

تأثیر ۴ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزشی بر سطح آمیلوئیدبتای محلول و اختلال حافظه در رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر القاء شده با تزریق A β 1-42

داور خدادادی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. davar.khodadadi@yahoo.com
***رضا قراخانلو:** استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). ghara_re@modares.ac.ir
ناصر نقدی: استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. naghdinasser@yahoo.com
مونا سلیمی: دانشیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. salimi_mona@yahoo.com
سید محمد عظیمی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ma.azimi64@gmail.com
اتابک شاهد: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. atabak.shahed@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر شایع‌ترین شکل زوال عقل است و پتیدهای آمیلوئیدبتا نقش محوری در بیماری‌زایی آن ایفا می‌کنند. اخیراً، ورزش منظم به عنوان یکی از سازوکارهای غیردارویی مهم برای مقابله با بیماری آلزایمر مطرح شده است. با این حال، نقش پیشگیرانه ورزش کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر پیش‌آماده‌سازی ورزشی ۴ هفته‌ای بر سطح آمیلوئیدبتای محلول و اختلال حافظه در رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر القاء شده با تزریق A β 1-42 است.

روش کار: هشتاد و چهار سر رت ۸ هفته‌ای نر با میانگین وزن 20 ± 19.5 گرم در ابتدا به صورت تصادفی به دو گروه تمرین هوازی یا استراحت به مدت ۴ هفته تقسیم شدند. سپس، هر گروه به ۳ زیرگروه بیماری آلزایمر، شم و بدون تزریق تقسیم گردید. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، تزریق A β 1-42 یا DMSO به درون هیپوکمپ صورت پذیرفت. ۷ روز پس از جراحی، رت‌های هر گروه به طور تصادفی یا قربانی شده (۷ سر رت) یا تحت آزمون رفتاری (۷ سر رت) قرار گرفتند. بدنبال جمع‌آوری نمونه‌های خونی در رت‌های قربانی، بافت هیپوکمپ استخراج گردید و سطوح A β 1-42 در پلاسما و هیپوکمپ، و همچنین مقادیر پلاسمایی پروتئین مرتبط با گیرنده لیپوپروتئینی با چگالی کم-۱ (sLRP-1) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در گروه ورزش + بیماری آلزایمر، سطح A β 1-42 مغزی کمتر و سطح A β 1-42 پلاسمایی بیشتر از گروه آلزایمری بود ($p < 0.001$). همچنین، سطح sLRP-1 پلاسمایی در گروه ورزش + بیماری آلزایمر بیشتر از گروه آلزایمر بود ($p < 0.001$). بعلاوه، یادگیری و حافظه فضایی به طور معنی‌داری در گروه ورزش + بیماری آلزایمر بهتر از گروه آلزایمر بود ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ۴ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزشی می‌تواند با افزایش پاکسازی آمیلوئیدبتای محلول از مغز، افت یادگیری و حافظه فضایی را تقلیل دهد.

کلیدواژه‌ها: بیماری آلزایمر، پیش‌آماده‌سازی ورزشی، آمیلوئیدبتای محلول، sLRP-1

مقدمه

بیماری‌زایی بیماری آلزایمر به طور گسترده‌ای ثابت شده است (۲). در این رابطه نشان داده شده است که رسوب آمیلوئیدبتا در پلاک‌های خارج سلولی با نقص سیناپسی، مرگ سلول‌های عصبی و افت حافظه در ارتباط است (۳). با این حال، مطالعات اخیر دریافته‌اند که وجود اشکال محلول الیگومرهای A β نسبت به رسوب‌های نامحلول، ارتباط بیشتری با اختلال ادراکی و اختلال عملکرد سیناپسی دارند (۴). شواهد آزمایشگاهی نشان

بیماری آلزایمر (AD) شایع‌ترین شکل زوال عقل است که از آن به عنوان بزرگترین چالش سلامت در قرن ۲۱ یاد شده است. از نقطه نظر بافت شناسی، وجود پلاک‌های پیری و رشته‌های کلاف عصبی به عنوان علائم آسیب‌شناختی بیماری آلزایمر شناسایی شده‌اند (۱). پلاک‌های پیری به طور عمده از پتیدهای آمیلوئیدبتا (A β 1-40 و A β 1-42) تشکیل شده‌اند که نقش محوری آنها در

ادراکی و شیوع زوال عقلی همراه است (۱۴). با این حال، در مورد تفاوت‌های بالقوه‌ای که ممکن است در پاسخ یک بدن فعال در مقایسه با بدن غیرفعال به استرس القای بیماری آلزایمر و به دنبال آن پاکسازی آمیلوئیدبتا وجود داشته باشد، اطلاعاتی در دسترس نیست. تزریق $A\beta_{1-42}$ به درون هیپوکمپ در موش و رت به عنوان یک مدل حیوانی مناسب برای القای بیماری آلزایمر می‌باشد که پلاک‌های پیری مرتبط با کاهش حافظه مداوم قابل توجهی را ایجاد می‌کند (۱۵). بنابراین، مطالعه حاضر به دنبال آن است که آیا ۴ هفته پیش‌آماده‌سازی هوازی می‌تواند با افزایش پاکسازی آمیلوئیدبتا، بار آمیلوئیدی ناشی از تزریق داخل هیپوکمپی $A\beta_{1-42}$ را در رت‌های نر ویستار کاهش داده و اختلال حافظه را تقلیل دهد؟

