تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر سطوح آمیلوئید بتا ۴۲، نپریلیزین و γ–سکرتاز در هیپوکامپ موش‌های نر مدل آلزایمری با تزریق هوموسیستئین

علی یعقوبی [۱](Ph.D Student)، مرضیه ثاقب‌جو [۱*](Ph.D)، ضیاء فلاح‌محمدی [۲](Ph.D)، مهدی هدایتی [۳](Ph.D)، اکبر حاجی‌زاده مقدم [۴](Ph.D)

۱- گروه تربیت بدنی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی بر سطوح آمیلوئید بتا ۴۲ ($A\beta_{1-42}$)، نپریلیزین و γ–سکرتاز هیپوکامپ موش‌های نر مدل آلزایمری با تزریق هوموسیستئین بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور ۵۰ سر موش صحرایی نر (سن ۱۲ هفته) در ۵ گروه آلزایمر کنترل، آلزایمر تمرین، سالم کنترل، سالم تمرین و شم قرار داده شدند. برای القای آلزایمر، از تزریق هوموسیستئین با دوز ۰/۶ مولار به درون بطن مغز موش‌ها استفاده شد. گروه‌های تمرین با سرعت ۲۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه (معادل ۸۰-۷۵٪ VO_{2max})، ۶۰ دقیقه در هر جلسه و ۵ روز درهفته) روی نوارگردان تمرین کردند. سطوح $A\beta_{1-42}$، نپریلیزین و γ–سکرتاز به روش الایزا با استفاده از کیت‌های تحقیقاتی مخصوص موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ در گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه‌های سالم کنترل و سالم تمرین بالاتر بود (P=۰/۰۰۱). سطح γ–سکرتاز در گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه‌های سالم کنترل، سالم تمرین و شم به‌طور معناداری بالاتر بود (P=۰/۰۰۱). هم‌چنین سطح این متغیر در گروه آلزایمر تمرین نسبت به آلزایمر کنترل به‌طور معناداری کم‌تر بود (P=۰/۰۰۱). بین سطح نپریلیزین هیپوکامپ گروه‌های تحقیق تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۰۷). میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ و γ–سکرتاز ارتباط مثبت معناداری با یک‌دیگر داشتند (P=۰/۰۰۱، r=۰/۵۴).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش سطح γ–سکزتاز، به کاهش سطح Aβ در مغز موش‌های آلزایمری منجر شود و می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی مکمل در بیماران آلزایمر مورد مطالعه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ورزش درمانی، بیماری آلزایمر، نپریلیزین، هموسیستئین

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease) شایع‌ترین بیماری تحلیل برنده‌ی عصبی (Neurodegenerative) به حساب می‌آید. گزارش شده است که در سال ۲۰۰۶ تقریباً ۲۶/۶ میلیون نفر در سراسر دنیا از بیماری آلزایمر رنج می‌بردند و تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۱۰۶/۸ میلیون نفر افزایش یابد [۱].

هوموسیستئین (Hcy) (Homocysteine) از متابولیسم اسیدآمینه‌ی متیونین مشتق می‌شود و از لحاظ ساختاری بسیار شبیه متیونین و سیستئین است [۲]. مطالعات اخیر نشان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۲۲۰۲۰۴۲-۰۵۶

Email: m_saghebjoo@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۱

می‌دهند که سطح بالای Hcy یک سم برای سلول‌های عصبی به‌شمار می‌آید. افزایش سطح Hcy در خون و سیستم عصبی، با افزایش سن و اختلالات استحاله‌ی عصبی مانند بیماری پارکینسون و آلزایمر ارتباط دارد [۳]. مکانیزم افزایش سطح Hcy و ایجاد اثرات سمیت عصبی آن به افزایش احتمالی پپتید آمیلوئیدبتا (Aβ) (Amyloid beta) نسبت داده شده است [۵،۴].

آمیلوئیدبتا به‌صورت طبیعی در مقادیر اندک در مغز یافت می‌شود و دارای ۴۹-۳۷ اسیدآمینه می‌باشد که در اثر پروتئولیز پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (Amyloid precursor protein) (APP) ایجاد می‌شود [۷،۶]. این پپتید در نتیجه‌ی یک فرآیند متابولیکی، می‌تواند هم فرآورده‌های آمیلوئیدژنیک (Amyloidgenic) و هم غیرآمیلوئیدژنیک (Non-amyloidgenic) تولید کند [۸]. اگر پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید، توسط آنزیم α- سکرتاز (α–Secretase) شکافته شود، قطعه محافظ عصبی sAPPα (Neuroprotective) (قطعه‌ای از APP که توسط-α سکرتاز جدا شده) تولید می‌گردد و از تشکیل Aβ جلوگیری می‌کند [۹]. برعکس، اگر گسستگی در APP، ابتدا توسط β و سپس توسط-γ سکرتاز صورت بگیرد، تشکیل Aβ را در پی دارد و سبب افزایش سطح Aβ در سیستم عصبی می‌گردد [۱۱،۱۰]. بیش‌ترین Aβ ترشح شده، حاوی ۴۰ اسیدآمینه ($A\beta_{1-40}$) است و درصد اندکی، حاوی ۴۲ اسیدآمینه ($A\beta_{1-42}$) می‌باشد. آمیلوئیدبتای ۴۲، به‌دلیل حضور دو اسیدآمینه‌ی آب دوست بیش‌تر در ترکیبش، نسبت به $A\beta_{1-40}$ آسان‌تر تجمع می‌یابد و سمیت بیش‌تری دارد [۱۲]. تجمع و رسوب این پروتئین در مغز، یکی از عوامل اصلی و رویدادهای اولیه و مهم در پاتوژنز بیماری آلزایمر شناخته شده است که ابتدا در هیپوکامپ (به‌عنوان مرکز حافظه و یادگیری) تشکیل می‌شود و در تحلیل نورونی بیماران آلزایمر درگیر است [۶].

