

## **Study The Effect of 4 weeks of Special Aerobic Training on CBS and SAM Levels in Hippocampus of Rats with Alzheimer-induced Disease with A $\beta$ 1-42 Injection**

Farhad Azimi<sup>1</sup>, Marefat Siahkouhian<sup>2\*</sup>, Farnaz Seifi-Skishahr<sup>3</sup>, Roghayeh Afroundeh<sup>3</sup>

1.Ph.D. Student of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3.Assistant Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Received: 25 Nov 2017, Accepted: 17 Jan 2018

### **Abstract**

**Background:** H<sub>2</sub>S plays a key role in the pathogenesis of the Alzheimer's disease. The aim of the present study was to investigate the effects of 4 weeks of the special aerobic training after induction of Alzheimer's disease by A $\beta$ 1-42 injection on CBS and SAM levels in hippocampus of Wistar male rats.

**Materials and Methods:** Twenty male Wistar rats (8 weeks old and weight 195  $\pm$  20 g) were divided into four groups including: healthy control, Alzheimer's control, Alzheimer's + training and sham. To induce Alzheimer's disease, A $\beta$ 1-42 was infused into the hippocampus of rats. Training group trained for 4-week. For data analysis, one-way ANOVA was used and Eta and Omega squared tests were used to determine the effect size ( $p < 0.05$ ).

**Results:** Findings revealed that 4 weeks of special aerobic training increased significantly the CBS and SAM levels in hippocampus of Alzheimer's rats compared to the control Alzheimer's rats (ES=53;  $p = 0.007$ , ES= 92.22;  $p = 0.001$ ). Also, we showed 4 weeks of special aerobic training increased CBS level in hippocampus of Alzheimer's rats compared to the healthy control group (ES= 44.07;  $p = 0.014$ ).

**Conclusion:** It seems that the special aerobic training can be used as a useful non-pharmacologically effective therapeutic treatment for Alzheimer's patients through positive regulation of hydrogen sulfide via CBS and SAM enzymes.

**Keywords:** Aerobic exercise, Alzheimer's disease, Beta-Amyloid, CBS, Hydrogen sulfide, SAM.

\*Corresponding Author:

Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Email: marefat\_siahkouhian@yahoo.com

## تأثیر چهار هفته تمرین هوازی ویژه بر سطوح CBS و SAM در هیپوکمپ رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر با تزریق A $\beta$ 1-42

فرهاد عظیمی<sup>۱</sup>، معرفت سیاه کوهیان<sup>۲\*</sup>، فرناز سیفی اسک شهر<sup>۳</sup>، رقیه افرونده<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۴، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** H2S نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کند. هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر چهار هفته تمرین هوازی ویژه بعد از القای بیماری آلزایمر با تزریق A $\beta$ 1-42 بر سطوح CBS و SAM هیپوکمپ رت‌های نر نژاد ویستار بود.

**مواد و روش‌ها:** ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار (با سن ۸ هفتگی با میانگین وزنی  $195 \pm 20$ )، به طور تصادفی در ۴ گروه سالم کنترل، آلزایمری کنترل، آلزایمری تمرین و گروه شم قرار گرفتند. برای القای آلزایمر، از تزریق A $\beta$ 1-42 به درون هیپوکمپ مغز رت‌ها استفاده شد. گروه تمرینی به مدت ۴ هفته به تمرین پرداختند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه و برای تعیین اندازه اثر از آزمون مجذور اتا و مجذور امگا استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی ویژه، سطوح CBS و SAM هیپوکمپ رت‌های آلزایمری را در مقایسه با رت‌های آلزایمری کنترل، به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (به ترتیب  $ES = 53$ ،  $p = 0/007$ ،  $ES = 92/22$ ،  $p = 0/001$ ). هم‌چنین، نتایج نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی ویژه سطوح CBS هیپوکمپ رت‌های گروه آلزایمری را نسبت به رت‌های گروه سالم کنترل، به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ( $ES = 44/07$ ،  $p = 0/014$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج، چنین به نظر می‌رسد که تمرین هوازی ویژه می‌تواند به واسطه تنظیم مثبت سولفید هیدروژن از طریق آنزیم‌های CBS و SAM، به عنوان یک روش درمانی غیردارویی سودمند در بهبود بیماران آلزایمری مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** بیماری آلزایمر، بتا آمیلوئید، سولفید هیدروژن، تمرین هوازی، CBS، SAM