روش کار

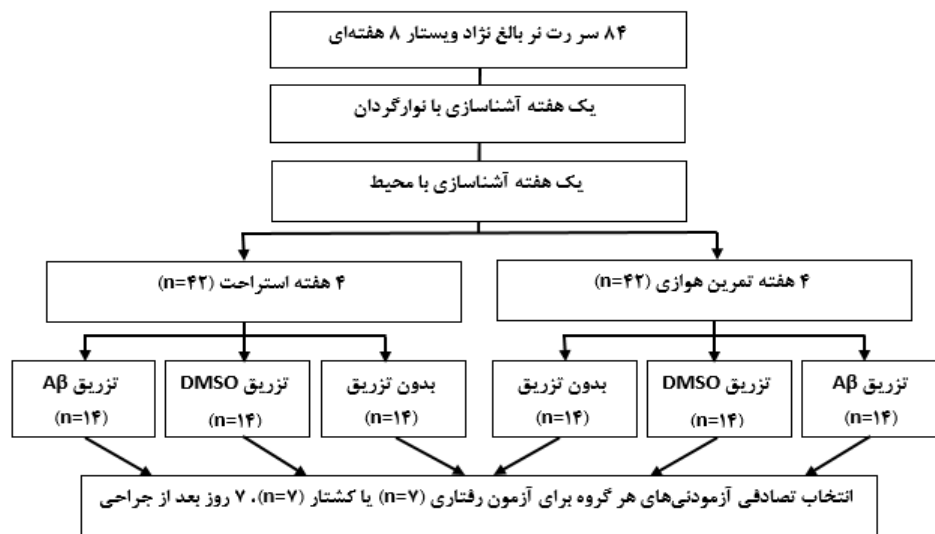
پژوهش حاضر از نوع تجربی است که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. آزمودنی‌های تحقیق حاضر تعداد ۸۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 20 ± 195 گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رت‌ها در دمای محیطی 3 ± 22 درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری - شدند به طوری که در دسترسی به آب و غذای استاندارد، محدودیتی نداشته باشند. بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، تمامی رت‌ها به منظور آشناسازی با نوارگردان به مدت یک هفته (۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و پنج روز در هفته) در معرض آن قرار گرفتند. سپس، رت‌ها به روش تصادفی ساده در ابتدا به ۲ گروه تقسیم شدند: گروه ورزش و گروه استراحت؛ گروه ورزش ۴ هفته تمرین هوازی را اجرا نمودند و گروه استراحت همزمان با گروه تمرین و با مدت مشابه با آنها در معرض نوارگردان خاموش قرار گرفتند تا شرایط محیطی برای همه رت‌ها یکسان باشد (شکل ۱).

پروتکل تمرین هوازی به این صورت بود که رت‌ها روی نوارگردان با شیب صفر درجه، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته به تمرین پرداختند. سرعت

داده‌اند که الیگومرهای $A\beta$ محلول خارج (۵) و داخل سلولی (۶) نقش مهمی در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر ایفا می‌کنند. در واقع سمیت عصبی مرتبط با تجمع داخل سلولی الیگومرهای $A\beta$ محلول، به عنوان یک رخداد اولیه در بیماری آلزایمر بوده و مسئول اختلال عملکرد سیناپسی می‌باشد (۷). این تجمعات می‌تواند از $A\beta$ تولید شده در داخل سلول (۸) یا ورود $A\beta$ از فضای خارج سلولی به داخل سلول حاصل شود (۹). تجمع داخل سلولی $A\beta$ می‌تواند از یک سلول به سلول دیگر متصل به آن نیز منتقل گردد که منجر به پیشرفت تدریجی بیماری‌زایی در بیماری آلزایمر می‌شود (۹). از این رو، کنترل سطوح آمیلوئیدبتا، به ویژه آمیلوئیدبتای محلول، یکی از اهداف مهم مطالعاتی به شمار می‌رود.

انتقال $A\beta$ از میان سد خونی-مغزی به خارج از مغز به همراه تجزیه آنزیمی آن مسیرهای مهم شناخته شده برای حذف $A\beta$ اضافی مغز به شمار می‌روند. پروتئین مرتبط با گیرنده لیپوپروتئینی با چگالی کم-۱ (LRP-1) را در انتقال رو به خارج $A\beta$ از میان سد خونی-مغزی ایفا می‌کند، در حالی که شکل محلول آن، یعنی LRP-1، مهمترین حامل $A\beta$ در خون برای پاکسازی نهایی آن از طریق کبد و کلیه‌ها می‌باشد (۳).

در حالی که مطالعات در یافتن درمان قطعی برای بیماری آلزایمر با شکست مواجه شده‌اند، سازوکارهای پیشگیری از ابتلا به بیماری و یا حداقل کند کردن سیر پیشرفت بیماری توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی یک نگرش غیردارویی محتمل برای کاهش خطر بیماری آلزایمر می‌باشد (۱۰). فعالیت ورزشی منظم نقش حفاظت نرونی داشته (۱۱)، نروتروفین‌ها را به صورت مثبت تنظیم می‌نماید (۱۲) و در عین حال، آثار مطلوبی بر شناخت، حجم مغز و فعالیت شبکه عصبی در مطالعات کنترل شده افراد مسن که از لحاظ ادراکی سالم هستند و بزرگسالان مبتلا به اختلال حافظه دارد (۱۳). همچنین، افزایش فعالیت جسمانی به طور بالقوه از طریق کاهش سطوح $A\beta$ در مغز، با کاهش خطر اختلال



شکل ۱- پروتکل مطالعه

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و به دنبال استراحت شبانه، حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس، سر حیوانات در دستگاه استریوتاکس ثابت و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی جمجمه، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۸)، حفره-هایی در موقعیت ۳/۸ عقب برگما (AP)، ۲/۲ میلی‌متر در طرفین شکاف طولی و ۲/۷ میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه ایجاد و تزریق درون هیپوکمپ $A\beta_{1-42}$ (هر طرف ۱ میکرولیتر) توسط سرنگ همپلتون صورت پذیرفت. جهت اطمینان از محل درست تزریق در مغز، ابتدا به دو حیوان خارج از مطالعه جوهر تزریق شد و پس از کشتار، محل تزریق بررسی گردید. گروه شم نیز تمام مراحل آزمایشگاهی را همانند گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ تجربه نمودند، با این تفاوت که در گروه شم میزان ۱ میکرولیتر بافر DMSO در هر یک از هیپوکمپ‌ها تزریق شد.

