

اثر تمرینات هوازی تداومی بر مقادیر کلاسترین هیپوکامپ، کارایی حافظه و عملکرد ورزشی در موش‌های صحرایی سالمند مدل بیماری آلزایمر

آیلار فتحی^۱، رقیه فخرپور^۲، سیمین نامور آغداش^۳

چکیده

اهداف: آلزایمر (AD) یک بیماری مزمن تخریب کننده سلول‌های عصبی می‌باشد که در نهایت توانایی انجام ساده‌ترین کارها را از بین می‌برد. آلزایمر از تجمع پپتیدهای آمیلوئید-بتا (Aβ) در مغز ایجاد شود. کلاسترین (CLU) با Aβ تعامل داشته و پاکسازی آن از مغز را تنظیم می‌کند. هدف تحقیق حاضر مطالعه اثر شش هفته تمرینات هوازی تداومی بر مقدار CLU، کارایی حافظه و عملکرد ورزشی بود.

روش مطالعه: تعداد ۴۰ سر رت نر سالمند (۱۱ ماهه) نژاد به طور تصادفی به چهار گروه شامل گروه بیمار تمرین، بیمار کنترل، سالم تمرین و سالم کنترل تقسیم شدند. رت‌ها به مدت شش هفته با تکرار پنج جلسه در هر هفته، تمرین ورزشی را انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه، بافت برداری از مغز انجام و نمونه‌ها جمع‌آوری شد. CLU به روش الایزا، عملکرد حافظه با تست تشخیص شیء جدید و عملکرد ورزشی با تست حداکثر ظرفیت ورزشی اندازه‌گیری شد. برای بررسی اثر تمرین از آزمون تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد سطح معنی داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: مقدار CLU در هیپوکامپ در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل کاهش معناداری ($P \leq 0/05$) داشت. همچنین بهبود معنادار عملکرد حافظه در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل ($P \leq 0/05$) و افزایش عملکرد ورزشی در گروه‌های بیمار تمرین و سالم تمرین نسبت به گروه‌های کنترل مشاهده شد ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش، تمرینات هوازی تداومی در طول شش هفته، باعث بهبود کارایی حافظه و عملکرد ورزشی و همچنین کاهش کلاسترین در هیپوکامپ موش‌های صحرایی سالمند می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، کلاسترین، حافظه، تمرین هوازی تداومی

^۱ کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

^۲ استادیار گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، نویسنده مسئول:

r.fakhrpour@yahoo.com

^۳ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران.

مقدمه

کاهش وزن مغز با افزایش سن و با آتروفی شکنج دندانه‌دار در هیپوکمپ، همراه با کاهش تعداد نورون‌ها و حجم ماده سفید همراه است (۱). در واقع در طول دوره پیری، چندین فرآیند تخریب در ساختار و عملکرد مغز از جمله؛ کاهش پرفیوژن خون، اختلال در انتقال عصبی، آتروفی قشر مغز و زوال شناختی رخ می‌دهد. در حقیقت پیری به طور بدیهی باعث می‌شود که افراد مسن مستعد ابتلا به آلزایمر باشند که یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی در سطح جهان است (۲). رایج‌ترین علامت اولیه این بیماری فراموش کردن اتفاقات تازه یا به سختی به یادآوردن آن‌هاست (۳). در واقع بیماری آلزایمر زمانی اتفاق می‌افتد که، در طی یک امر غیر طبیعی پروتئینی به نام آمیلوئید در مغز ساخته می‌شود. مقادیر میکروسکوپی این آمیلوئید در لایه‌های بیرونی مغز قرار می‌گیرند و توده‌هایی به نام پلاک‌های آمیلوئیدی را ایجاد می‌کند. نتیجه تشکیل این پلاک‌ها، مختل کردن عملکرد و فعالیت شیمیایی عادی مغز بوده که منجر به کاهش معنادار نورون‌های عصبی می‌شود که نتیجه این اتفاقات، کاهش پیشرونده عملکرد مغز می‌باشد. در واقع تجمع آمیلوئید بتا ($A\beta$) در مغز در نتیجه عدم تعادل در تولید و پاکسازی آن از مغز ایجاد می‌شود (۴). مکانیسم‌های مختلفی برای پاکسازی $A\beta$ پیشنهاد شده است، از جمله انتقال $A\beta$ با واسطه گیرنده از طریق سد خونی مغزی و تخریب $A\beta$ با واسطه آنزیم. علاوه بر این، پاسخ‌های ایمنی از قبل موجود به $A\beta$ نیز ممکن است در پاکسازی $A\beta$ نقش داشته باشد (۵). دو آپولیپوپروتئین اصلی مغز، آپولیپوپروتئین E ($APOE$) و آپولیپوپروتئین J ($APOJ$)، که به عنوان کلاسترین^۱ (CLU) نیز شناخته می‌شود، با $A\beta$ تعامل داشته و پاکسازی آن از مغز را تنظیم می‌کنند (۶). به طور خاص، $A\beta$ در سراسر سد خونی مغزی به عنوان یک پپتید آزاد پاک می‌شود و/یا به آپولیپوپروتئین‌های E2 و E3 متصل می‌شود، در واقع CLU پاکسازی $A\beta$ را در سراسر سد خونی مغزی واسطه می‌کند (۷).