\*نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

Email: marefat\_siahkuhian@yahoo.com

## مقدمه

بیماری آلزایمر (AD) شایع‌ترین علت زوال عقل در میان افراد مسن است و به وسیله آتروفی نواحی مشخصی از مغز، کاهش ادراک پیشرونده و از دست دادن حافظه و ناتوانی در انجام کارهای روزمره مشخص می‌شود (۱). رسوب و تولید بتا آمیلوئید (A $\beta$ )، به عنوان مکانیسم محرک در بیماری آلزایمر است (۲). برآوردهای کنونی حاکی از آن است که حدود ۳۳/۹ میلیون نفر در سراسر جهان به بیماری آلزایمر مبتلا هستند. با رشد نامتناسب جمعیت مسن، AD که رایج‌ترین شکل زوال عقل در میان افراد مسن است، آماده تبدیل شدن به یک بحران سلامتی عمومی است. پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ شیوع AD به بیش از ۱۰۰ میلیون نفر برسد (۳). با این که تحقیقات بی‌شماری در این زمینه صورت گرفته است و داروهای متعددی نیز برای مقابله با این بحران پیش‌رو ارائه شده است، درمان‌های فعلی به دلیل کارایی محدود، عوارض جانبی قابل توجه و به طور کلی عدم تغییر چشمگیر در مسیر AD ناکام مانده‌اند (۴). عوامل خطرزای مختلفی در ارتباط با بیماری‌های زوال عقلی و بیماری آلزایمر کشف شده است. تحقیقات اخیر نشان داده اند خطر ابتلا به زوال عقلی را می‌توان با اصلاح و تغییر وضعیت آموزش، رژیم غذایی، فعالیت بدنی، عوامل شناختی و تعاملات اجتماعی کاهش داد. طبق بررسی‌های علمی، تأثیر این عوامل بر حافظه به دلیل افزایش جریان خون موضعی و تولید سلول‌های عصبی جدید است (۵). تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند عواملی که باعث افزایش ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و یا بیماری‌های مغزی عروقی می‌شوند، موجب بروز بیماری‌های زوال عقلی و آلزایمر شده و پیشرفت آن‌ها را تشدید خواهند کرد (۵).

در مطالعات اخیر، گروه کوچکی از مولکول‌های گازی به تازگی کشف شده است که به عنوان سیگنالینگ مولکولی عمل می‌کنند. از این رو، این گازها به عنوان ناقل‌های گازی نامیده شدند. تاکنون سه نوع ترکیب ناقل گازی اکسید نیتریک (NO)، مونوکسید کربن (CO) و سولفید هیدروژن

(Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)) در سلول‌های پستانداران شناخته شده است (۶). جدیدترین ناقل گازی کشف شده سولفید هیدروژن می‌باشد که در غلظت‌های بالا با بوی تند و ماهیت سمی آن شناخته شده است. اب و کیمورا (۱۹۹۶) گزارش کرده‌اند که آنزیم سیستاتین- $\beta$ - سنتاز (Cystathionine- $\beta$ - synthase (CBS)) بیشترین تولیدکننده سولفید هیدروژن با استفاده از سوبسترای سیستین در مغز است (۷). هم‌چنین فعال‌کننده آلوستریکی آنزیم CBS، اس آدنوزیل ال متیونین (S-adenosyl- (SAM) L-methionine) می‌باشد (۸).