۷ روز بعد از جراحی و توسعه علائم بیماری آرایمر (۱۹، ۲۰)، رت‌های هر گروه به طور تصادفی یا قربانی شده (۷ سر رت) یا تحت آزمون رفتاری (۷ سر رت) قرار گرفتند. آزمودنی‌های گروه کشتار توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس، برش در ناحیه شکم و قفسه سینه ایجاد شد و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر

نوارگردان در هفته‌های اول و دوم تمرین، ۱۰ متر بر دقیقه بود که در دو نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آن (به منظور جلوگیری از خستگی عضلانی در رت‌ها) اجرا شد. در هفته سوم، سرعت به ۱۵ متر بر دقیقه افزایش یافت که در سه نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۲ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها انجام گردید. در هفته چهارم، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۳ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها به فعالیت پرداختند (۱۶). رت‌های گروه تمرین در تمام جلسات تمرینی پایش می‌شدند و با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف با شدت ۰/۵ میلی‌آمپر که در حیوان استرس زیادی را ایجاد نمی‌کند و یا دستکاری با یک اسفنج به ادامه دویدن تشویق شدند. سپس، رت‌های هر گروه به روش تصادفی ساده به ۳ زیرگروه ۱۴ تایی تقسیم گردیدند: تزریق $A\beta_{1-42}$ (AD)، شم و بدون تزریق.

به منظور آماده‌سازی آمیلوئیدبتا، ابتدا پپتید $A\beta_{1-42}$ (Abcam, USA) در محلول بافر DMSO ۳ درصد (Sigma Aldrich, USA) با غلظت ۵ میکروگرم/میکرولیتر حل و سپس در مقادیر ۳۰ میکرولیتر به ازای هر ویال تقسیم و در دمای 4°C -۸۰ نگهداری شد. محلول آمیلوئیدبتا به مدت ۷ روز در دمای 37°C انکوبه شد تا بتا‌آمیلوئید به شکل فیبریل درآید (۱۷).

شدند.

روش آموزش ماز آبی موريس برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی بدین صورت بود: الف) سازش یافتن: به منظور عادت کردن به ماز، ۲۴ ساعت قبل از آموزش، رت‌ها به مدت ۲ دقیقه در مخزن فاقد صفحه پلکسی گلاس شنا کردند. ب) مرحله یادگیری: در این مرحله رت‌های هر شش گروه به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کارآزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم (جنوب شرقی) قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. در شروع هر کارآزمایی ابتدا به هر رت مدت ۱۵ - ۲۰ ثانیه اجازه استقرار روی سکو داده می‌شد تا حیوان فرصت داشته باشد با رؤیت علایمی از قبیل پنجره، میز و قفسه، توصیفی فضایی از محیط اطراف ماز به دست آورد. سپس، حیوان به طور تصادفی از یکی از چهار جهت اصلی (شمال، جنوب، شرق، غرب) به نحوی داخل آب رها می‌شد که سر حیوان به سمت دیواره حوضچه قرار گیرد. در این حالت، حیوان شنا می‌کرد تا سکوی پنهان زیر آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. در صورتی که رت قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نبود با دست به طرف آن هدایت می‌شد. پس از پیدا کردن سکو، به حیوان اجازه داده می‌شد که به مدت ۲۰ ثانیه روی آن باقی بماند. مدت زمان پیدا کردن سکو (تأخیر در رسیدن به سکو) در هر بار آموزش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. پس از آخرین کارآزمایی آموزش در هر روز، حیوان از حوضچه خارج و با حوله خشک گشته و به قفس خود باز گردانده می‌شد. آزمون پروب (انتقال): یک روز بعد از آخرین روز آموزش، حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله، رت‌ها در یک آزمون ۶۰ ثانیه‌ای که در طی آن سکو از داخل آب برداشته می‌شد، مورد ارزیابی قرار گرفتند و مدت زمان صرف شده در ربع دایره هدف که قبلاً سکو در آن قرار داشت، اندازه‌گیری شد. آزمون سکوی آشکار: به منظور بررسی هماهنگی حسی - حرکتی و انگیزه حیوان، پس از انجام آزمون پروب، سکو توسط یک صفحه سفید رنگ، مرئی شد و هم سطح با آب قرار گرفت تا به صورت

خون به وسیله سرنگ مستقیماً از قلب اخذ گردید و در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شد. بلافاصله پس از آن، سر حیوان توسط دستگاه گیوتین جدا و مغز کامل خارج شد. سپس، با احتیاط هیپوکمپ از بقیه بافت مغز جدا شد و توسط نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه‌های خونی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و پلاسما حاصله تا انجام مراحل بعدی آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکمپ با استفاده از ۱ میلی‌لیتر محلول PBS هموژنایز شد و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از اعمال ۲ سیکل انجماد-ذوب شدن جهت شکستن غشاهای سلولی، بافت هموژن شده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و سپس مایع رویی توسط سمپلر استخراج گردید (۲۱). پس از آن، نمونه‌های پلاسما و هیپوکمپ برای تعیین سطوح $A\beta_{1-42}$ محلول به وسیله کیت الایزا (CSB-E10786r; Cusabio Biotech, China) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده آن به کار گرفته شدند. همچنین، مقادیر پلاسمایی sLRP-1 با روش الایزا (ABIN627269) تعیین شد.