بعضی از پروتئازهای (Protease) تجزیه‌کننده‌ی Aβ، به تنظیم سطح آن در مغز کمک می‌کنند. این آنزیم‌ها عمدتاً متالوپروتئازها هستند که نپریلیزین، آنزیم اصلی تجزیه‌کننده‌ی Aβمی‌باشد [۱۳]. نپریلیزین یک الیگوپپتید می‌باشد و پپتیدهایی که بیش از ۴۰ تا ۵۰ اسیدآمینه دارند را تجزیه می‌کند، ولی اصلی‌ترین عمل آن در پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر و تجزیه‌ی پپتید Aβ مطرح شده است [۱۴] و از این طریق به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی غلظت Aβ در سطوح عمل‌کردی مغز مطرح می‌باشد [۱۵،۱۴].

تمرین بدنی به عنوان یک عامل مهم در کاهش اختلالات نورولوژیکی مورد تأکید قرار گرفته است و تعدادی از مطالعات شیوع‌شناسی پیشنهاد می‌کنند که تغییرات ساده در شیوه‌ی زندگی برای کند کردن شروع و پیشرفت آلزایمر کافی می‌باشد [۱۶]. یک مطالعه موردی نشان داده است که افراد مبتلا به آلزایمر در میانسالی کم‌تر فعال بوده‌اند و این غیر فعال بودن با ۲۵ درصد افزایش توسعه‌ی آلزایمر همراه می‌باشد [۱۷]. در رابطه با تأثیر تمرین و فعالیت ورزشی بر سطح Aβ نتایج ناهمسویی ذکر شده است، برای مثال کانگ و چو (Kang and Cho) (۲۰۱۴) نشان دادند که ۶ هفته تمرین نوارگردان باعث بهبود پیام‌دهی انسولین و کاهش معنادار $A\beta_{1-42}$ در مغز موش‌های آلزایمری شده توسط استروپتوزوتوسین می‌شود [۱۸]. لیو (Lio) و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که تعداد و اندازه پلاک‌های آمیلوئیدی و هم‌چنین سطح $A\beta_{1-42}$ در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری پس از ۵ ماه تمرین روی نوارگردان کاهش معناداری یافت [۱۹]، با وجود این، مطالعه یوادا (Yuede) و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که ۴ ماه تمرین دویدن به‌صورت اختیاری (چرخ دوار) و اجباری (نوارگردان) با شدت متوسط، هیچ تأثیر معناداری بر سطح $A\beta_{1-42}$ و $A\beta_{1-40}$ محلول در قشر و هیپوکامپ موش‌های آلزایمری ایجاد نکرد [۲۰].

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نکته مهم و قابل توجهی که در اکثر مطالعات به آن پرداخته نشده، این است که این تغییر در سطح Aβ در نتیجه‌ی فعالیت ورزشی به‌دلیل تغییر در متابولیسم پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (تغییر در α، β یا γ سکرتاز) یا افزایش سطوح پروتئازهای تجزیه‌کننده‌ی Aβ از جمله نپریلیزین می‌باشد و از آن‌جا که بسیاری از تلاش‌های

درمانی برای آلزایمر به مهار γ-سکرتاز و افزایش نپریلیزین تمرکز کرده‌اند، لذا تحقیق حاضر تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان را بر سطوح $A\beta_{1-42}$، نپریلیزین و γ-سکرتاز هیپوکامپ موش‌های آلزایمری شده توسط Hcy مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که به شیوه‌ی آزمایشگاهی انجام شد. در این تحقیق از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با دامنه‌ی وزنی ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرم و سن ۸ هفته استفاده شد که از انیستیتو پاستور شمال ایران (آمل) تهیه گردید. موش‌ها در محیطی با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوا ۵±۵۰ درصد و چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و در قفس‌های پلی‌کربنات (۵ موش در هر قفس) نگهداری شدند. پس از آن‌که موش‌ها به دامنه‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم رسیدند؛ ۳۰ سر موش که برای گروه‌های آلزایمری و شم در نظر گرفته شده بودند؛ به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (به ترتیب با دوز ۵۰ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند [۲۱]. سپس سر موش‌ها درون دستگاه استروتاکس قرار داده شد و بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون، درون بطن مغز آن‌ها، کانول قرار داده شد و به‌کمک سیمان دندان‌پزشکی به جمجمه متصل شد. یک هفته بعد از کانول‌گذاری، محلول Hcy به حجم ۱ میکرولیتر در مدت دو دقیقه، توسط سرنگ هامیلتون به درون بطن مغز موش‌ها تزریق شد. مقدار مؤثر Hcy برای تخریب نورونی و ایجاد آلزایمر ۰/۶ مولار (۰/۸۶ میکروگرم برای هر موش) تعیین شده است [۲۱]. به بطن مغز موش‌های گروه شم نیز یک میکرولیتر حلالHcy تزریق شد. بعد از اطمینان از القای آلزایمر، موش‌های آلزایمری به‌طور تصادفی به ۲ گروه ۱۰ تایی شامل آلزایمر کنترل وآلزایمر تمرین تقسیم شدند. موش‌هایی که به آن‌ها حلال Hcy تزریق شده بود در گروه شم قرار گرفتند. موش‌های سالم نیز به طور تصادفی در ۲ گروه سالم کنترل و سالم تمرین (۱۰ سر در هر گروه) تقسیم‌بندی شدند. با توجه به این‌که ۱۰ سر موش بعد از کانول‌گذاری و یا در طی دوره تحقیق تلف شدند؛ تعداد نمونه‌های هر گروه تا پایان مطالعه به شرح ذیل: ۱- آلزایمر کنترل (۸ سر)، ۲- آلزایمرتمرین (۸ سر)، ۳- شم (۶ سر)، ۴- سالم کنترل (۹ سر) و ۶- سالم تمرین (۹ سر) بود.