کلاسترین (آپولیپوپروتئین J) یک دی‌سولفید چند منظوره است. همچنین این گلیکوپروتئین هترودیمیری متشکل از دو زیر واحد ۴۰ کیلو دالتونی است. در واقع ژن مجرد واقع در کروموزوم ۸ یک تک mRNA را تولید می‌کند که یک زنجیره ۴۴۹ اسید آمینه حاوی توالی رهبر و زیر واحدهای a و b است (۸). به عبارت دیگر ژن CLU یک ژن به خوبی حفظ شده در طول تکامل است که در انسان در کروموزوم ۸ ($\text{p}12\text{-p}21$) قرار دارد و در طول رگرسیون بافتی در بسیاری از اندام‌ها بیان می‌شود. بیان بیش از حد آن باید به عنوان یک پاسخ سلولی غیر اختصاصی به طیف گسترده‌ای از اختلالات بافتی در نظر گرفته شود (۹). mRNA کلاسترین تقریباً در تمام بافت‌های پستانداران وجود دارد. غلظت طبیعی آن در پلاسما بین ۳۵ تا ۱۰۵ mg/ml است و عمدتاً در لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا توزیع می‌شود (۸). در شرایط پاتولوژیک، یک پروتئین مرتبط با آمیلوئید است که با رسوبات فیبریلا در اختلالات سیستمیک و موضعی آمیلوئید همراه می‌شود. در بیماری آلزایمر، کلاسترین در پلاک‌های آمیلوئید و رسوبات عروق مغزی وجود دارد اما به ندرت در نورون‌های حاوی NFT دیده می‌شود. بیان CLU ممکن است یک پاسخ دفاعی در برابر آسیب موضعی به نورون‌ها باشد. چهار مکانیسم عمل مختلف را می‌توان برای توضیح نقش CLU به عنوان یک محافظ عصبی در طول استرس سلولی فرض کرد: (الف) عملکرد به عنوان یک سیگنال ضد آپوپتوز، (ب) محافظت در برابر استرس اکسیداتیو، (ج) مهار مجموعه حمله غشایی پروتئین‌های مکمل به طور موضعی که در نتیجه التهاب فعال می‌شوند، و (د) به نواحی آبرگیز پروتئین‌های نیمه باز

¹ Clusterin

شده و تحت فشار متصل می‌شوند و بنابراین از تجمع به شیوه‌ای چاپرون مانند جلوگیری می‌کنند. در نهایت این عامل از تجمع و فیبریل شدن $A\beta$ جلوگیری می‌کند و حمل و نقل سد خونی مغزی آن را در اندوتلیوم عروقی مغز تعدیل می‌کند (۸).

با استفاده از یک مدل مغز کوچک هندی، اخیراً شواهد اولیه ای به دست آمده است که کلاسترین (ApoJ) انتقال کمپلکس‌های SA beta (1-40)-apoJ را در سراسر سد خونی مغزی و سد مایع خونی مغزی نخاعی تسهیل می‌کند و به عنوان محافظ در برابر پاتوژن بیماری الزایمر عمل می‌کند (۱۰). در واقع کلاسترین برای تا کردن یا تغییر پیکربندی پروتئین‌های سوبسترا نیست بلکه آنها را در حالتی مناسب برای تا زدن مجدد توسط دیگر پروتئین‌ها، تثبیت می‌کند به ویژه پروتئین‌های شوک حرارتی. همچنین کلاسترین خارج سلولی با رسوبات آمیلوئید در داخل بدن متصل و همراه می‌شود. طی مطالعات نشان داده شده که کلاسترین به طور موثر مانع از تجمع اشکال محلول پپتیدهای $A\beta$ و ته نشین شدن آنها به پلاک‌های پیری می‌شود (۱۱). با این حال در مغز مبتلا به آلزایمر، این اثر محافظت کننده عصبی ممکن است بسته به غلظت $A\beta$ تغییر کند. زمانی که نسبت کلاسترین به $A\beta$ بالا است، غلظت کلاسترین اثر مهاری بر تشکیل پلاک دارد. اما وقتی این نسبت کم باشد، کلاسترین پروآمیلوئیدوژنیک است و تا حدی استرس اکسیداتیو را القا می‌کند (۱۲).