یافته‌های اکثر مطالعات حاکی از این است که سولفید هیدروژن علاوه بر نقش‌های فیزیولوژیکی خود به عنوان یک تعدیل‌کننده عصبی و محافظت‌کننده نورونی، در پاتوفیزیولوژی سیستم عصبی مرکزی (CNS) نیز درگیر می‌باشد. سولفید هیدروژن با بیماری‌های مهم عصبی مانند آلزایمر و پارکینسون مرتبط است (۹). کاهش میزان سولفید هیدروژن در نمونه کالبد شکافی شده مغز بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر با استفاده از گاز کرومोगرافی نشان داده شده است (۱۰). تحقیقات نشان داده‌اند که آنزیم CBS هم در تولید سولفید هیدروژن و هم در سوخت و ساز هموسیستین نقش دارد، هم‌چنین در پاتوژنز بیماری آلزایمر نیز درگیر می‌باشد (۱۱). هم‌چنین، میزان سولفید هیدروژن در مغز افراد مبتلا به بیماری آلزایمر کمتر از افراد سالم می‌باشد، اگر چه میزان بیان CBS بین این گروه‌ها تفاوت معناداری نداشته است، ولی میزان گونه فعال‌کننده آلوستریکی CBS، یعنی SAM دچار کاهش شده است (۱۰). هم‌چنین گزارش شده است که سولفید هیدروژن از طریق مسیرهای مختلفی از جمله تنظیم فشار خون (۱۲)، انتقال دهنده عصبی (۷)، آنتی‌اکسیدان (۱۳)، تنظیم التهاب (۱۴)، محافظت‌کننده قلب و عروق (۱۵)، مهار آپوپتوزیس (۱۶) و با تحریک آنژیوژنز (۱۷) و نوروژنز (۹) موجب بازسازی و ترمیم بافت‌های آسیب دیده شده و از سلول‌های نورونی محافظت می‌کند.

شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما ( $22 \pm 3$ ) سانتی گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد ۳ تا ۵ عدد رت در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی متر به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل اجرای پژوهش شامل نگهداری، القای بیماری آلزایمر، اجرای پروتکل تمرین، کشتار رت‌ها و بافت برداری بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات مؤسسه پاستور انجام شد.

در این تحقیق، جهت القای بیماری آلزایمر به درون هیپوکمپ ۱۰ سر رت،  $A\beta 1-42$  تزریق شد. برای ایجاد آلزایمر القا شده با پپتید بتا آمیلوئید ۴۲-۱، در مرحله اول بتا آمیلوئید را در محلول بافر دی متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide (DMSO)) حل کردیم تا pH آن به ۷/۴ برسد، سپس محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز انکوبه شد تا بتا آمیلوئید به شکل متراکم درآید و بعد در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از استراحت شبانه، حیوانات از طریق تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس سر حیوانات در دستگاه استریوتاگس ثابت شد و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی جمجمه، کانول‌های مخصوص تزریق در داخل بطن‌های جانبی در موقعیت  $0/8$  عقب برگما،  $1/5$  میلی‌متر در طرفین شکاف طولی و  $2/5$  میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه قرار گرفت و تزریق درون هیپوکمپ بتا آمیلوئید (هر طرف ۱ میکرولیتر) توسط سرنگ همپلتون صورت انجام شد. جهت اطمینان از محل درست تزریق در مغز به دو تا از رت‌ها رنگ تزریق شد و پس از کشتار محل تزریق بررسی شد. در گروه شم نیز تمام مراحل آزمایشگاهی مانند گروه تزریق بتا آمیلوئید بود، با این تفاوت که در گروه شم میزان ۱ میکرولیتر بافر DMSO در هر یک از هیپوکمپ‌ها تزریق شد.

سپس از آزمون ماز آبی موریس برای بررسی تغییرات رفتاری و اطمینان از ایجاد بیماری آلزایمر ناشی از

از سوی دیگر، برای پیشگیری از بیماری‌های عصبی و به تعویق انداختن فرآیندهای پیری، اکیداً به انجام ورزش توصیه شده است. یافته‌های مطالعات حاکی از آن است که فعالیت جسمانی به عنوان روشی بی‌خطر، کم‌هزینه و موثر در پیشگیری و بهبود علائم بیماری آلزایمر مطرح می‌باشد. فعالیت ورزشی منظم نقش حفاظت نورونی دارد، نوروتروفین‌ها را به صورت مثبت تنظیم می‌کند و آثار مطلوبی بر ادراک، حجم مغز و فعالیت شبکه عصبی در مطالعات کنترل شده افراد مسن که از لحاظ ادراکی سالم هستند و بزرگسالان با اختلال حافظه دارد (۱۸). هم‌چنین، افزایش فعالیت جسمانی به طور بالقوه از طریق آثار آن بر نشان‌گر زیستی  $A\beta$  در مغز، با کاهش خطر اختلال ادراکی و شیوع زوال عقلی همراه است (۱۹).

