صحرایی گردید. از طرف دیگر، تمرین تداومی با شدت متوسط، کاهش معنی دار بیان ژن C/EBP*β* و افزایش معنی دار بیان ژن *mTOR* را در پی داشت. نتایج حاصل از مطالعات مختلف نشان داده است که تمرینات ورزشی می‌توانند نقش کلیدی در تنظیم پروتئین‌های درگیر در مسیر اتوفاژی داشته باشند و تنظیم اتوفاژی توسط تمرینات ورزشی، می‌تواند عامل مؤثری در سازوکارهای سلولی و مولکولی باشد (جوکار و شرافتی مقدم، ۲۰۱۹؛ آقا علی نژاد و هاشمی جوکار، ۲۰۱۹). اتوفاژی یک فرآیند ضروری برای عملکرد طبیعی بافت‌ها می‌باشد و در صورت تنظیم، می‌تواند از طریق تخریب پروتئین‌های دناتوره شده و تولید اسیدهای آمینه در سلول، زمینه اصلی رشد و بقای سلول را فراهم کند (جوکار و شرافتی مقدم، ۲۰۱۹). قشر پیشانی، یکی از بخش‌های مهم حرکتی در مغز می‌باشد که می‌تواند هم در انجام فعالیت بدنی و هم در برخی از ویژگی‌های مربوط به اعتیاد، دخیل باشد؛ ضمن آن که این بخش از مغز، تفکر و آگاهی از محرک‌های حسی و کنترل ارادی حرکات را امکان‌پذیر می‌سازد (اِبیسن و بِرکت، ۲۰۱۷).

هوانگ[1] و دیگران (۲۰۱۹)، در مورد مکانیسم مولکولی *C/EBPβ* این گونه عنوان کرده اند که *C/EBPβ* در اتوفاژی ناشی از METH ازطریق محور پیام دهی */DDIT4/C/EBPβ* *TSC2/ mTOR* عمل می‌کند و دخالت آن در آپوپتوزیس ناشی از METH، از طریق مسیر سیگنال‌دهی آپوپتوزیس میتوکندریایی مرتبط با *Trib3/ Parkin/ α-syn* در هر نورون دوپامینرژیک موش صحرائی اتفاق می‌افتد. نتایج این پژوهش در مورد اتوفاژی، با نتایج تحقیق حاضر همسو است. در مطالعه‌ای که ژو و دیگران (۲۰۱۸) انجام دادند، فعال شدن مسیر پیام دهی مربوط به *C/EBPβ* در اتوفاژی و آپوپتوزیس سلول‌های عصبی، پس از قرارگرفتن در معرض METH، مورد بررسی قرار گرفت و پس از تجزیه و تحلیل