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در فهم مکانیسم‌های مرتبط با پیشرفت بیماری آلزایمر، هنوز داروهای موثر متوقف‌کننده بیماری، ناشناخته است (۱). داروهایی که به طور معمول در کنترل التهاب استفاده می‌شوند به علت عدم نفوذ از سد خونی مغزی، کمتر در مغز مؤثر واقع شده‌اند. از آنجایی که بسیاری از فرآیندهای التهابی در مغز مفید می‌باشد کنترل التهاب به جای سرکوب التهاب روش کارآمدتری در راهبردهای درمانی خواهد بود (۱۳). تمرینات ورزشی منظم به طور کلی برای سلامت انسان و حیوانات مفید هستند و همچنین در افراد، در سنین مختلف، با یا بدون بیماری‌های تخریب کننده عصبی یا آسیب مغزی، باعث بهبود عملکرد شناختی می‌شوند (۱۴). شواهد رو به رشد از ارزش ورزش منظم بدنی برای جلوگیری از بیماری آلزایمر و کاهش عملکرد شناختی در بیماران مبتلا حمایت می‌کند. ورزش همچنین از طریق افزایش فاکتورهای متابولیکی و میوکین‌های مشتق از ماهیچه که به نوبه ی خود تولید نوروتروفین‌ها مانند نوروتروفیک مشتق از مغز را تحریک می‌کند، باعث تقویت نورونز می‌شود. ورزش منظم اثرات ضد التهابی دارد و وضعیت ردوکس مغز را بهبود می‌بخشد، در نتیجه علائم پاتوفیزیولوژیک بیماری آلزایمر مانند رسوب $A\beta$ را بهبود می‌بخشد و از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند (۱۵). آنچه ضرورت انجام پژوهش حاضر را تقویت می‌کند این است که، آیا تمرینات هوازی تداومی می‌تواند با تنظیم مقدار CLU در مغز و بهبود کارایی حافظه و عملکرد ورزشی، فرایند ایجاد بیماری آلزایمر را کند کرده و یا این بیماری را بهبود بخشد؟ موضوع مهم دیگر، تعیین نوع فعالیت ورزشی موثر در بهبود این بیماری است. در واقع لازم است که بهترین نوع ورزش، فرکانس مطلوب، شدت و مدت زمان برای بیماران مبتلا به آلزایمر انجام شود تا نتایج مطلوب حاصل شود (۱۶). لیو و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که پنج ماه ورزش با تردمیل باعث تقویت یادگیری و حافظه می‌شود. نتایج این تحقیق بیشتر ارزش پیشگیرانه دویدن در مقابل توسعه آلزایمر را پیشنهاد کرد (۱۷). پینتو و همکاران (۲۰۲۲) نیز در تحقیقات جدید خود، بیان کردند که پلاسمای موش دونده حاوی عواملی است، به ویژه، CLU که باعث کاهش التهاب عصبی هیپوکامپ می‌شود و ممکن است اثرات مفید ورزش را برای عملکرد مغز واسطه کند. همچنین منجر به افزایش نورونز و گلیونز هیپوکامپ، بهبود و حفظ حافظه و افزایش بیان ژن‌های مهم برای

یادگیری و حافظه در هیپوکامپ می‌شود (۱۸). همچنین در طی مطالعه‌ای توسط دارویش و همکاران (۲۰۲۲) برای بررسی مکانیسم‌هایی که ممکن است واسطه تأثیر ورزش بر شناخت در آلزایمر باشند، محققان دریافتند که اثرات ورزش ممکن است با واسطه کاهش در التهاب عصبی، به دلیل تنظیم مثبت مهارکننده‌های آبشار کمپلمان، و به ویژه با مهار آبشار مکمل مولکولی به نام کلاسترین باشد (۱۹). در حقیقت کلاسترین به‌عنوان یک پروتئین پلاسمایی جدید ناشی از ورزش و واسطه‌ای اثرات ضد التهابی پلاسمایی ورزش بر روی هیپوکامپ است و مقدار آن ارتباط مثبتی با مزایای عملکردی ورزش در انسان دارد. در واقع در بیماران مبتلا به آلزایمر و MCI، سطح پلازما کلاسترین احتمالاً به‌عنوان یک مکانیسم جبرانی افزایش می‌یابد. مهار محیطی کلاسترین از سیستم کمپلمان ناشی از ورزش ممکن است به اثرات مفید ورزش در بیماری‌های عصبی یا پیری کمک کند (۱۴). در مقابل، در مطالعه‌ی دیگری توسط میگائیل و همکاران (۲۰۲۱)، بیماران مبتلا به اختلال شناختی که به مدت ۶ ماه در تمرینات ساختاری شرکت کردند، سطوح پلاسمایی CLU بالاتری داشتند که با بهبود استقامت و ظرفیت هوازی ارتباط مثبت داشت (۲۰). با وجود اطلاعات نسبتاً متوازن در مورد آثار فعالیت بدنی منظم بر بهبود کیفیت زندگی و جنبه‌های مختلف آن در انواع بیماری‌ها، تحقیقات زیادی در رابطه با تأثیر فعالیت هوازی بر تغییرات مقدار کلاسترین در بیماران مبتلا به آلزایمر انجام نگرفته و از پژوهش‌های انجام شده، نتایج ضد و نقیص بدست آمده است. تحقیق حاضر درصدد پاسخ به این پرسش است که آیا تمرینات هوازی تداومی به مدت شش هفته می‌تواند بر مقدار کلاسترین، کارایی حافظه و عملکرد ورزشی، در رت‌های سالمند مبتلا به آلزایمر تأثیر گذار باشد؟

روش‌شناسی تحقیق

این پژوهش از نوع تجربی با مدل حیوانی بود. ۴۰ سر رت سالمند (۱۱ ماهه) نژاد ویستار با میانگین وزنی ۳۲۵ گرم از مرکز انستیتو پاستور تهران تهیه خریداری و به آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان منتقل شدند. در مدت اجرای پژوهش، تعداد سه سر رت در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذا و طبق چرخه‌ی ۱۲ ساعت خواب و بیداری نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق، در محدوده 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد و شرایط نگهداری و کار با حیوانات براساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. بعد از گذشت دو هفته و ایجاد سازگاری با محیط، حیوانات به طور تصادفی در ۲ گروه شامل: گروه سالم و گروه بیمار تقسیم شدند. سپس گروه سالم به ۲ گروه: سالم کنترل (۱۰ سر) و سالم تمرین (۱۰ سر) و گروه بیمار نیز به ۲ گروه: بیمار کنترل (۱۰ سر) و بیمار تمرین (۱۰ سر)، تقسیم شدند. تعداد ۲۰ سر از رت‌ها به‌عنوان گروه بیمار با تزریق اسکوپولامین در طی ۱۴ روز به آلزایمر مبتلا شدند. همچنین گروه‌های تمرین در یک برنامه تمرینی هوازی ۶ هفته‌ای شرکت کردند ولی گروه‌های کنترل در این مدت در هیچ‌گونه تمرینی شرکت نکردند.