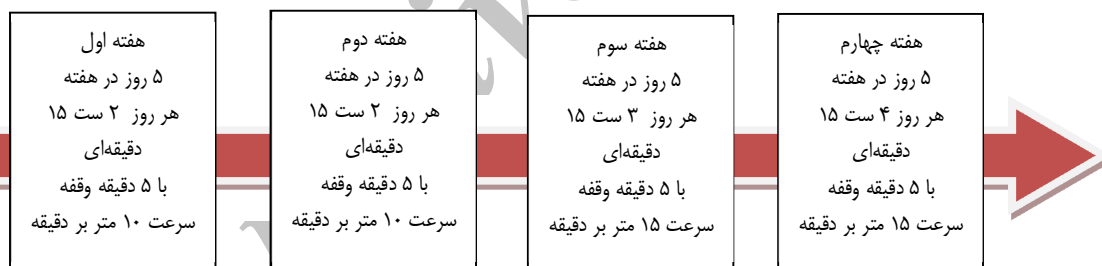
با این حال، با مد نظر قرار دادن آن‌چه که در ادبیات تحقیق مورد توجه قرار گرفته است تاکنون مطالعه اندکی یا به عبارت دیگر هیچ تحقیقی در مورد تأثیر تمرین ورزشی بر روی سطوح اندوژنی سولفید هیدروژن و عوامل دخیل در تولید اندوژنیکی آن در هیپوکمپ انجام نگرفته است. بنابراین، با توجه به آثار مثبت متعددی که ورزش می‌تواند بر پیشگیری و حتی درمان بیماری آلزایمر داشته باشد و با عنایت به ابهامات ذکر شده در مورد عوامل درگیر در بیماری آلزایمر، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی ویژه بر سطوح آنزیم‌های CBS و SAM هیپوکمپ رت‌های نر نژاد ویستار آلزایمری القا شده با تزریق  $A\beta 1-42$  بود.

## مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نظر روش شناسی، تجربی و از نظر هدف، بنیادی بود. جامعه آماری تحقیق حاضر، ۲۰ سر رت نژاد ویستار نر در سن ۸ هفتهگی با میانگین وزنی  $195 \pm 20$  از موسسه انستیتو پاستور بود. رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی موسسه پاستور در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی،

تا ۲/۳۰ بعد از ظهر و از شنبه تا چهارشنبه به مدت ۴ هفته (۵) روز در هفته با شدت و مدت مورد نظر) به تمرین پرداختند. رت‌ها در هفته اول و دوم با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در دو ست جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای (استراحت غیرفعال، به منظور جلوگیری از خستگی عضلانی) روی نوارگردان دویدند. در هفته سوم با افزایش شدت و زمان فعالیت، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در سه ست جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای بین ست‌ها دویدند. در هفته چهارم، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار ست جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای بین ست‌ها به فعالیت پرداختند (شکل ۱) (۲۱). رت‌های گروه تمرین هوازی در طول مدت جلسات تمرینی پایش شدند و با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف ( شدت ۰/۵ میلی آمپر) که در حیوان ایجاد استرس زیادی نمی‌کرد و یا دستکاری با یک اسفنج، به ادامه دویدن تشویق شدند. لازم به توضیح است که بر اساس گزارشات پیشین مبنی بر زنده ماندن رت‌ها تا ۶ هفته بعد از تزریق درون بطنی  $A\beta$  (۲۲)، در این مطالعه دوره تمرینی ۴ هفته انتخاب شده بود.

تزریق  $A\beta$ -42 بر بافت هیپوکمپ 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  $21 \pm 2$  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 می‌شد. آزمایش‌کننده، رایانه و شکل‌های راهنمای خارج از ماز در سراسر آزمایش ثابت بودند. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم افزار Etho نسخه ۷ و یک دوربین که در بالای مخزن قرار می‌گرفت، ردیابی و ثبت می‌شد (۲۰). بعد از اطمینان از القای بیماری آلزایمر، رت‌ها به روش تصادفی ساده به چهار گروه کنترل سالم، تزریق  $A\beta$ -42 + کنترل، تزریق  $A\beta$ -42 + تمرین هوازی و تزریق DMSO (گروه شم) تقسیم شدند ( پنج سررت در هر گروه). پروتکل تمرینی در این تحقیق بدین صورت بود که رت‌ها بر روی نوارگردان با شیب صفر درجه از ساعت ۹ صبح