از دستگاه شاتل‌باکس (Shuttle box) برای بررسی تغییرات رفتاری و اطمینان از القای آلزایمر استفاده شد. بدین منظور از آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال (Passive avoidance test) استفاده شد. دستگاه شاتل‌باکس شامل دو اتاقک تاریک و روشن بود که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا می‌شدند. در مرحله یادگیری، موش در حالی‌که پشتش به سمت درب گیوتینی بود؛ در داخل اتاق روشن قرار می‌گرفت و ۵ ثانیه بعد درب گیوتینی بالا کشیده می‌شد. بعد از ورود موش به ناحیه تاریک، درب بسته و شوک الکتریکی (۱/۵ تا ۲ میلی‌آمپر، ۵۰ هرتز، ۱/۵ ثانیه) به کف پای حیوان اعمال می‌گردید. سپس حیوان از اتاق تاریک خارج و در قفس قرار داده می‌شد. به‌منظور ارزیابی حافظه، ۲۴ ساعت بعد از دریافت شوک الکتریکی، حیوان دوباره در داخل اتاق روشن قرار داده شد و دریچه گیوتینی باز گردید. مدت زمان سپری شده برای ورود موش به اتاق تاریک بعد از باز شدن درب، به‌صورت تأخیر زمانی در نظر گرفته شد و سقف زمانی در این مرحله ۳۰۰ ثانیه بود. طولانی‌تر بودن تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در مرحله ارزیابی حافظه، نشانه‌ی یادگیری بهتر بود. برای تأیید آلزایمری بودن، باید زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کم‌تر باشد [۲۲].

پروتکل تمرین هوازی: مجموع دوره‌ی تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته و در ۳ مرحله‌ی آشنایی، اضافه بار و تثبیت بار اجرا شد. در مرحله‌ی آشنایی (هفته اول)، موش‌ها هر روز به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه روی نوارگردان با شیب صفر درجه راه رفتند. در مرحله‌ی اضافه بار (هفته دوم تا چهارم)، به‌تدریج در طی ۳ هفته، به شدت و

مدت فعالیت افزوده شد؛ تا به میزان نهایی ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۷ متر در دقیقه رسید. در مرحله‌ی حفظ یا تثبیت (هفته پنجم تا هشتم)، تمرین با همین شدت ادامه یافت تا ۸ هفته به پایان رسید. شیب دستگاه تا پایان دوره‌ی تمرین به میزان صفر درجه ثابت باقی ماند. بر اساس تحقیق چیلی‌بک (Chilibeck) و همکاران (۱۹۹۸) این شدت تمرین معادل ۸۰-۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی یا ۷/۶ میلی‌لیتر اکسیژن در هر ۱۰۰ گرم وزن موش در هر دقیقه می‌باشد [۲۳].

تمامی آزمودنی‌ها، ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند [۲۱]. برای جمع‌آوری نمونه‌های هیپوکامپ، سر آزمودنی‌ها از ناحیه گردن توسط قیچی مخصوص جدا شد، ابتدا با استفاده از تیغ جراحی، جمجمه شکافته شده و مغز با احتیاط خارج گردید. مغز سالم توسط تیغ جراحی دقیقاً از وسط به دو نیم تقسیم شد و با توجه به مختصات هیپوکامپ به کمک اطلس پاکسینوس، هیپوکامپ از سیستم لیمبیک جدا شد. نمونه‌های هیپوکامپ جمع‌آوری شده برای اندازه‌گیری‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. لازم به ذکر است، تمامی مراحل اجرایی پژوهش شامل کانول‌گذاری، القای آلزایمر، اجرای پروتکل تمرین، کشتار و بافت‌برداری بر اساس آیین‌نامه‌ی کمیته اخلاق در پژوهش زیستی دانشگاه مازندران انجام شد.

برای اندازه‌گیری سطوح هیپوکامپی Aβ42، نپریلیزین و γ-سکرتاز، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکامپ در محلول بافر سیترات-سالین سرد قرار داده شد. سپس بافت مذکور توسط میکروهموژنایزر به‌مدت ۱۰ دقیقه هموژن شد. بافت هموژن شده سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به داخل اپندورف منتقل شد. از این محلول برای اندازه‌گیری سطوح Aβ42، نپریلیزین و γ-سکرتاز در بافت هیپوکامپ استفاده گردید. سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ به روش الایزا با استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش‌های صحرایی (ساخت کمپانی Cusabio Biotech ووهان، چین، تهیه شده از شرکت پادگین طب، تهران، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت اندازه‌گیری ۰/۲۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون آزمونی ۸/۲۰ درصد بود. سطح نپریلیزین هیپوکامپ نیز به روش الایزا و با استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش‌های صحرایی (ساخت کمپانی Cusabio Biotech ووهان، چین، تهیه شده از شرکت پادگین طب، تهران، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت اندازه‌گیری ۱۱/۷۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون آزمونی ۸/۷۰ درصد بود. هم‌چنین سطح γ-سکرتاز هیپوکامپ نیز به روش الایزا و با استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش‌های صحرایی (ساخت کمپانی Sunlong، چین) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت اندازه‌گیری ۰/۶۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون آزمونی ۷/۴۰ درصد بود. جهت اندازه‌گیری وزن موش‌ها در ابتدا و انتهای تحقیق از ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۱ گرم (ساخت شرکت Sartorius آلمان) استفاده شد.

به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. پس از مشخص شدن طبیعی بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی و برای بررسی روابط بین متغیرها از آزمون ضریب هم‌بستگی پیرسون استفاده شد. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS16 در سطح معناداری $P<۰/۰۵$ صورت گرفت.

نتایج

در جدول ۱ مقادیر میانگین و انحراف معیار مربوط به وزن و داده‌های حاصل از آزمون شاتل‌باکس مربوط به زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک آورده شده است.

بر اساس نتایج، بین زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک بین گروه‌های تحقیق تفاوت معناداری مشاهده شد (P=۰/۰۰۱). یافته‌های حاصل از آزمون تعقیبی در مورد مقایسه جفتی زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک در گروه‌های مختلف نشان داد که این شاخص در ابتدای مطالعه در گروه‌های آلزایمر کنترل و آلزایمر تمرین در مقایسه با گروه سالم کنترل (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱)، سالم تمرین (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱) و شم (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱) به طور معناداری کم‌تر بود که نشان‌دهنده تایید آلزایمری شدن موش‌های گروه‌های آلزایمر کنترل و تمرین می‌باشد.