برای آزمون حافظه فضایی از آزمون ماز آبی موريس استفاده شد. دستگاه رفتاری شامل یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی (به قطر ۱/۵ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) بود که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن از آب 2 ± 21 درجه سانتی‌گراد پر شده بود. یک سکوی مدور به قطر ۱۰ و ارتفاع ۲۸ سانتی‌متر، حدود ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از ربع دایره‌های از پیش تعیین شده، قرار داده شد. آزمایش‌کننده، رایانه و شکل‌های راهنمای خارج از ماز در سراسر آزمایش ثابت بودند. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم افزار Etho Vision 7 و یک دوربین که در بالای مخزن قرار می‌گرفت، ردیابی و ثبت می‌شد. بدین ترتیب مسیر شنای موش در هر بار آموزش ثبت و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان سکوی پلکسی گلاس (سکوی پنهان) را پیدا کند و مدت زمانی که حیوان در ربع دایره هدف می‌گذراند، اندازه‌گیری

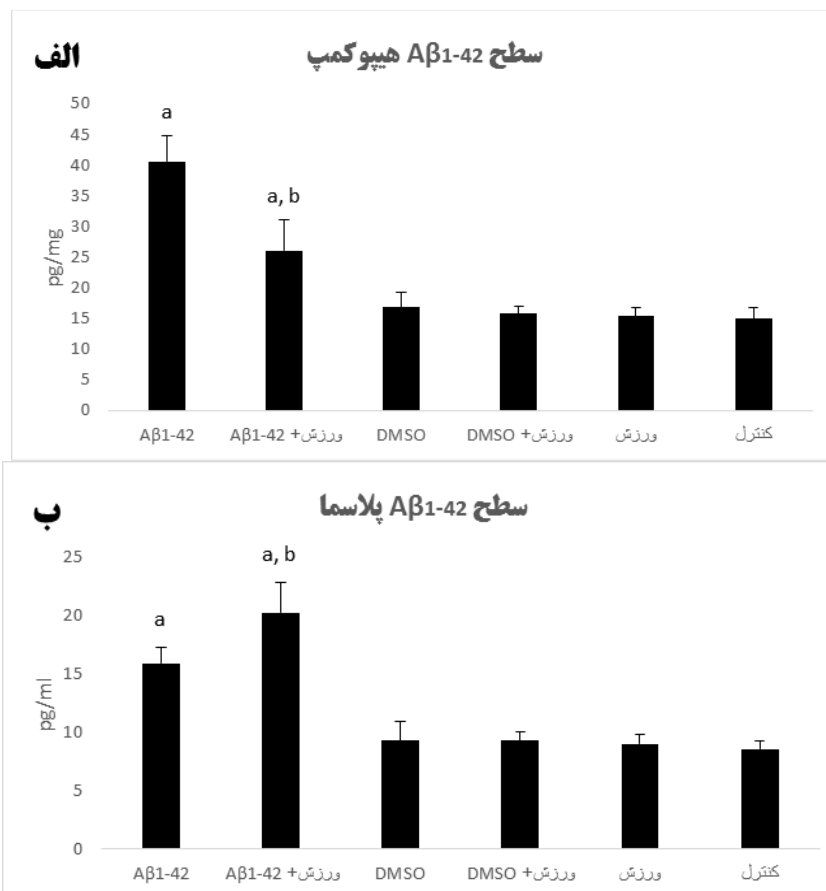
بدست آمده از شاخص یادگیری فضایی در مرحله اکتساب از تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (گروه * روزهای یادگیری) و به منظور تحلیل داده‌های یادگیری فضایی هر روز به صورت جداگانه، حافظه فضایی در آزمون پروب و همچنین، سطوح آمیلوئیدبتا و sLRP-1 از تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت نیاز از آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین سطح آمیلوئیدبتای هیپوکمپ در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($F=77/026, p < 0.001$). به این صورت که سطح آمیلوئیدبتای هیپوکمپ در گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ و همچنین، گروه ورزش + تزریق $A\beta_{1-42}$ در مقایسه با دیگر گروه‌ها به طور معنی‌داری بیشتر است

واضح دیده شود. این سکو در وسط ربع دوم (منطقه شمال شرقی) قرار داشت و هر رت در چهار کارآزمایی به طور تصادفی از چهار جهت اصلی به داخل آب رها شد. سپس، حیوان شنا کرده تا سکوی سفید رنگ هم سطح آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. مدت زمان پیدا کردن سکو در هر بار آزمون اندازه‌گیری می‌شد. در صورتی که حیوان در این چهار کارآزمایی قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نبود، از گروه خود حذف می‌شد (۲۲). لازم به توضیح است که تمامی مراحل پژوهش بر اساس آیین‌نامه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران انجام شد.

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همچنین، آزمون لوین برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها بکار رفت. به منظور تحلیل داده‌های

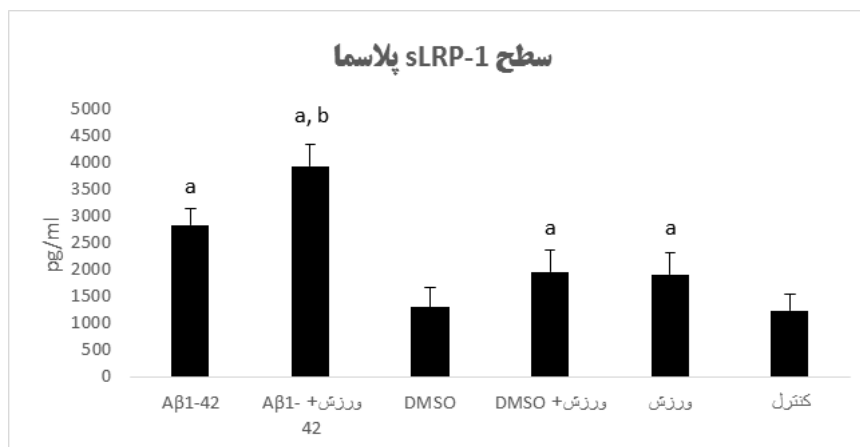


شکل ۲- سطح آمیلوئیدبتای محلول هیپوکمپ (الف) و پلاسما (ب) در گروه‌های مختلف مطالعه. a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.001$), b: تفاوت معنی‌دار با گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ ($p < 0.001$)