1. Huang

داده‌ها، نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض دوزهای نسبتاً زیاد METH، بیان پروتئین *C/EBPβ* را افزایش می‌دهد، تغییری که با افزایش آپوپتوزیس عصبی و اتوفاژی همراه است. نتایج مطالعه فوق نشان داد که *C/EBPβ* به عنوان یک تنظیم کننده اصلی در اتوفاژی ناشی از METH از طریق مسیر پیام دهی *mTOR* می‌باشد. نتایج این تحقیق همسو با تحقیق حاضر است، اما آنها میزان پروتئین C/EBPβ را مورد بررسی قرار داده اند و یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر، عدم سنجش این شاخص پروتئینی است. متاسفانه تحقیق مشابهی در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر شاخص مورد نظر مشاهده نشد؛ با این حال، به نظر می‌رسد که تمرینات تداومی با شدت متوسط، توانست با کاهش بیان ژن *C/EBPβ* در قشر پیشانی مغز، باعث تنظیم اتوفاژی و مهار آپوپتوزیس ناشی از METH بشود.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که METH قادر به ایجاد اتوفاژی در سیستم دوپامینرژیک است. به خوبی شناخته شده است که *mTOR* سیگنال‌های خارج سلولی را برای تنظیم تکثیر و رشد سلول ادغام می‌کند (بای و جیانگ، ۲۰۱۰). طبق مطالعات قبلی، *mTOR* یک هدف مهم در اتوفاژی ناشی از METH است (لی و دیگران، ۲۰۱۲). در این مطالعه، نشان داده شد که قرار گرفتن در معرض METH، باعث کاهش *mTOR* فسفریله می‌شود. نتایج یک مطالعه دیگر نشان داده است که قرارگرفتن در معرض METH، باعث کاهش *mTOR* فسفریله و افزایش بیان نشانگرهای اتوفاژی *Beclin-1* و *LC3-II* می‌شود (ژو و دیگران، ۲۰۱۷). لوید و دیگران (۲۰۱۷) مطالعه‌ای را به منظور بررسی تأثیر ورزش بر پیام دهی *mTOR* در مناطق درگیر در شناخت و رفتار عاطفی، در مغز موش‌های صحرایی نر انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ورزش ارادی و اجباری، باعث افزایش *p-mTOR* در هیپوتالاموس، گلیا در جسم مخطط، هیپوکامپ، و آمیگدال شده و ورزش ارادی حداقل اثرات را بر پیام دهی *mTOR* در قشر پیشانی دارد. در مطالعه دیگری، مارکوس-آلکزو[1] و دیگران (۲۰۱۵) تأثیر فعالیت ورزشی را بر نشانگرهای اتوفاژی، دینامیکی، آپوپتوزیسی و همین‌طور، انرژی زیستی میتوکندریایی در مخچه و قشر مغز موش‌های صحرایی نر؛ مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها مطالعه نشان داد که در هر دو گروه فعالیت ورزشی، عملکرد میتوکندری قشر مغز و مخچه بهبود یافته و نشانگرهای مربوط به استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس؛ کاهش پیدا می کند. از طرفی، بیان پروتئین‌های درگیر در بایوژنزیس میتوکندری و اتوفاژی افزایش یافت؛ فقط در گروه تمرین استقامتی این نتایج معنی دار بود. نشان داده شده است که ورزش استقامتی بر روی نوارگردان، باعث تنظیم افزایشی فسفوریلاسیون پروتئین mTOR در هیپوکامپ مغز موش‌های نر می‌شود (جانگ[2]، ۲۰۲۰). *mTOR* یک هدف مهم در اتوفاژی ناشی از METH است (لی و دیگران، ۲۰۱۲) و با توجه به این که در مطالعه حاضر، ژن‌های *C/EBPβ* و *mTOR* مرتبط با اتوفاژی ناشی از METH در نظر گرفته شده است؛ به نظر می‌رسد که هشت هفته سازگاری با تمرینات تداومی با شدت متوسط، می‌تواند بیان ژن *C/EBPβ* را کاهش دهد؛ تغییری که در نهایت، منجر به افزایش بیان *mTOR* شده و به موجب آن، روند اتوفاژی در داخل نورون‌ها کاهش یافته و احتمالاً اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از METH تعدیل می شود. در این صورت، احتمالاً میزان دفاع آنتی‌اکسیدانی هم بهبود پیدا می‌کند؛ اما یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر، عدم سنجش شاخص‌ها و آنزیم های آنتی اکسیدانی می‌باشد.

نتیجه گیری: براساس یافته‌های این مطالعه می‌توان اظهار داشت که تزریق METH باعث تشدید بیان ژن اتوفاژیک *C/EBPβ* در قشر پیشانی مغز می‌شود؛ از طرفی، تمرینات تداومی با شدت متوسط می‌تواند به‌عنوان یک راهکار پیشگیرانه یا درمانی، باعث تعدیل و تنظیم اتوفاژی ناشی از METH از طریق افزایش بیان ژن *mTOR* در مغز شود. با این حال، نتایج این مطالعه به تنهایی نمی‌تواند مکانیسم اثر ورزش بر اعتیاد به METH را به طور کامل توضیح دهد؛ و تحقیقات بیشتری برای دست یافتن به نتایج قطعی ضروری است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافعی در مقاله حاضر وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

پژوهشگران بدین‌وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از مسئولان محترم مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان و کسانی که ما را در اجرای پروتکل تحقیق یاری کردند، اعلام می‌دارند.