در جدول ۲ یافته‌های آزمون آماری در خصوص مقایسه اثر تمرین هوازی بر سطوح $A\beta_{1-42}$، γ–سکرتاز، نپریلیزین در گروه‌های تحقیق ارائه شده است. بر اساس یافته‌های موجود در جدول ۲، بین میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ و γ–سکرتاز در گروه‌های تحقیق اختلاف معناداری مشاهده شد (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱)، ولی بین میانگین سطح نپریلیزین در گروه‌های تحقیق اختلاف معناداری دیده نشد (P=۰/۲۱).

سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ گروه‌های تحقیق: اطلاعات موجود در شکل ۱ نشان می‌دهد سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ در گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه‌های سالم کنترل، سالم تمرین و شم به طور معناداری بالاتر بود (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۹). از طرفی سطح این شاخص در گروه آلزایمر تمرین نسبت به آلزایمر کنترل به طور معناداری کم‌تر بود (P=۰/۰۱۹). بین سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ در گروه آلزایمر تمرین نسبت به گروه سالم تمرین و گروه سالم کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد (مقادیر P به ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۳۵).

جدول ۱. مقادیر وزن موش‌ها قبل و بعد از ۸ هفته تمرین و داده‌های حاصل از آزمون شاتل باکس (میانگین±انحراف معیار)

شاخص	گروه / زمان	سالم کنترل (۹ سر)	سالم تمرین (۹ سر)	آلزایمر کنترل (۸ سر)	آلزایمر تمرین (۸ سر)	شم (۶ سر)
وزن (گرم)	پیش آزمون	۲۱۹/۴۴ ±۱۴/۲۴	۲۱۵/۰۰ ±۱۱/۹۸	۲۲۳/۱۱ ±۱۱/۹۲	۲۲۴/۷۵ ±۱۲/۳۰	۲۲۰/۰۰ ±۱۰/۹۵
	پس آزمون	۳۰۳/۸۹ ±۲۴/۵۹	۳۰۸/۶۷ ± ۲۵/۰۸	۳۲۵/۱۱ ± ۳۸/۹۷	۳۱۹/۳۸ ± ۳۲/۰۱	۳۱۴/۱۷ ± ۳۱/۶۲
زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک (ثانیه)	پیش آزمون	# ❋ ۱۷۰/۰۳ ±۶۶/۵۶	# ❋ ۱۸۳/۷۸ ± ۸۲/۲۹	۲۴/۵۰ ± ۱۷/۲۰	۲۶/۲۲ ± ۲۰/۴۹	# ❋ ۱۶۵/۵۵ ± ۴۵/۱۰

❋ وجود تفاوت معنادار با گروه آلزایمر کنترل (P<۰/۰۵)، # وجود تفاوت معنادار با گروه آلزایمر تمرین (P<۰/۰۵)

جدول ۲. مقایسه‌ی سطوح شاخص‌های تحقیق (میانگین±انحراف معیار) در هیپوکامپ گروه‌های تحقیق و یافته‌های آزمون آنالیز واریانس

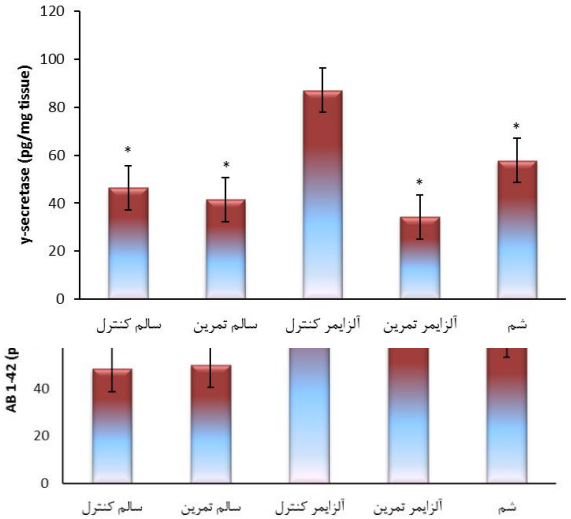
شاخص / گروه ها	سالم کنترل	سالم تمرین	آلزایمر کنترل	آلزایمر تمرین	شم	مقدار†F	مقدار‡P
آمیلوئید بتا ۴۲ (pg/mg tissue)	۴۸/۳۳±۶/۹۸	۵۰/۰۰±۱۸/۸۰	۱۰۲/۰۱±۲۰/۷۳	۶۸/۸۷±۲۱/۳۵	۶۲/۸۳±۳۳/۹۶	۹/۷۳	&۰/۰۰۱
γ–سکرتاز (pg/mg tissue)	۴۶/۵۰±۸/۱۵	۴۱/۶۱±۱۳/۵۰	۸۷/۰۳±۱۸/۶۲	۳۴/۳۷±۹/۹۸	۵۷/۸۸±۱۰/۹۸	۲۲/۰۶	&۰/۰۰۱
نپریلیزین (ng/mg tissue)	۷/۱۹±۱/۷۲	۶/۳۰±۱/۳۹	۹/۴۵±۳/۰۷	۷/۴۸±۲/۷۵	۶/۹۵±۲/۰۳	۲/۳۷	۰/۰۷

† آماره‌ی آزمون، ‡ مقدار P<۰/۰۵ از نظر آماری معنادار است، & وجود تفاوت معنادار (P<۰/۰۵) بین گروه‌های تحقیق

سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ گروه‌های تحقیق. نتایج نشان داد که سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ در گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه‌های سالم کنترل، سالم تمرین و شم به طور معناداری بالاتر بود (مقادیر P در تمام مقایسه‌ها برابر با ۰/۰۰۱). از طرفی سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ در گروه آلزایمر تمرین نسبت به آلزایمر کنترل به طور معناداری پایین‌تر

بود (P=۰/۰۰۱) ولی بین سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ در گروه آلزایمر تمرین نسبت به گروه‌های سالم کنترل و سالم تمرین تفاوت معناداری مشاهده نشد (مقادیر P به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۷۸). شکل ۲ مقادیر γ–سکرتاز هیپوکامپ گروه‌های تحقیق را نشان می‌دهد.