شکل ۱. پروتکل تمرین هوازی اقتباس از (زاگار و همکاران)

کوبی پودر گردید و جهت استخراج RNA کل در ۱ میلی لیتر Isol RNA-Lysis reagent هموزن شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (مدل AmpliQuant; USA) سنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲/۱ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA تعدادی از RNA های تخلیص شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

برای سنجش میزان mRNA ژن‌های CBS و SAM در این تحقیق، ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها به وسیله ی تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و هیپوکمپ سریعاً استخراج و در نیتروژن -۱۹۶- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال ۸۰- منتقل شد. پس از جداسازی مغز، حدود ۵۰ میلی‌گرم هیپوکمپ با روش هاون-

مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص گردید، به طوری که کمترین میزان دایمر و بهترین Ct مشاهده شود. Real time-PCR به کمک RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه بر اساس اطلاعات این ژن‌ها در بانک ژنی NCBI توسط شرکت پیشگام (ایران) طراحی شد (جدول ۱). به علاوه، ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) Glyceraldehyde-3-phosphate (dehydrogenase) به عنوان ژن کنترل استفاده شد. کمی کردن داده‌ها (نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن مرجع) با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  صورت گرفت.

الکتروفورز شد و مشاهده باندهای RNA های ریبوزومی S18 و S28 به طور منفک صحت تخلیص را تایید کرد. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شد و سپس برای توقف واکنش، تیوب‌ها ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند، سپس دمای واکنش‌ها به ۴ درجه سانتی‌گراد تقلیل یافت تا مراحل بعدی آزمایش روی cDNA ها انجام شود. سنتز cDNA به وسیله PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect) شرکت TaKaRa (شماره کاتالوگ RR037A#) و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free انجام شد. بیان ژن با استفاده از روش کمی Real time-PCR و به کمک مدل Step One Plus (Applied Biosystems; USA) اندازه گیری شد. در ابتدای کار میزان غلظت بهینه cDNA و هم‌چنین پرایمرهای

جدول ۱. نام و توالی پرایمرهای آغازگر مورد استفاده در Real time-PCR

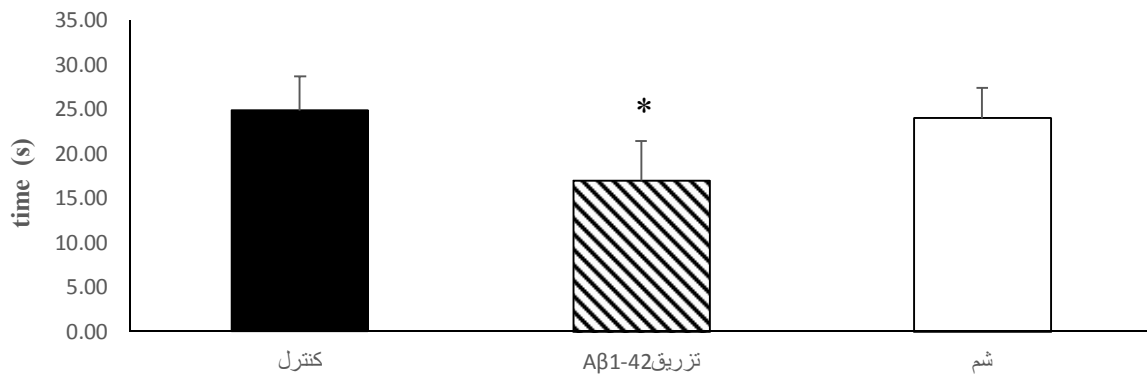
ژن	توالی	کد ژن
CBS	F: 5'- GGAAAGGAGGGAGATGTGAGG-3' R: 5'-AGCAAGGGAGCATGTGGG-3'	NM_012522.2
SAM	F: 5'- CCCTCCTGCCTCAACTCC-3' R: 5'- GCTGATGCCACCATGCTG-3'	NM_001271211.1

#### تحلیل آماری

از آزمون شاپیروویلیک و لوین به ترتیب برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها و تجانس واریانس‌ها استفاده شد. پس از مشخص شدن نرمال بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک-طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای تعیین اندازه اثر از آزمون مجذور اتا و مجذور امگا استفاده شد. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت.