1. Marques-Alexo
2. Jang

منابع

Abdullah, C.S., Aishwarya, R., Alam, S., Morshed, M., Remex, N.S., Nitu, S., … & Bhuiyan. M.D.S. (2020). Methamphetamine induces cardiomyopathy by Sigmar1 inhibition-dependent impairment of mitochondrial dynamics and function. *Communications Biology, 3*(682), 1-20. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01408-z

Agha-Alinejad, H., & Hashemi Jokar, E. (2019). Effect of six weeks of interval exercise training along with selenium nanoparticle ingestion on bcl-2 and lc3 genes expression in the tumor tissue of breast tumor bearing mice. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease, 12*(2), 26-37. [In Persian]. https://doi.org/10.30699/acadpub.ijbd.12.2.26

An, Z., Tassa, A., Thomas, C., Zhong, R., Xiao, G., Fotedar, R., Tu, B.P., ... & Levine B. (2014). Autophagy is required for G(1)/G(0) quiescence in response to nitrogen starvation in Saccharomyces cerevisiae. *Autophagy, 10*, 1702-1711. https://doi.org/10.4161/auto.32122

Bai, X., & Jiang, Y. (2010). Key factors in mTOR regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(2), 239–253. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0163-7

Boivin, J.R., Piekarski, D.J., Wahlberg, J.K., & Wilbrecht, L. (2017). Age, sex, and gonadal hormones differently influence anxiety-and depression-related behavior during puberty in mice. *Psychoneuroendocrinology, 85,* 78-87. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.08.009

Brifault, C., Gras, M., Liot, D., May, V., Vaudry, D., & Wurtz, O. (2015). Delayed pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing M2 microglia/macrophage polarization. *Stroke, 46*, 520–528. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006864

Carvalho, M., Costa, V.M., Capela, J.P., Pontes, H., Remiao, F., Carvalho, F., … & Lourdes Bastos. M.D. (2012). Toxicity of amphetamines. *Archives of Toxicology, 86*(8), 1167-1231. https://doi.org/10.1007/s00204-012-0815-5

Deng, X., Wang, Y., Chou, J., & Cadet, J.L. (2001). Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method. *Molecular Brain Research, 93*(1), 64-69. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00184-X

Ebbesen, C,L., & Brecht, M. (2017). Motor cortex–to act or not to act?. *Springer Nature, 18*, 694-705. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.119

Gonzales, R., Mooney, L., & Rawson, R.A. (2010). The methamphetamine problem in the United States. *Annual Review of Public Health, 31*, 385-398. https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.012809.103600

He, C., Sumpter, Jr.R., & Levine, B. (2012). Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy, 8*(10),1548-1551.https://doi.org/10.4161/auto.21327

Huang, E., Huang, H., Guan, T., Liu, C., Qu, D., Xu, Y., ... & Chen. L. (2019). Involvement of C/EBPβ-related signaling pathway in methamphetamine-induced neuronal autophagy and apoptosis. *Toxicology Letters, 312*, 11-21. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.003

Jang, Y. (2020). Endurance exercise-induced expression of autophagy-related protein coincides with anabolic expression and neurogenesis in the hippocampus of the mouse brain. *NeuroReport, 31*, 442–449. https://doi.org/10.1097/

WNR.0000000000001431

Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy, 7*(3), 279-296. https://doi.org/ 10.4161/auto.7.3.14487

Jokar. M., & Sherafati Moghadam. M. (2019). High intencity interval training inhibits autophagy in the heart tissue oftype 2 diabetic rats by decreasing the content of FOXO3A and BECLIN-1 protents. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism, 18(*6), 2019. [In Persian]. http://ijdld.tums.ac.ir/article-1-5882-en.html