شکل ۱. مقایسه‌ی سطح Aβ1-42 هیپوکامپ گروه‌های تحقیق متعاقب ۸ هفته تمرین هوازی. ❋: تفاوت معنادار نسبت به گروه آلزایمر کنترل در سطح P< ۰/۰۵



شکل ۲. مقایسه‌ی سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ گروه‌های تحقیق متعاقب ۸ هفته تمرین هوازی. ❋: تفاوت معنادار نسبت به گروه آلزایمر کنترل در سطح P<۰/۰۵

سطح نپریلیزین هیپوکامپ گروه‌های تحقیق: بر اساس داده‌های موجود در جدول ۲، بین سطح نپریلیزین هیپوکامپ گروه‌های تحقیق تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۰۷).

ارتباط بین سطوح $A\beta_{1-42}$، γ–سکرتاز و نپریلیزین هیپوکامپ گروه‌های تحقیق: در جدول ۳ یافته‌های حاصل از بررسی ارتباط بین سطوح متغیرهای تحقیق را نشان می‌دهد. بر اساس یافته‌ها، بین میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ و γ–سکرتاز ارتباط مثبت معناداری مشاهده شد (P=۰/۰۰۱، r=۰/۵۴)، اما بین میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ و نپریلیزین (P=۰/۴۸، r=۰/۱۱) و سطوح γ–سکرتاز و نپریلیزین (P=۰/۱۴، r=۰/۱۹) ارتباط معناداری مشاهده نشد.

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمون ضریب همبستگی بین سطوح متغیرهای تحقیق

		آمیلوئید بتا ۴۲	γ–سکرتاز	نپریلیزین
آمیلوئید بتا ۴۲	r		۰/۵۴	۰/۱۱
	P		*۰/۰۰۱	۰/۴۸
γ–سکرتاز	r	۰/۵۴		۰/۱۹
	P	*۰/۰۰۱		۰/۱۴
نپریلیزین	r	۰/۱۱	۰/۱۹	
	P	۰/۴۸	۰/۱۴	

❋ نشانه ارتباط معنادار در سطح P< ۰/۰۵

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق محلول ۰/۶ مولار Hcy به درون بطن مغز باعث افزایش معنادار $A\beta_{1-42}$ در هیپوکامپ موش‌ها گردید. بیماری آلزایمر یک بیماری چندعاملی است که از تجمع پلاک‌های Aβ و کلافه‌های تارهای عصبی (Neurofibrillary tangles) (NFT) در مغز شناخته می‌شود [۲۴]. متاسفانه سازوکار اثر Hcy بر مغز و بیماری آلزایمر به‌طور کامل شناخته نشده است [۵،۴]. بیان شده است که هایپرهوموسیستئینمیا از طریق مستقیم (اثرات عصبی و عروقی) و غیر مستقیم (کمبود ویتامین B_{12} و فولات) می‌تواند باعث آسیب مغزی گردد [۲۵]. بر اساس نتایج مطالعه زیلبرستین (Zylberstein) و همکاران (۲۰۱۱)، راه‌های مستقیمی که Hcy می‌تواند باعث بیماری‌زایی آلزایمر شود، احتمالاً شامل استرس اکسایشی، فعال‌سازی گیرنده‌های گلوتامات، فسفوریلاسیون پروتئین تائو و تحریک تولید Aβ می‌باشد [۲۶]. در این راستا سانتاگ (Sontag) و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که اختلال در متابولیسم Hcy در محیط کشت، افزایش تجمع پروتئین تائو و Aβ را در پی دارد [۲۷]. بنابراین نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات در زمینه‌ی افزایش Aβ متعاقب افزایش Hcy، همسو می‌باشد. هر دوی میکروگلیاها و آستروسیت‌ها، پروتئین Aβ ترشح می‌کنند [۲۸]. هر چند سازوکار ایجادکننده‌ی سمیت عصبی (Neurotoxic) توسط Aβ نامشخص است، اما به‌طور

گسترده‌ای ثابت شده است که تجمع پپتید Aβ در مغز باعث القای استرس اکسایشی و التهاب عصبی می‌گردد [۲۸،۱]. نشان داده شده است که Aβ به‌عنوان یک عامل پیش‌التهابی عمل می‌کند و باعث فعال‌سازی چندین ترکیب التهابی می‌شود [۲۸]. رهایی پپتید Aβ و رسوب آن در مغز، همراه با تشکیل NFT، یک مشخصه پاتولوژیک کلیدی در بیماری آلزایمر است [۲۹].

مطالعه حاضر نشان داد که سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ در گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه‌های سالم کنترل به‌طور معناداری بالاتر بود و سطح $A\beta_{1-42}$ هیپوکامپ موش‌های آلزایمر تمرین متعاقب انجام تمرین، نسبت به موش‌های آلزایمر کنترل، به‌طور معناداری پایین‌تر بود. سطح هر پروتئین در بدن تعادلی بین تولید و پاک‌سازی آن می‌باشد و سطح Aβ موجود در مغز نیز تعادلی بین تولید و پاک‌سازی آن می‌باشد. در تحقیق حاضر مشاهده شد که سطح γ–سکرتاز گروه آلزایمر کنترل نسبت به گروه سالم کنترل به‌طور معناداری بالاتر بود. بیان شده است که تجزیه پروتئین APP، در اثر فعالیت γ–سکرتاز، باعث تولید $A\beta_{1-42}$ می‌گردد که بسیار مستعد الیگومریزه شدن می‌باشد و سمیت بسیار بالایی دارد [۳۰]. بنابراین افزایش سطح $A\beta_{1-42}$ در هیپوکامپ موش‌های آلزایمر کنترل نسبت به موش‌های سالم می‌تواند ناشی از افزایش سطح γ–سکرتاز در هیپوکامپ آن‌ها باشد. هم‌چنین نتایج نشان داد که سطح γ–سکرتاز در هیپوکامپ موش‌های آلزایمر تمرین نسبت به گروه آلزایمر کنترل به‌طور معناداری پایین‌تر بود. کاهش سطح γ–سکرتاز هیپوکامپ موش‌های آلزایمر تمرین نیز با کاهش $A\beta_{1-42}$ در هیپوکامپ موش‌های این گروه همراه بود.