نحوه القای آلزایمر

تزریق اسکوپولامین برای القای آلزایمر، روزانه به میزان (۳mg/kg) به صورت داخل صفاقی و حل شده در محلول نرمال سالین و دی سولفواکساید به مدت ۱۴ روز انجام شد (۲۱). جهت اطمینان از القای آلزایمر، از حیوانات آزمون تشخیص شی جدید گرفته شد تا اطمینان از کاستی حافظه به دست آید. همچنین برای وزن کردن حیوانات قبل از شروع دوره تزریق از ترازوی مخصوص رت ساخت آلمان استفاده شد. وزن کردن رت‌ها برای محاسبه دوز داروی تزریقی برای القای آلزایمر انجام گرفت.

آزمون تشخیص شیء جدید

اجرای آزمون تشخیص شیء جدید، شامل ۴ مرحله در ۴ روز بود. روز اول هر رت به مدت پنج دقیقه در یک محوطه به طول ۶۵ و عرض ۴۵ و ارتفاع ۴۵ سانتی متر قرار گرفت و به صورت آزادانه محیط خالی را بررسی کرد. در این مرحله هیچ شیئی در اطراف قرار داده نشد. بعد از ۵ دقیقه حیوان به قفس برگردانده شد. ۲۴ ساعت بعد، در مرحله دوم، دو شیء یکسان از نظر ظاهری (رنگ، شکل و بافت) در گوشه‌های مخالف و قرینه اطراف به فاصله ده سانتی متر از دیواره قرار داده شد و هر رت به مدت ۱۰ دقیقه با اشیای یکسان آشنا شد. در روز سوم هم همین کار تکرار شد. در مرحله آخر در روز چهارم، از رت‌ها تست حافظه گرفته شد. به این صورت که یکی از اشیائی که در اطراف بود با یک شی جدید که دارای خصوصیات ظاهری متفاوت بود تعویض شد و موش در اطراف قرار داده شد. رت‌های سالم مدت زمان بیشتری را برای بررسی شی جدید صرف کردند. جلسات برای تجزیه و تحلیل بعدی ضبط شدند. مدت زمانی که هر حیوان به طور فعال برای بررسی اشیاء صرف کرد به صورت دستی امتیازدهی شد. و اختلاف زمان دو بررسی به عنوان حافظه تشخیص شی جدید در نظر گرفته شد (۳۲). داده‌های این آزمون در چندین مرحله شامل: قبل از تزریق اسکوپولامین و القای آلزایمر، بعد از تزریق و القای آلزایمر و بعد از اتمام تمرینات، از گروه‌های سالم و بیمار جمع آوری شد.

فعالیت ورزشی هوازی تداومی

از آنجایی که نمونه تحقیق حاضر را رت‌های سالمند تشکیل داده‌اند، استفاده از تمرینات هوازی تداومی با شدت متوسط مناسب‌تر به نظر می‌رسد. این تمرینات عموماً شامل ۲۰ تا ۶۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی هستند (۲۲). حیوانات پس از گذراندن یک هفته مرحله آشنایی با تردمیل، پروتکل تمرین را پنج روز در هفته به مدت شش هفته انجام دادند. تمام جلسات شامل یک دقیقه گرم کردن و یک دقیقه سرد کردن با سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود. در هفته ی اول پس از گرم کردن، موش‌ها با سرعت ۱۷ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه دویدند. جهت رعایت اصل اضافه بار، حجم تمرین تا ۲ دقیقه در هر جلسه افزایش یافت و هفته آخر به ۶۰ دقیقه رسید (۲۳).

جدول ۱. جزئیات پروتکل تمرین هوازی تداومی به اجرا در آمده

هفته	سرعت	مدت	تعداد جلسات در هفته
۱	۱۷ متر در دقیقه	۲۰ تا ۲۸ دقیقه	۵
۲	۱۷ متر در دقیقه	۳۰ تا ۳۸ دقیقه	۵
۳	۱۷ متر در دقیقه	۴۰ تا ۴۸ دقیقه	۵
۴	۱۷ متر در دقیقه	۵۰ تا ۵۸ دقیقه	۵
۵	۱۷ متر در دقیقه	۶۰ دقیقه	۵
۶	۱۷ متر در دقیقه	۶۰ دقیقه	۵

روش نمونه گیری و اندازه گیری متغیرها

پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها توسط کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوشی عمیق داده شدند. سپس عمل پرفیوژن به منظور خارج سازی خون از مغز صورت گرفت و پس از مرگ حیوان، مغز استخراج و هیپوکامپ جداسازی شد. بافت‌ها در ۷۰- درجه سانتیگراد منجمد و به آزمایشگاه تحقیقاتی برای انجام آزمایشات الایزا منتقل شد.

برای سنجش کمی $A\beta$ هیپوکامپ از تکنیک الایزا استفاده شد. کیت اختصاصی Clustein ELISA -CLU Kit ساخت کشور آلمان با کد RK03573 مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین برای محاسبه حداکثر ظرفیت عملکرد ورزشی رت‌ها از آزمون حداکثر ظرفیت عملکرد ورزشی رت‌ها (V_{max}) استفاده شد. این آزمون شامل افزایش مداوم و پیشرونده در سرعت با شیب صفر درجه بود. برای اجرای آزمون، سرعت ترمیل هر ۳ دقیقه به میزان ۳ متر در دقیقه افزایش می‌یافت و تا زمان واماندگی موش‌ها ادامه داشت. این شدت و حجم تمرین، مختص رت‌های مسن (۱۱ ماهه) بود (۲۴).