Khalafi, M., Shabkhiz, F., Azali Alamdari, K., & Bakhtiyari, A. (2016). irisin response to two types of exercise training in type 2 diabetic male rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences, 19*(6), 37-45. [In Persian]. http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-4242-en.html

Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell, 132*, 27-42. https://doi.org/ 10.1016/j.cell.2007.12.018

Li, Y., Hu, Z., Chen, B., Bu, Q., Lu, W., Deng, Y., … & Sheu. M.L. (2012). Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicology Letters, 215*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.019

Loyd, B.A., Hake, H.S., Ishiwata, T., Farmer K.E., Loetz, E.C., Fleshner, M., … & Greenwoog B.N. . (2017). Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. *Behavioural Brain Research, 4328*(16), 1-38. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.033

Marques-Aleixo, I., Santos-Alves, E., Balça, M.M., Rizo-Roca, D., Moreira, P.I., & Oliveira, P.J. (2015). Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto(mito) phagy markers. *Neuroscience, 301*, 480–495. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.027

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature, 451*, 1069-75. https://doi.org/10.1038/nature06639

Modirzadeh Tehrani, A., Eskandarian Boroujeni, M., Aliaghaei, A., Hosseinpour Feizia, M.A., & Safaralizadeh, R. (2019). Methamphetamine induces neurotoxicity-associated pathways and stereological changes in prefrontal cortex. *Neuroscience Letters, 712*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134478

Nerlov, C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends in Cell Biology, 17 (7),* 318–324. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.004

Pan, H.C., Yang, C.N., Hung, Y.W., Lee, W.J., Tien, H.R., Shen, C.C., … & Sheu. M.L. (2013). Reciprocal modulation of C/EBP-a and C/EBP-b by IL-13 in activated microglia prevents neuronal death. *European Journal of Immunology, 43*(11) 2854–2865. https://doi.org/10.1002/eji.201343301

Pasqali, L., Lazzeri, G., Isidoro, C., Ruggieri, S., Paparelli, A., & Fornai, F. (2008). Role of autophagy during methamphetamine neurotoxicity. *Annals of The New York Academy of Sciences, 1139*, 191-196. http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.64

Ramji, D.P., & Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem Journal, 365*(Pt 3), 561–575. https://doi.org/10.1042/BJ20020508

Roohbakhsh A., Shirani K., & Karimi G. (2016). methamphetamine-induced toxicity: the role of autophagy?. *Chemico-Biological Interactions, 25***(260),163-167. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.012**

Scherz-Shouval R., & Elazar Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology, 17***(9), 422-7. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009**

Schrem, H., Klempnauer, J., & Borlak, J. (2004). Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: The C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacological Reviews, 56***(2), 291–330. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009**

Shafiei, A., Haghighi, A.H., Askari, R., Keyhani, A., Nabavizadeh, M.S., & Asadi-Shekari, M. (2022). Effects of moderate-intensity interval training on gene expression and antioxidant status in the hippocampus of Methamphetamine-dependent rats. *Neurotoxicity Research, 40*, **1455–1463. https://doi.org/10.1007/s12640-022-00532-4**

Xu, X., Huang, E., Luo, B., Cai, D., Zhao, X., Luo, Q., ... & Wang. H. (2018). Methamphetamine exposure triggers apoptosis and autophagy in neuronal cells by activating the C/EBPβ-related signaling pathway. *The FASEB Journal, 32***(12), 6737-6759. https://doi.org/10.1096/fj.201701460RRR**

Xu, X., Huang, E., Tai, Y., Zhao, X., Chen, X., Chen, C., ... & Xie. W.B. (2017). Nupr1 modulates methamphetamine-induced dopaminergic neuronal apoptosis and autophagy through CHOP-Trib3-mediated endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 10***(203), 1-16. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00203**

Yamamoto, B.K., Moszczynska, A., & Gudelsky, G.A. (2010). Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Annals of The New York Academy of Sciences, 1187*, **101-121. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05141.x**