به‌منظور بررسی پاک‌سازی $A\beta_{1-42}$ از هیپوکامپ آزمودنی‌ها، سطح نپریلیزین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بین سطح نپریلیزین هیپوکامپ گروه‌های تحقیق تفاوت معناداری وجود نداشت. نپریلیزین به‌عنوان اصلی‌ترین آنزیم تجزیه‌کننده‌ی Aβ مطرح می‌باشد و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی غلظت Aβ در سطوح عمل‌کردی مغز مطرح می‌باشد [۱۵،۱۴]. عدم افزایش سطح نپریلیزین به‌معنی عدم تغییر در پاک‌سازی $A\beta_{1-42}$ از هیپوکامپ آزمودنی‌های آلزایمری می‌باشد که افزایش سطح این شاخص را در پی دارد و می‌تواند به توسعه و پیشرفت آلزایمر منجر شود.

کانگ و چو (۲۰۱۴) کاهش معنادار $A\beta_{1-42}$ و افزایش پیام‌دهی انسولین را در اثر ۶ هفته تمرین نوارگردان در مغز موش‌های آلزایمری شده توسط استروپتوزوتوسین نشان دادند. آن‌ها پیشنهاد کردند که کاهش پیام‌دهی انسولین با افزایش میزان γ–سکرتاز همراه است که افزایش Aβ را در پی دارد و بهبود پیام‌دهی انسولین، احتمالاً از طریق تعدیل γ–سکرتاز کاهش Aβ را باعث شده است [۱۸]. لیو و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تعداد و اندازه پلاک‌های Aβ در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری پس از ۵ ماه تمرین روی نوارگردان کاهش معناداری یافت. هم‌چنین سطح $A\beta_{1-42}$ نیز در اثر تمرین روی نوارگردان کاهش معناداری یافت. محققین این‌گونه نتیجه‌گیری کردند که احتمالاً تمرین نوارگردان از مسیرهای آمیلوئیدژنیک جلوگیری می‌کند و تجزیه APP را به سمت مسیر غیرآمیلوئیدژنیک تعدیل می‌کند و لذا پیشنهاد کردند که تمرین می‌تواند اثر مهاری بر سطح Aβ داشته باشد [۱۹]. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، بین میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ و γ–سکرتاز ارتباط مثبت معناداری مشاهد شد. در واقع به نظر می‌رسد تمرین ورزشی ازطریق کاهش γ–سکرتاز که مسیر آمیلوئیدژنیک می‌باشد، باعث کاهش میزان Aβ می‌گردد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق لیو و همکاران (۲۰۱۳) همسو می‌باشد. یوم و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که ۱۶ هفته دویدن روی نوارگردان موجب کاهش معنادار سطح پروتئین Aβ42 مغز موش‌های آلزایمری می‌شود. نتایج آن‌ها نشان داد که گروه کنترل آلزایمر نسبت به گروه کنترل غیرآلزایمر، دارای سطوح بالاتری از Aβ42 بودند. با این وجود، این سطوح در موش‌هایی که ۱۶ هفته دویدند؛ به‌طور معناداری پایین‌تر بود [۳۱] که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. با این وجود، در مطالعه‌ای یودا و همکاران (۲۰۰۹)، به دنبال ۴ ماه دویدن موش‌های تراریخته‌ی

آلزایمری به‌صورت اختیاری و اجباری (معادل با فعالیت گروه اختیاری)، با وجود مقداری کاهش، هیچ تفاوت معناداری در سطوح $A\beta_{1-42}$، $A\beta_{1-40}$ قشر و هیپوکامپ مغز گروه‌های کنترل و تمرینی وجود نداشت [۲۰]. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر ناهمسو می‌باشد.

درباره تغییرات سطح Aβ و متابولیسم آن در اثر تمرین، نظریه‌های مختلفی وجود دارد. نشان داده شده است که تجمع Aβ در موش‌های تراریخته‌ی آلزایمری، فعالیت پروتئازوم‌ها (مثل نپریلیزین و IDE) را محدود کرده و بنابراین تجزیه Aβ را مختل می‌کند و افزایش سطح آن را در پی دارد. هم‌چنین مهار تولید Aβ از طریق مهار فعالیت γ–سکرتاز، افزایش فعالیت پروتئولیتیک مجموعه پروتئازوم‌ها را در پی دارد [۳۲]. ادلارد (Adlard) و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی تأثیر ۵ ماه تمرین اختیاری بر سطوح Aβ40، Aβ42، γ–سکرتاز و نپریلیزین، بیان داشتند که احتمالاً تمرین ورزشی می‌تواند متابولیسم APP و آبشار Aβ را در راستای کاهش تولید Aβ میانجی‌گری کند، ولی تأثیری بر سطح نپریلیزین قشر موش‌های تراریخته‌ی آلزایمری ندارد [۳۳]. از طرف دیگر لازاروف (Lazarov) و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی تأثیر محیط غنی‌شده (Enriched environment) بر سطح و تجمع Aβ و عوامل مؤثر در تجمع آمیلوئید در موش‌های تراریخته‌ی آلزایمری پرداختند. آن‌ها به‌مدت ۳ ساعت در روز و برای یک ماه موش‌ها را در معرض محیطی شامل چرخ‌دوار (تمرین اختیاری)، تونل‌های رنگ شده، اسباب‌بازی و مواد قابل جویدن قرار دادند. محیط غنی‌شده باعث کاهش معنادار سطح Aβ در مغز در مقایسه با موش‌های محیط معمولی شد. میزان فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی Aβ شامل نپریلیزین و IDE، در مغز موش‌های قرار داده شده در محیط غنی‌شده در مقایسه با موش‌های محیط معمولی، از سطح بالاتری برخوردار بود [۳۴]. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر نیز بین سطوح $A\beta_{1-42}$ و γ–سکرتاز هیپوکامپ بعد از ۸ هفته تمرین هوازی ارتباط مثبت معناداری مشاهده شد، اما بین سطوح $A\beta_{1-42}$ و نپریلیزین ارتباط معناداری مشاهده نشد که این احتمال مطرح شده توسط ادلارد و همکاران [۳۳] را مورد تأیید قرار می‌دهد.