مختلف نشان می‌دهد ($F=56/081$, $p \leq 0/001$). بین سطوح sLRP-1 پلاسما در گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$)، گروه ورزش+تزریق $A\beta_{1-42}$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$)، و گروه‌های ورزش و ورزش+شم با گروه کنترل ($p \leq 0/05$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳).

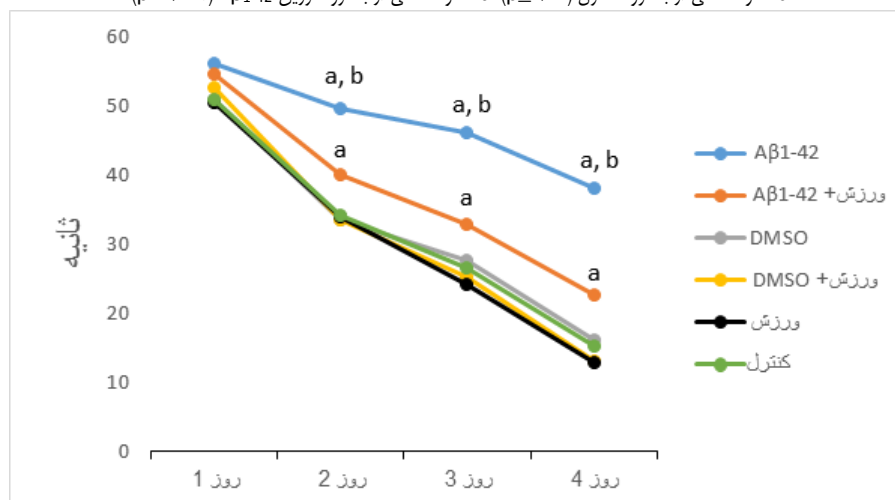
بین گروه‌های مورد مطالعه در اجرای آزمون سکوی آشکار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری‌های تکراری نشان‌دهنده معنی‌دار بودن روز ($F=828/470$, $p < 0/001$)، گروه ($F=76/730$) و همچنین، تعامل دو متغیر مستقل روز و گروه ($F=8/265$, $p < 0/001$) بر زمان سپری شده برای یافتن سکو بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین زمان سپری

($p < 0/001$). جالب آن است که ورزش توانسته است سطح آمیلوئیدبتای هیپوکمپ را نسبت به گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ به صورت معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0/001$) (شکل ۲ الف). بین سطح آمیلوئیدبتای پلاسما در گروه‌های مختلف نیز تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/001$)، به طوری که سطح آمیلوئیدبتای پلاسما در گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ و همچنین، گروه ورزش+تزریق $A\beta_{1-42}$ در مقایسه با دیگر گروه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/001$). همچنین، گروه ورزش+تزریق $A\beta_{1-42}$ نسبت به گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ سطح بالاتری از آمیلوئیدبتای پلاسما را نشان داد ($p < 0/001$) (شکل ۲ ب). شکل ۳، نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه را برای سطوح sLRP-1 پلاسما در گروه‌های



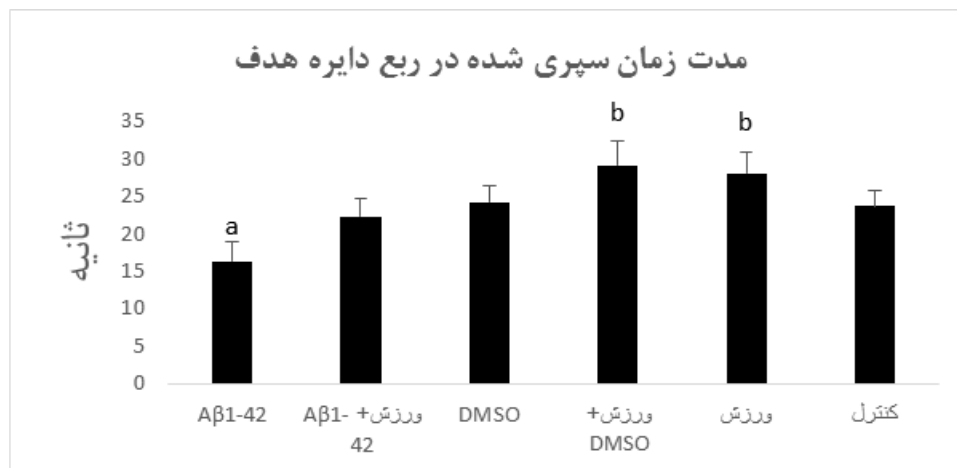
شکل ۳- سطح sLRP-1 پلاسما در گروه‌های مختلف مطالعه.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p \leq 0/05$); b: تفاوت معنی‌دار با گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ ($p < 0/001$)



شکل ۴- میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های مورد مطالعه در مدت چهار روز آموزش ماز آبی مورس.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p \leq 0/05$); b: تفاوت معنی‌دار با گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ ($p < 0/001$)



شکل ۵- زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه‌های مورد مطالعه در آزمون پروب.
a: تفاوت معنی‌دار با گروه‌های دیگر ($p \leq 0.01$); b: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p \leq 0.05$)