روش‌های آماری

قبل از انجام کلیه آزمون‌های پارامتریک، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلیک تعیین شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی تعیین شد. سطح معنی‌داری برای تمامی آزمون‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شده است. تمامی آزمون‌های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون‌های آماری نشان داد سطح پروتئین کلاسترین در گروه بیمار کنترل نسبت به گروه سالم کنترل بطور معناداری بالاتر است ($p \leq 0.0001$). همچنین تمرین باعث کاهش معنادار کلاسترین در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل ($p = 0.001$) شده است. افزایش کلاسترین در گروه سالم تمرین نسبت به گروه سالم کنترل معنی‌دار نبود. (جدول ۲).

جدول ۲. مقادیر کلاسترین در گروه‌های پژوهش

متغیر	گروه	میانگین \pm انحراف استاندارد
کلاسترین (ng/mg protein)	سالم کنترل	۹۴/۲۸ \pm ۵/۱۸
	سالم تمرین	۱۲۰/۰۱ \pm ۷/۷۱
	بیمار کنترل	۲۶۰/۲۵ \pm ۴۳/۲۳ *
	بیمار تمرین	۱۴۳/۳۱ \pm ۱۰/۵۷ **

* تفاوت معنادار نسبت به گروه سالم کنترل ($P \leq 0.05$).

** تفاوت معنادار نسبت به گروه بیمار کنترل ($P \leq 0.05$).

همچنین نشان داده شد که تمرین موجب بهبود عملکرد حافظه تشخیصی در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل شده است ($p = 0.004$) (جدول ۳).

جدول ۳. مقادیر (میانگین \pm انحراف استاندارد) عملکرد حافظه تشخیصی گروه‌های پژوهش

گروه	پیش آزمون	پس آزمون
سالم کنترل	۱۵/۴ \pm ۲/۴۵	۱۴/۷ \pm ۲/۲۱
سالم تمرین	۱۵/۲ \pm ۳/۲۵	۱۷ \pm ۳/۴۹
بیمار کنترل	۴/۳ \pm ۱/۸۲	۳/۴ \pm ۱/۵
بیمار تمرین	۳/۶ \pm ۲/۲۱	۸/۸ \pm ۳/۲۹ *

* تفاوت معنادار نسبت به گروه بیمار کنترل ($P \leq 0/05$).

همان‌گونه که در جدول ۴ گزارش شده است تمرین باعث بهبود عملکرد ورزشی در گروه بیمار و سالم به ترتیب نسبت به گروه بیمار کنترل و سالم کنترل ($P \leq 0/0001$) شده است.

جدول ۴. مقادیر (میانگین \pm انحراف استاندارد) آزمون Vmax گروه‌های پژوهش

گروه	پیش آزمون	پس آزمون
سالم کنترل	۲۷/۹ \pm ۲/۴۷	۲۶/۴ \pm ۳/۴
سالم تمرین	۲۷/۹ \pm ۲/۴۷	۳۶/۳ \pm ۱/۷ *
بیمار کنترل	۲۵/۵ \pm ۲/۱۲	۲۲/۸ \pm ۲/۰۹
بیمار تمرین	۲۵/۲ \pm ۲/۵۳	۳۲/۷ \pm ۲/۶۲ **

* تفاوت معنادار نسبت به گروه سالم کنترل ($P \leq 0/05$).

** تفاوت معنادار نسبت به گروه بیمار کنترل ($P \leq 0/05$).

بحث و بررسی:

براساس نتایج تحقیق حاضر، نسبت کلاسترین در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد. عملکرد حافظه نیز در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل بهبود قابل توجهی داشت. و عملکرد ورزشی نیز در گروه‌های بیمار تمرین و سالم تمرین نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معناداری را نشان داد. شواهد قانع کننده‌ای وجود دارد که کلاسترین به $A\beta$ متصل می‌شود، از تجمع $A\beta$ جلوگیری می‌کند و اثرات محافظت کننده عصبی در شرایط فیزیولوژیکی دارد (۱۰). میگوئل و همکاران (۲۰۲۱) در تحقیقات قبلی نشان دادند که بیماران مبتلا به اختلال شناختی که به مدت ۶ ماه در تمرینات ساختاری شرکت کرده بودند، سطوح پلاسمایی CLU بالاتری داشتند (۲۰). نشان داده شده است که بیان کلاسترین به وضوح در بیماری آلزایمر افزایش می‌یابد (۲۵). جالب توجه است که پلاک‌های $A\beta$ در مغز بیماران آلزایمر به طور سیستماتیک در طی یک دوره زمانی طولانی و قبل از شروع علائم تجمع می‌یابند و عوارض نامطلوبی مانند گره‌خوردگی نوروفیبریلاری و انحطاط عصبی و در نتیجه از دست دادن نورون‌ها را ایجاد می‌کنند (۲۶). در واقع کلاسترین در پاکسازی پپتیدهای $A\beta$ و فیبریل‌ها، با اتصال به گیرنده‌های مگالین و افزایش اندوسیتوز آن‌ها در سلول‌های گلیال نقش مثبت دارد. علاوه بر این، در ذرات لیپوپروتئین وجود دارد و کلسترول و متابولیسم لیپید مغز را تنظیم می‌کند که در آلزایمر مختل می‌شود. به عبارتی، کلاسترین را می‌توان به عنوان یک نگهبان چند توان مغز در نظر گرفت (۲۵).