از طرف دیگر با توجه به این‌که فعالیت ورزشی بسیاری از فرآورده‌های ژنی را هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین تعدیل می‌کند، القاءکننده‌ی تغییرات آناتومیکی، عصبی شیمیایی و الکتروفیزیولوژیکی افزایش‌دهنده‌ی شکل‌پذیری نورونی می‌باشد [۳۵]، این احتمال وجود دارد که چندین مسیر به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم برای تنظیم سطح آمیلوئیدبتا فعال باشد. به‌عنوان مثال یک احتمال این است که ورزش می‌تواند فعالیت پروتئازوم (Proteasome) را به‌طور مثبت تنظیم کند و در نتیجه می‌تواند تخریب قطعات ناشی از APP (که Aβ نیز یکی از آن‌ها می‌باشد) را در پی داشته باشد [۳۶]. از طرف دیگر باکر (Baker) و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کردند که ورزش ممکن است افزایش‌دهنده‌ی تجزیه‌ی APP باشد [۳۷]. یعنی تمرین ورزشی از طریق افزایش پروتئولیز APP از مسیرهای غیرآمیلوئیدژنیک باشد. احتمال دوم این است که ورزش به‌طور مستقیم متابولیسم APP را با استفاده از افزایش فعالیت نورونی تعدیل می‌کند. به عنوان مثال، پردازش APP می‌تواند توسط پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) (Mitogen-activated protein kinases) و فسفولیپاز C افزایش یابد و این مسیرها از طریق ورزش فعال می‌شوند [۳۶]. از طرف دیگر فعالیت کولینرژیک با ورزش افزایش می‌یابد و تنظیم سیستم کولینرژیک توسط ورزش در شکل‌پذیری نورونی ناشی از ورزش دخالت دارد [۳۵]. احتمالاً فعالیت ورزشی می‌تواند اختلالات رفتاری را با کاهش مقادیر پپتید $A\beta_{1-42}$ از طریق افزایش ساخت عامل‌های نوروتروفیک NGF (Nerve growth factor)، BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) و IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)) که برای بقاء و تکثیر نورونی و شکل‌پذیری سیناپسی دارای اهمیت هستند، بهبود بخشد [۳۸]. در یک مطالعه گزارش شده است که سطح سیتوپلاسمی نشانگرهای آپوپتوزی مثل: سیتوکروم C (Cytochrome C)، کسپیس–۹ (Caspase-9)، کسپیس–۳ و

پروتئینِ بَکس (Bax protein) در مغز موش‌های آلزایمری فعّال نسبت به موش‌های آلزایمری غیر فعال به‌طور معناداری کم‌تر است. در موش‌های آلزایمری، کاهش پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی (Pro-apoptotic) به‌طور نظام‌مندی با کاهش سطح پروتئین Aβ مرتبط است [۳۱]. از طرفی کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با بیماری‌های مختلف عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر مرتبط می‌باشد. فعالیت ورزشی منظم، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به‌طور معناداری بهبود و خطر آلزایمر را کاهش می‌دهد [۳۹]. در این راستا نشان داده شده است که سطح سوپراکسایددیس‌موتاز (Superoxide dismutase) (SOD-1) و پروتئین کاتالاز در مغز موش‌های آلزایمری فعال نسبت به غیر فعال افزایش معناداری دارد. این تغییرات با کاهش پروتئین‌های آپوپتوزی و افزایش پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (Heat shock protein 70) (Hsp70) و BDNF مرتبط می‌باشد که با استفاده از فعالیت ورزشی منظم در مغز القاء شده و سپس با استفاده از کاهش بالینی پپتیدهای $A\beta_{1-42}$ در موش‌های آلزایمری، میانجی‌گری شدند [۳۱]. نتایج این تحقیقات پیشنهاد می‌کند که فعالیت ورزشی منظم، آپوپتوز نورون عصبی را که در بیماری‌زایی آلزایمر دخالت دارند، از طریق افزایش تخریب یا پاک‌سازی Aβ، تضعیف می‌کند [۳۷]. با توجه به این‌که از بین متغیرهای مطرح‌شده در بالا که منجر به کاهش سطح Aβ متعاقب تمرین می‌شوند؛ در مطالعه حاضر تنها سطوح γ–سکرتاز و نپریلیزین مورد بررسی قرار گرفت، بنابراین لازم است که تفسیر یافته‌ها با احتیاط بیش‌تری صورت گیرد.

در مجموع با توجه به این‌که بسیاری از تلاش‌های درمان دارویی برای آلزایمر، به مهار γ–سکرتاز و کاهش Aβ تمرکز کرده‌اند و استفاده از داروهای مختلف عموماً هر کدام اثرات جانبی چندی را دارا می‌باشند. لذا با توجه به این‌که تمرین ورزشی هوازی نیز می‌تواند از طریق کاهش سطح γ–سکرتاز به کاهش سطح Aβ در مغز آزمودنی‌های آلزایمری منجر شود، بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی مکمل در بیماران آلزایمری مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزش دانشگاه بیرجند می باشد. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از پرسنل محترم آزمایشگاه زیست شناسی دانشکده علوم پایه و آزمایشگاه کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه مازندران به عمل می آورند.

منابع

[1] Souza LC, Filho CB, Goes AT, Fabbro LD, de Gomes MG, Savegnago L, et al. Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β-amyloid1–40 peptide. Neurotox Res 2013; 24: 148-163.

[2] Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest 1986; 77: 1370-1376.

[3] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. N Engl J Med 2002; 346: 476-483.

[4] Cascalheira JF, João SS, Pinhanços SS, Castro R, Palmeira M, Almeida S, et al. Serum homocysteine: interplay with other circulating and genetic factors in association to Alzheimer's type dementia. Clin Biochem 2009; 42: 783-790.