بیماری آلزایمر القا شده با تزریق $A\beta_{1-42}$ بود. نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح $A\beta_{1-42}$ محلول هیپوکمپ در رت‌های گروه‌های AD بیشتر از گروه کنترل است. همچنین، پیش‌آماده‌سازی ورزشی توانسته است سطوح آن را در مقایسه با گروه AD کاهش دهد. این مشاهده با یافته‌های لین و همکاران (۲۰۱۵) و مور و همکاران (۲۰۱۶) همسو می‌باشد (۱۰، ۲۳). با این حال، یوده و همکاران (۲۰۰۹) عدم تأثیر تمرین ورزشی بر سطوح آمیلوئیدبتای محلول مغزی را گزارش کرده‌اند (۲۴). دلیل این اختلاف را می‌توان به مدل القای بیماری آلزایمر و زمانبندی شروع مداخله تمرینی نسبت داد. در مطالعه مذکور، از موش‌های ترنسژنیک Tg2576 استفاده شده بود و تمرینات از سن ۵ ماهگی شروع شد.

از آنجایی که تشکیل تجمعات سمی $A\beta$ به غلظت زیاد آن وابسته است، مطالعاتی که در مراحل اولیه زندگی سطوح $A\beta$ محلول را پایین نگه می‌دارند، خطر بیماری آلزایمر را کاهش می‌دهند (۲۳). سطوح پایدار $A\beta$ در نتیجه تعادل بین تولید و پاکسازی آن حاصل می‌شود. از آنجایی که تولید $A\beta$ تحت تأثیر فعالیت ورزشی قرار نمی‌گیرد (۲۵)، به نظر می‌رسد که تفاوت‌ها در $A\beta$ محلول حاصله از مداخله تمرینی در تحقیق حاضر، به علت تغییرات در پاکسازی آن رخ داده است. پاکسازی $A\beta$ از مغز از طریق تخریب، انتقال از طریق سد خونی-مغزی یا دستگاه لنفاتیک-

شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف در روزهای دوم ($F=30/47$, $p < 0.001$)، سوم ($F=39/924$, $p < 0.001$) و چهارم ($F=96/196$) تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد. مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های تزریق $A\beta_{1-42}$ و ورزش + تزریق $A\beta_{1-42}$ در روزهای دوم تا چهارم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های دیگر بود ($p \leq 0.05$). همچنین، در روزهای دوم تا چهارم گروه ورزش + تزریق $A\beta_{1-42}$ در مقایسه با گروه $A\beta_{1-42}$ در مدت زمان کمتری سکو را یافتند ($p < 0.001$). بین گروه‌های شم، ورزش + شم، و کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۴).

نتایج آزمون پروب برای بررسی حافظه فضایی رت‌ها نشان داد که زمان صرف شده در ربع دایره هدف برای گروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت است ($F=20/958$, $p \leq 0.001$). زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه تزریق $A\beta_{1-42}$ به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های دیگر بود ($p \leq 0.01$). همچنین، گروه‌های ورزش و ورزش + شم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار عملکرد بهتری داشتند ($p \leq 0.05$) (شکل ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر پیش‌آماده‌سازی ورزشی ۴ هفته‌ای بر سطح آمیلوئیدبتای محلول و اختلال حافظه در رت‌های مبتلا به

پاکسازی نهایی، از دسترسی $A\beta$ به مغز جلوگیری می‌کند. نشان داده شده است که در بیماری آلزایمر، اتصال $A\beta$ به sLRP-1 به علت کاهش سطوح آن کم شده و سطوح $A\beta$ آزاد پلاسما افزایش می‌یابد (۳۱)؛ این حالت ممکن است از طریق انتقال رو به داخل به وسیله RAGE به افزایش سطوح $A\beta$ مغزی منجر شود. با این حال، بالاتر بودن سطوح sLRP-1 در گروه AD در مقایسه با گروه کنترل در مطالعه حاضر، به احتمال زیاد به افزایش جبرانی این حامل پروتئینی در مراحل ابتدایی بیماری مربوط می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که یادگیری هر شش گروه تحقیق در طی روزهای آموزش ماز آبی، با کاهش زمان صرف شده برای رسیدن به سکو، افزایش یافت؛ با این حال، روند یادگیری بین این گروه‌ها تفاوت داشت. با این که گروه‌ها در زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در روز اول تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، گروه AD کمترین میزان یادگیری را در روزهای دوم تا چهارم نشان داد. اما گروه ورزش + $A\beta$ در مقایسه با گروه AD یادگیری بهتری داشت. به عبارت دیگر، پیش‌آماده‌سازی ورزشی توانسته است روند یادگیری فضایی در مرحله اکتساب را بهبود بخشد. بهبود یادگیری فضایی در اثر تمرین ورزشی در موش‌های پیر (۲۶) و مبتلا به بیماری آلزایمر (۳۱) پیشتر گزارش شده است. از سوی دیگر، عدم تغییر قابل توجه در زمان صرف شده برای رسیدن به سکو در گروه‌های ورزشی در مقایسه با گروه کنترل، به این نکته اشاره دارد که در حالت طبیعی، یادگیری فضایی در ماز آبی تحت تأثیر فعالیت ورزشی قرار نمی‌گیرد. این مشاهده با تحقیقات هوپکین و همکاران (۲۰۱۱) و خورشیداحمد و همکاران (۲۰۱۲) همسو می‌باشد که عدم تأثیر تمرین ورزشی بر یادگیری فضایی در ماز آبی را در حیوانات سالم گزارش کرده‌اند (۲۲). بنابراین، به نظر می‌رسد زمانی که تخریب قابل ملاحظه‌ای در یادگیری رخ داده باشد و یا عاملی مانع ایجاد یادگیری شده باشد، اثرات مثبت ورزش برجسته‌تر می‌باشد. از سوی دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که

گلیمفاتیک مغزی صورت می‌گیرد که بهبود عملکرد آنها با تمرین ورزشی پیشتر گزارش شده است (۱۰، ۲۶).