سطح کلاسترین در مناطق مغزی ۱-۳ و مایع مغزی نخاعی مبتلایان به آلزایمر افزایش می‌یابد. همچنین افزایش سطح این پروتئین با شیوع و شدت بیماری و با افزایش رسوب $A\beta$ در مغز مرتبط است (۲۷). داده‌های به دست آمده از تحقیقات اخیر، باین فرضیه مطابقت دارد که افزایش بیان کلاسترین در آلزایمر، منعکس‌کننده یک پاسخ محافظت عصبی است (۲۸). در مطالعه حاضر پس از شش هفته تمرینات هوازی تناوبی، میزان کلاسترین در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل کاهش چشمگیری یافته بود و همزمانی این کاهش با بهبود کارایی حافظه و عملکرد ورزشی در گروه بیمار تمرین، ممکن است نشان دهنده ارتباط بین این عوامل باشد.

همسو با نتایج حاصل از این تحقیق، میگوئل و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعات خود، نشان دادند تزریق پلاسمای موش‌های دوند به موش‌های کم تحرک، بیان ژن اولیه التهاب عصبی و التهاب مغزی را کاهش می‌دهد. تجزیه و تحلیل پروتئومی پلاسمای، افزایش هماهنگ در مهار کننده‌های آبشار فاکتورهای التهابی از جمله کلاسترین را نشان داد. کلاسترین تزریقی داخل وریدی، به سلول‌های آندوتلیال مغز متصل می‌شود و بیان ژن التهاب عصبی را در موش‌های مدل التهاب حاد مغزی و موش‌های مبتلا به آلزایمر کاهش می‌دهد (۲۰). علاوه بر این، پیتو و همکاران (۲۰۲۲)، در تحقیقات جدید خود، بیان کردند که پلاسمای موش دونده حاوی عواملی است، به‌ویژه، CLU که باعث کاهش التهاب عصبی هیپوکامپ می‌شود و ممکن است اثرات مفید ورزش را برای عملکرد مغز واسطه کند. همچنین منجر به افزایش نورونز و گلیونز هیپوکامپ، بهبود و حفظ حافظه و افزایش بیان ژن‌های مهم برای یادگیری و حافظه در هیپوکامپ می‌شود (۱۸). علاوه بر این دارویش و همکاران (۲۰۲۲)، در طی مطالعه‌ای برای بررسی مکانیسم‌هایی که ممکن است واسطه تأثیر ورزش بر شناخت در آلزایمر باشند، دریافتند که اثرات ورزش ممکن است با واسطه کاهش در التهاب عصبی، به دلیل تنظیم مثبت مهارکننده‌های آبشار کمپلمان، و به ویژه با مهار آبشار مکمل مولکولی به نام کلاسترین باشد (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر توسط استرانهان و همکاران (۲۰۱۲)، نشان می‌دهند که تمرین ورزشی منجر به بهبود قابل توجهی در نتایج مرتبط با مقاومت به انسولین، از جمله افزایش ASM/wt و این بهبودها با کاهش سطح $ApoJ$ یا همان کلاسترین، در گردش خون در زنان یائسه مبتلا به $T2DM$ همراه بود در واقع این مطالعه شواهد واضحی را ارائه می‌دهد که از $ApoJ$ در گردش به عنوان یک نشانگر متابولیک مقاومت به انسولین حمایت می‌کند. در واقع سطح $ApoJ$ در گردش به طور قابل توجهی در افراد مبتلا به شرایط مرتبط با مقاومت به انسولین مانند چاقی، سندرم متابولیک و $T2DM$ افزایش می‌یابد. داده‌های ارائه شده در این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش سطح $ApoJ$ در گردش ناشی از تمرین بدنی با بهبود شاخص‌های مهم مقاومت به انسولین، مانند $HOMA-IR$ ، در دیابت نوع دوم همراه است. در واقع این داده‌ها از این ایده حمایت می‌کنند که تنظیم مثبت $ApoJ$ در گردش یکی از ویژگی‌های حالت‌های متابولیکی نامنظم در شرایط مقاومت به انسولین، از جمله $T2DM$ است (۲۹).

در پژوهش حاضر، علاوه بر کاهش در مقدار CLU هیپوکامپ در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، ما همچنین شاهد بهبود عملکرد حافظه و عملکرد ورزشی در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل بودیم. در واقع اثرات ورزش بر مغز به ویژه در هیپوکامپ که برای یادگیری و حافظه ضروری است و جزو اولین مناطقی است که تحت تأثیر پیری و آلزایمر قرار می‌گیرد، آشکار است. همسو با نتایج تحقیق حاضر، در تحقیق دیگری بر روی جوندگان، دویدن باعث افزایش نورونز در ناحیه $CA1-3$ هیپوکامپ، شکل پذیری سیناپسی، سطوح نوروتروفین و انتقال دهنده‌های عصبی، عروقی شدن و کاهش التهاب عصبی شد. مطالعات پارابایوز بین حیوانات جوان و مسن شواهدی