[5] Pacheco-Quinto J, Rodriguez de Turco EB, DeRosa S, Howard A, Cruz-Sanchez F, Sambamurti K, et al. Hyperhomocysteinemic Alzheimer's mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid beta peptide levels. Neurobiol Dis 2006; 22: 651-656.

[6] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. Science 1997; 275: 630-631.

[7] Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci 2000; 23: 542-549.

[8] Fraser ON, Bugnyar T. Ravens reconcile after aggressive conflicts with valuable partners. PLoS One 2011; 6: e18118.

[9] Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. J Physiol 2006; 575: 5-10.

[10] Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. Nature 1993; 361: 260-263.

[11] Wilson CA, Doms RW, Lee VM. Intracellular APP processing and A [beta] production in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 1999; 58: 787-794.

[12] Zafra F, Lindholm D, Castren E, Hartikka J, Thoenen H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. J Neurosci 1992; 12: 4793-4799.

[13] Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T. Neprilysin and Aβ clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci 2013; 5: 98.

and late-life dementia in women. A prospective population study. Neurobiol Aging 2011; 32: 380-386.

[27] Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E, Dayal S, et al. Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. J Neurosci 2007; 27: 2751-2759.

[28] Uslu S, Akarkarasu ZE, Ozbabalik D, Ozkan S, Çolak O, Demirkan ES, et al. Levels of amyloid beta-42, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer's disease and vascular dementia. Neurochem Res 2012; 37: 1554-1559.

[29] Shea YF, Ha J, Chu LW. Comparisons of clinical symptoms in biomarker-confirmed Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal dementia patients in a local memory clinic. Psychogeriatrics 2014.

[30] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 101-112.

[31] Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, et al. Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. Int J Mol Med 2008; 22: 529-539.

[32] Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. J Neurosci 2006; 26: 4277-4288.

[33] 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: 4217-4221.

[34] Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnics Z, et al. Environmental enrichment reduces Aβ levels and amyloid deposition in transgenic mice. Cell 2005; 120: 701-713.

[35] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci 2002; 25: 295-301.

[36] Lu B, Chow A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. J Neurosci Res 1999; 58: 76-87.

[37] 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: 569-579.

[38] Trejo JL, Carro E, Torres-Alemán 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: 1628-1634.

[39] Somani SM, Ravi R, Rybak L. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. Pharmacol Biochem Behav 1995; 50: 635-639.

[14] Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? Int J Alzheimers Dis 2012; 2012: 383796.

[15] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. Science 2001; 292: 1550-1552.

[16] Pope SK, Shue VM, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease?. Annu Rev Public Health 2003; 24: 111-132.

[17] Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, et al. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 3440-3445.

[18] 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: 89-96.

[19] Liu HL, Zhao G, Zhang H, Shi LD. 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.

[20] 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: 426-432.

[21] Hosseinzadeh S, Dabidi Roshan V, Pourasghar M. Effects of intermittent aerobic training on passive avoidance test (shuttle box) and stress markers in the dorsal hippocampus of wistar rats exposed to administration of homocysteine. Iran J Psychiatry Behav Sci 2013; 7: 37-44.

[22] Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Kazeminejad B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. Pharmacol Biochem Behav 2010; 96: 378-385.

[23] Chilibeck PD, Bell GJ, Farrar RP, Martin TP. Higher mitochondrial fatty acid oxidation following intermittent versus continuous endurance exercise training. Can J Physiol Pharmacol 1998; 76: 891-894.

[24] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 2002; 297: 353-356.

[25] Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Montesi F, Tumini E, et al. Blood inflammatory markers and risk of dementia: the conselice study of brain aging. Neurobiol Aging 2007; 28: 1810-1820.

[26] Zylberstein DE, Lissner L, Björkelund C, Mehlig K, Thelle DS, Gustafson D, et al. Midlife homocysteine

Effects of eight weeks aerobic training on levels of amyloid β42, neprilysin and γ- secretase in the hippocampus of male rat Alzheimer's model by homocysteine injection

Ali Yaghoubi (Ph.D student) [1], Marziyeh Saghebjoo (Ph.D)[*1], Zia Fallah-Mohammadi (Ph.D)[2], Mehdi Hedayati (Ph.D)[3], Akbar Hajizadeh Moghaddam (Ph.D)[4]

1 - Dept. of Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

2 - Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

3 - Research Institute for Endocrine Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, University Mazandaran, Babolsar, Iran

(Received: 22 Jul 2015; Accepted: 10 Feb 2016)

Introduction: The aim of present study was to investigate the effects of eight weeks aerobic training on amyloid β42 ($A\beta_{1-42}$), neprilysin and γ-secretase levels in the hippocampus of male rat Alzheimer's model by homocysteine injection.

Materials and Methods: For this purpose, 50 male Wistar rats (12 weeks old) were divided into five groups, including: Alzheimer's control, Alzheimer's training, healthy control, healthy training and sham. To induce Alzheimer's, homocysteine, with a concentration of 0.6M, was infused into the rat cerebroventriculum. To assess the memory impairment induced by homocysteine, the shuttle box test was used. Training groups, exercised using treadmill with 27m/min at 0◦ slope (75-80% VO2max, 60min/day, 5 days/week). Amyloid β42, neprilysin and γ- secretase levels were measured using rat ELISA kit. ***Results:*** The results showed that Aβ1-42 levels in the hippocampus of Alzheimer's control group was significantly higher than healthy control and healthy training group (P=0.001). The level of γ- secretase in Alzheimer's control group was significantly higher than healthy control, healthy training and sham groups (P=0.001). Likewise, levels of this factor in Alzheimer's training group were significantly lower than Alzheimer's control group (P=0.001). No significant differences were found between neprilysin levels in different groups (P=0.07). Mean level of Aβ1-42 showed a significant positive correlation with γ- secretase level (r = 0.54; P = 0.001).

Conclusion: Based on these results, it s likely that continuous physical training can markedly reduce Aβ level in the hippocampus through reducing the level of γ- secretase and would be warrant to be considered as a complementary therapy in Alzheimer's disease.

Keywords: Exercise Therapy, Alzheimer Disease, Neprilysin, Homocysteine

* Corresponding author. Tel: +98 56 32202042

m_saghebjoo@birjand.ac.ir