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که سطح $A\beta_{1-42}$ محلول پلاسمایی در گروه‌های AD و ورزش + AD در مقایسه با گروه‌های دیگر بالا بود که به احتمال زیاد به دلیل افزایش پاکسازی جبرانی در اثر تزریق $A\beta_{1-42}$ به مغز بوده است. همچنین، گروه ورزش + AD در مقایسه با گروه AD سطوح بالاتری از $A\beta_{1-42}$ محلول پلاسمایی را نشان دادند. فلاح‌محمدی و همکاران (۱۳۹۲) نیز گزارش کرده‌اند که سطح $A\beta_{1-42}$ محلول پلاسمایی در اثر تمرین ورزشی در رت‌های دیابتی افزایش می‌یابد (۲۷). گمان می‌شود که بین $A\beta$ در مغز و خون محیطی تعادلی برقرار است. نشان داده شده است هنگامی که سطوح تام $A\beta$ در مغز افزایش می‌یابد، سطوح $A\beta$ پلاسما و مایع مغزی نخاعی به طور همزمان کاهش می‌یابد (۲۸). بنابراین، این فرضیه مطرح شده است که تغییر این تعادل به سمت خون از طریق افزایش پاکسازی محیطی ممکن است سطوح $A\beta$ در مغز را کاهش دهد، نگرشی که با عنوان "اثر سینک" شناخته می‌شود (۲۹). به نظر می‌رسد که پیش‌آماده‌سازی ورزشی حاضر توانسته است با القای اثر سینک، پاکسازی $A\beta$ مغزی به محیط را افزایش دهد.

افزایش سطوح LRP-1 مغزی به دنبال تمرین ورزشی در بیماری آلزایمر گزارش شده است (۱۰)، اما تا آنجا که می‌دانیم، تاکنون مطالعه‌ای تأثیر ورزش بر میزان این حامل پروتئینی در خون، یعنی sLRP-1 را اندازه‌گیری نکرده است. بالاتر بودن سطوح sLRP-1 در گروه‌های ورزشی مطالعه حاضر موید این مطلب است که احتمالاً ورزش موجب افزایش رهاسازی آن می‌شود. با این حال، سازوکارهای این امر نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. sLRP-1 دمین خارج سلولی جدا شده از LRP-1 می‌باشد که به طور طبیعی در پلاسما وجود دارد (۳۰). sLRP-1 یک پروتئین اتصال‌ی مهم برای $A\beta$ گردش خون به شمار می‌رود، به طوری که به ۷۰ الی ۹۰ درصد $A\beta$ پلاسما متصل شده و با انتقال آن به سمت کبد و کلیه‌ها برای

Based Complement. *Alternat. Med*; 2013.

4. Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves-Pires C, Benilova I, Blum D, et al. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid- β 1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci*; 2012.32(23):7852-61.

5. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A [beta] oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci*; 2012. 15(3):349-57.

6. Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*; 2010.119(5):523-41.

7. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *TINS*; 2001.24(4):219-24.

8. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, et al. Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in β -amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci. Lett*; 2001.306(1):116-20.

9. Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, Hallbeck M. Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid. *J. Neurosci*; 2012.32(26):8767-77.

10. Lin TW, Shih YH, Chen SJ, Lien CH, Chang CY, Huang TY, et al. Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem*; 2015.118:189-97.

11. Graff-Radford NR. Can aerobic exercise protect against dementia? *Alzheimer's Res. Ther*; 2011.3(1):6.

12. Dao AT, Zagaar MA, Alkadhi KA. Moderate treadmill exercise protects synaptic plasticity of the dentate gyrus and related signaling cascade in a rat model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol*; 2015.52(3):1067-76.

13. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; 2011.108(7):3017-22.

14. Liang KY, Mintun MA, Fagan AM, Goate AM, Bugg JM, Holtzman DM, et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann. Neurol*; 2010.68(3):311-8.

15. Nomura I, Takechi H, Kato N. Intraneuronally injected amyloid beta inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol*; 2012.107(9):2526-31.

16. Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, et al. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM

پیش‌آماده‌سازی ورزشی در رت‌های سالم و رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر، حافظه فضایی را در مقایسه با حیوانات غیرورزشی بهبود می‌بخشد. هی و همکاران (۲۰۱۷) و برچتلد و همکاران (۲۰۱۰) نیز پیشتر آثار سودمند تمرین ورزشی بر حافظه فضایی را گزارش نموده‌اند (۳۳، ۲۶). افزایش نرون‌زایی، سیناپس‌ها و شکل‌پذیری سیناپسی، افزایش سطوح عوامل رشد عصبی در نقاط مختلف مغزی بویژه در هیپوکمپ از جمله سازوکارهای شناخته شده در بهبود عملکرد شناختی به دنبال تمرین ورزشی می‌باشد (۳۴-۳۶). دلیل دیگری که بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌تواند برای توجیه آثار سودمند ورزش منظم در بهبود یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات مبتلا به بیماری آلزایمر ارائه شود، این است که پیش‌آماده‌سازی ورزشی توانسته است با افزایش پاکسازی A β و کاهش تجمع آن در مغز، عملکرد شناختی را افزایش دهد.