را ارائه کرده است که فاکتورهای خون می‌توانند نوروژنز بزرگسالان و عملکرد حافظه را تنظیم کنند و در طول ورزش، اندام‌های محیطی مانند عضلات اسکلتی، بافت چربی و کبد، مولکول‌ها و وزیکول‌ها را به گردش خون ترشح می‌کنند که واسطه هموستاز سیستمیک هستند. (۱۸). علاوه بر این، ورزش با کاهش سطح سیتوکین‌ها و جمعیت آستروسیت‌ها که با تزریق $\text{A}\beta$ افزایش می‌یابد، پاسخ ایمنی را آزاد می‌کند. ورزش به عنوان یک استراتژی بالقوه برای جلوگیری از توسعه آلزایمر با تنظیم نوروژنز بزرگسالان و فعالیت ایمنی مغز از طریق کنترل سیگنالینگ MAPK عمل می‌کند (۳۰). همچنین دستاوردهای مرتبط با ورزش در آمادگی قلبی تنفسی با بهبود عملکرد حافظه و کاهش آتروفی هیپوکامپ مرتبط بود، که نشان می‌دهد دستاوردهای آمادگی قلبی تنفسی ممکن است در افزایش مزایای مغز مهم باشد. همچنین شواهد در انسان نشان می‌دهد که سطوح بالاتر آمادگی قلبی تنفسی و فعالیت بدنی با حجم بیشتر مغز، آتروفی کمتر مغز، پیشرفت کندتر زوال عقل و کاهش خطر زوال عقل مرتبط است. همچنین محققان بر این باورند که شناخت، توانایی عملکردی و افسردگی از ورزش‌های هوازی بیشتر از تمرینات کششی و غیر هوازی در یک نمونه مشخص از افراد مبتلا به اختلال شناختی مرتبط با آلزایمر سود می‌برند و این مزایا با افزایش آمادگی قلبی تنفسی مرتبط است (۳۱).

در مجموع با توجه به اهمیت پیشگیری و کنترل بیماری آلزایمر احتمالاً با تنظیم مقدار کلاسترین در هیپوکامپ در پی فعالیت‌های ورزشی، بتوان شانس ابتلا به بیماری آلزایمر را کاهش داد. از طرف دیگر و با در نظر گرفتن اهمیت نقشی که فعالیت‌های ورزشی هوازی در این بیماران دارند و اطلاعات اندک موجود درباره ی آثار تمرینات مقاومتی و ترکیبی بر مقادیر کلاسترین هیپوکامپ، و نیز با استناد به برخی گزارش‌های جدید درباره ی آثار مضاعفی که تمرین‌های ترکیبی بر جنبه‌های گوناگون فیزیولوژیک دارند، ضروری به نظر می‌رسد که پژوهش‌هایی در آینده با دستکاری و تغییر مدت و نوع مداخله‌های ورزشی، به بهترین رابطه مقدار-پاسخ مداخله‌های ورزشی برای بهبود بیماران آلزایمر دست یابند.

نتیجه گیری

با توجه به نکات و مطالب ارائه شده، به دلیل تاثیر مثبت برنامه تمرینی انجام گرفته بر فاکتورهای مورد بررسی در این پژوهش عبارت اند از: روند رو به بهبود حافظه، کاهش و تنظیم مقادیر کلاسترین و بهبود عملکرد ورزشی در گروه بیمار تمرین نسبت به گروه بیمار کنترل و کاهش احتمالی بیماری آلزایمر، به نظر می‌رسد ارائه نظر در مورد تاثیر مفید فعالیت ورزشی هوازی تداومی بر وضعیت سلامت بیماران آلزایمری منطقی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه ارشد می‌باشد و بدین وسیله از زحمات مسئولین محترم آزمایشگاه حیوانات فیزیولوژی ورزشی و آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان که در اجرای این پژوهش همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و سپاسگذاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسنده مقاله اعلام می‌کند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سو رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند، و تضاد منافی وجود ندارد.

منابع

1. Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*. 2020; 40(1):22-9.

2. Gronek P, Balko S, Gronek J, Zajac A, Maszczyk A, Celka R, et al. Physical activity and Alzheimer's disease: a narrative review. *Aging and disease*. 2019; 10(6):1282.
3. Zavvari F, Karimzadeh F. A review on the behavioral tests for learning and memory assessments in rat. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2017; 5(4):110-24.
4. Graham N, Warner J. *Alzheimer's Disease and Other Dementias: Family Doctor Publications Limited*; 2009.
5. Wang Y-J, Zhou H-D, Zhou X-F. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug discovery today*. 2006; 11(19-20):931-8.
6. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*. 2015; 163(5):1064-78.
7. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, et al. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nature neuroscience*. 2015; 18(7):978-87.
8. Moezzi S-M-I, Mozafari N, Fazel-Hoseini S-M, Nadimi-Parashkoochi S, Abbasi H, Ashrafi H, et al. Apolipoprotein J in Alzheimer's disease: Shedding light on its role with cell signaling pathway perspective and possible therapeutic approaches. *ACS Chemical Neuroscience*. 2020; 11(24):4060-72.
9. Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocrine-related cancer*. 2010; 17(1):R1.
10. Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R. Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia*. 2014; 62(4):493-503.
11. Suss O, Reichmann D. Protein plasticity underlines activation and function of ATP-independent chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015; 2:43.
12. Li X, Ma Y, Wei X, Li Y, Wu H, Zhuang J, et al. Clusterin in Alzheimer's disease: a player in the biological behavior of amyloid-beta. *Neuroscience bulletin*. 2014; 30(1):162-8.
13. Bargi R, Salmani H, Asgharzadeh Yazdi F, Hosseini M. Inflammation and the brain disorders: a review. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2017; 5(3):68-82.
14. De Miguel Z, Betley MJ, Willoughby D, Lehallier B, Olsson N, Bonanno L, et al. Exercise conditioned plasma dampens inflammation via clusterin and boosts memory. *bioRxiv*. 2019:775288.
15. Valenzuela PL, Castillo-Garcia A, Morales JS, de la Villa P, Hampel H, Emanuele E, et al. Exercise benefits on Alzheimer's disease: State-of-the-science. *Ageing research reviews*. 2020; 62:101108.
16. Steinberg M, Leoutsakos JMS, Podewils LJ, Lyketsos C. Evaluation of a home-based exercise program in the treatment of Alzheimer's disease: The Maximizing Independence in Dementia (MIND) study. *International Journal*