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۴ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزشی می‌تواند با افزایش پاکسازی آمیلوئیدبتا از مغز، موجب کاهش سطوح A β محلول مغزی و افزایش سطوح پلاسمایی آن شود. همچنین، تمرین ورزشی پیش از القای بیماری آلزایمر توانست سطح sLRP-1 را که مهمترین حامل پروتئینی A β در خون برای انتقال به کبد و کلیه‌ها برای پاکسازی نهایی می‌باشد نیز افزایش دهد. در نهایت، پایین بودن سطح آمیلوئیدبتای محلول به دنبال پیش‌آماده‌سازی ورزشی موجب کاهش افت یادگیری و حافظه فضایی پس از القای بیماری آلزایمر شد.

منابع

1. Ballaed C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones e. Alzheimer's disease. *Lancet*; 2011.377:1019-31.
2. Palop JJ, Mucke L. Amyloid-[beta]-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci*; 2010.13(7):812-8.
3. Prasansuklab A, Tencomnao T. Amyloidosis in Alzheimer's disease: the toxicity of amyloid beta (A β), mechanisms of its accumulation and implications of medicinal plants for therapy. *Evid.*

Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci*; 2001.21(2):372-81.

29. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM. Brain to plasma amyloid- β efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*; 2002.295(5563):2264-7.

30. Quinn KA, Grimsley PG, Dai YP, Tapner M, Chesterman CN, Owensby DA. Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. *J. Biol. Chem*; 1997.272(38):23946-51.

31. Parachikova A, Nichol K, Cotman C. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol. Dis*; 2008.30(1):121-9.

32. Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ. Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*; 2011.194:84-94.

33. Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*; 2010.167(3):588-97.

34. Garcia PC, Real CC, Ferreira AF, Alouche SR, Britto LR, Pires RS. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res.*; 2012.1456:36-48.

35. Molteni R, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur. J. Neurosci*; 2002.16(6):1107-16.

36. Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, et al. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci. Lett*; 2005.383(3):241-5.

sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiol. Dis*; 2012.45(3):1153-62.

17. Mohammadpour JD, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Fathollahi Y, Motamedi F, Rohampour K. Non-selective NSAIDs improve the amyloid- β -mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Pharmacol. Biochem. Behav*; 2015.132:33-41.

18. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: San Diego: Academic. 1998.

19. Prakash A, Medhi B, Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav*; 2013.110:46-57.

20. Stephan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated β -amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci*; 2001.21(15):5703-14.

21. Zhang Q, Zhao H, Liu W, Zhang Z, Qin H, Luo F, et al. Developmental perfluorooctane sulfonate exposure results in tau hyperphosphorylation and β -amyloid aggregation in adult rats: Incidence for link to Alzheimer's disease. *Toxicology*. 2016;347:40-6.

22. Khorshidahmad T, Tabrizian K, Vakilzadeh G, Nikbin P, Moradi S, Hosseini-Sharifabad A, et al. Interactive effects of a protein kinase AII inhibitor and testosterone on spatial learning in the Morris water maze. *Behav. Brain Res*; 2012.228(2):432-9.

23. Moore KM, Girens RE, Larson SK, Jones MR, Restivo JL, Holtzman DM, et al. A spectrum of exercise training reduces soluble A β in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*; 2016.85:218-24.

24. Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, et al. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*; 2009.35(3):426-32.

25. 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):4217-21.

26. 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.

27. Fallah mohammadi Z, Ebrahimzadeh M, Safaiee A. The combined effect of voluntary wheel running and *Allium paradoxum* on plasma Amyloid beta1-42 levels of diabetic rats. *RJMS*; 2013.20:29-37. (Persian)

28. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC,

The effect of 4 weeks of exercise preconditioning on soluble amyloid beta level and memory impairment in rats with Alzheimer's disease induced by A β 1-42 injection

Davar Khodadadi, PhD student of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Tarbiat Moddaress University, Tehran, Iran. davar.khodadadi@yahoo.com

***Reza Gharakhanlou**, PhD, Professor of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Tarbiat Moddaress University, Tehran, Iran (*Corresponding author). ghara_re@modares.ac.ir

Naser Naghdi, PhD, Professor of physiology, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. naghdinasser@yahoo.com

Mona Salimi, PhD, Associate Professor of Medicinal Chemistry, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. salimi_mona@yahoo.com

Seyyed Mohammad Azimi, PhD student of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Tarbiat Moddaress University, Tehran, Iran. ma.azimi64@gmail.com

Atabak Shahed, PhD student of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and amyloid peptides playing a central role in its pathogenesis. Recently, regular exercise has been considered as one of the most important non-pharmacological mechanisms to contrast with AD. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of 4 weeks of exercise preconditioning on the level of soluble amyloid and memory impairment in rats with AD induced by A β 1-42 injection.

Methods: Eighty four male rats with mean \pm SD weight of 195 \pm 20 g were randomly divided into two groups of aerobic training or resting for 4 weeks. Then, each group was subdivided into 3 subgroups of AD, sham and non-injected. Forty eight hours after the last training session, injection of A β 1-42 or DMSO into the hippocampus was performed. Seven days after surgery, rats of each groups were either sacrificed (7 rats) or subjected to behavioral testing (7 rats), randomly. Following the collection of blood samples in the victim's rats, the hippocampal tissue was extracted and the levels of A β 1-42 in plasma and hippocampus, as well as the plasma level of the soluble Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (sLRP-1) evaluated.

Results: The results showed that in the exercise + AD group, hippocampal level of A β 1-42 were lower, and plasma level of A β 1-42 were higher than the AD group ($p < 0.001$). Plasma sLRP-1 level in the exercise + AD group was also greater than the AD group ($p < 0.001$). Moreover, spatial learning and memory were significantly better in the exercise + AD than AD group ($p < 0.01$).

Conclusion: It seems that 4 weeks of exercise preconditioning could reduce the loss of spatial learning and memory through increasing soluble amyloid beta clearance from the brain.

Keywords: Alzheimer's disease, Exercise preconditioning, Soluble amyloid beta, sLRP-1