- of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences. 2009; 24(7):680-5.
17. Liu H-l, Zhao G, Zhang H. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behavioural brain research*. 2013; 256:261-72.
 18. Pinto A, van Praag H. An exercise infusion benefits brain function. *Cell Research*. 2022; 32(3):223-4.
 19. Darweesh SK, De Vries NM, Helmich RC, Verbeek MM, Schwarzschild MA, Bloem BR. Inhibition of Neuroinflammation May Mediate the Disease-Modifying Effects of Exercise: Implications for Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*. 2022(Preprint):1-4.
 20. De Miguel Z, Houry N, Betley MJ, Lehallier B, Willoughby D, Olsson N, et al. Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin. *Nature*. 2021; 600(7889):494-9.
 21. Pattanashetti LA, Taranalli AD, Parvatrao V, Malabade RH, Kumar D. Evaluation of neuroprotective effect of quercetin with donepezil in scopolamine-induced amnesia in rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 2017; 49(1):60.
 22. Williams CJ, Gurd BJ, Bonafiglia JT, Voisin S, Li Z, Harvey N, et al. A multi-center comparison of O2peak trainability between interval training and moderate intensity continuous training. *Frontiers in physiology*. 2019; 10:19.
 23. Feter N, Spanevello RM, Soares MSP, Spohr L, Pedra NS, Bona NP, et al. How does physical activity and different models of exercise training affect oxidative parameters and memory? *Physiology & behavior*. 2019; 201:42-52.
 24. Qin F, Dong Y, Wang S, Xu M, Wang Z, Qu C, et al. Maximum oxygen consumption and quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats. *Scientific Reports*. 2020; 10(1):1-8.
 25. Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain research reviews*. 2009; 61(2):89-104.
 26. Versele R, Corsi M, Fuso A, Sevin E, Businaro R, Gosselet F, et al. Ketone bodies promote amyloid- β 1-40 clearance in a human in vitro blood-brain barrier model.
 27. Desikan RS, Thompson WK, Holland D, Hess CP, Brewer JB, Zetterberg H, et al. The role of clusterin in amyloid- β -associated neurodegeneration. *JAMA neurology*. 2014; 71(2):180-7.
 28. Schuermann B, Wiese B, Bickel H, Weyerer S, Riedel-Heller SG, Pentzek M, et al. Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011; 25(3):421-4.
 29. Stranahan A, Martin B, Maudsley S. Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2012; 9(1):86-92.

30. Sun L-n, Qi J-s, Gao R. Physical exercise reserved amyloid-beta induced brain dysfunctions by regulating hippocampal neurogenesis and inflammatory response via MAPK signaling. *Brain Research*. 2018; 1697:1-9.
31. Morris JK, Vidoni ED, Johnson DK, Van Sciver A, Mahnken JD, Honea RA, et al. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. *PloS one*. 2017; 12(2):e0170547.
32. 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 Tg 2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2009; 35(3):426-32.

The effect of continuous aerobic exercise on hippocampal clusterin level, memory efficiency and exercise performance in aged rat model of Alzheimer's disease

Aylar Fathi¹, Roghaieh Fakhrpour*¹, Simin Namvar Aghdash²

1 Department of Sports Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran.

2 Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azerbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author: r.fakhrpour@yahoo.com

Abstract

Objectives: Alzheimer's (AD) is a chronic disease that destroys nerve cells, which eventually destroys the ability to do the simplest tasks. Alzheimer is caused by the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) peptides in the brain. Clusterin (CLU) interacts with $A\beta$ and regulates its clearance from the brain. Studying the types of exercise activities and finding the best type is considered as a way to control Alzheimer's. The purpose of this research was to study the effect of six weeks of continuous aerobic training on CLU value, memory efficiency and exercise performance.

Methods: 40 aged (11-month-old) male Wistar rats randomly divided into four groups of 10, including the patient training, 2: patient control, 3: healthy training, and 4: healthy control groups. The rats performed the relevant exercises training for six weeks by repeating five sessions per week. CLU was measured by ELISA method, memory and exercise performance were measured by new object recognition test and maximum exercise capacity test respectively. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test, were used for statistical analysis.

Results: The amount of CLU in the hippocampus in the patient training group was significantly reduced compared to the patient control group ($P<0.05$). Also, improvement of memory performance was observed in the patient training group compared to the patient control group ($P<0.05$) and exercise performance increased in the patient training and healthy training groups compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: According to the results of this research, continuous aerobic training during six weeks improves memory efficiency and exercise performance, as well as reducing clusterin in the hippocampus.

Key words: Alzheimer's, Clusterin, Memory, Continuous Aerobic Training.