#### یافته‌ها

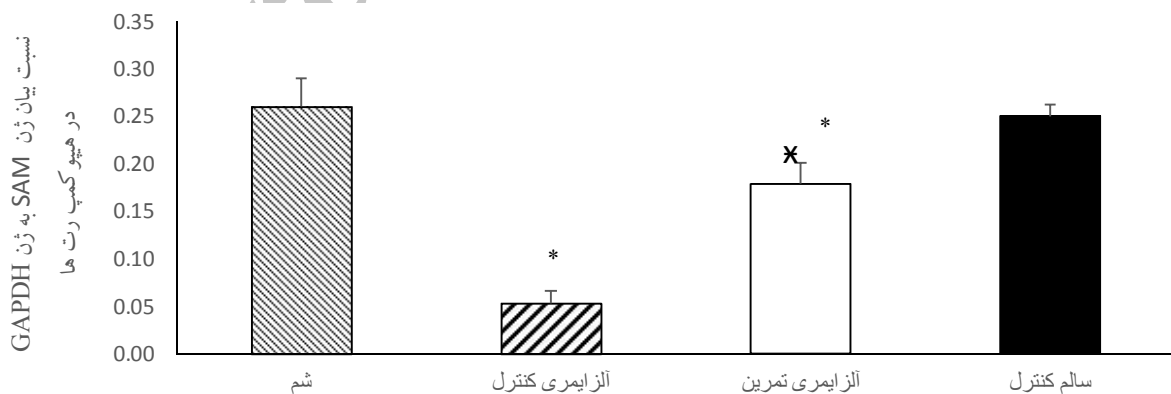
برای انجام این تحقیق در ابتدا نتایج آزمون رفتاری موز آبی موریس جهت اطمینان از القای بیماری آلزایمر در رت‌ها مورد سنجش قرار گرفت. نتایج آزمون رفتاری نشان داد که بین میانگین داده‌های زمانی حاصل از آزمون ماز آبی موریس رت‌های گروه آلزایمری القا شده با تزریق Aβ1-42 نسبت به گروه‌های سالم کنترل و شم کاهش معنی داری مشاهده می‌شود (به ترتیب ES= ۴۵/۲۶، p = ۰/۰۰۴، ES= ۴۲/۰۶، p = ۰/۰۱۱) (نمودار ۱).



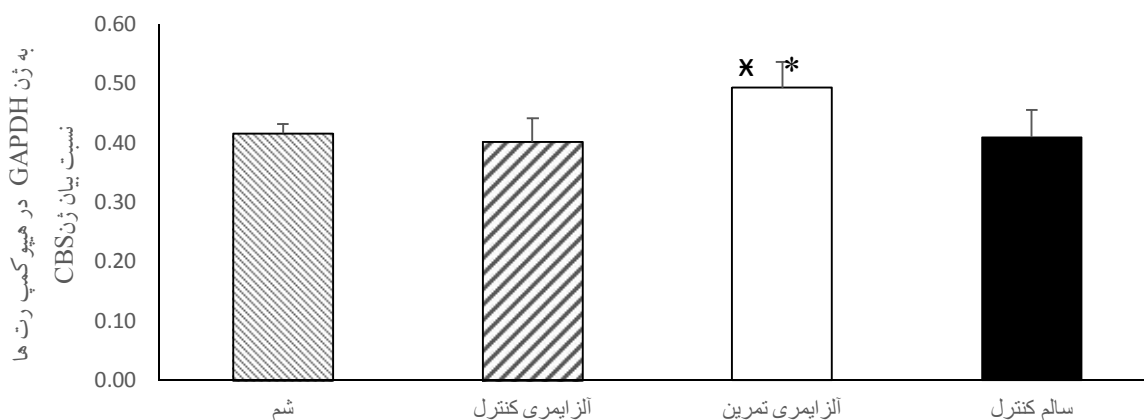
نمودار ۱. مقایسه میانگین زمان ثبت شده در آزمون رفتاری ماز آبی موريس بين گروه های مختلف \* تفاوت معنی دار با گروه های سالم کنترل و شم ( $p \leq 0/05$ ) (مقادیر به شکل انحراف معیار  $\pm$  میانگین بیان شده است).

سالم کنترل و شم کاهش معنی داری مشاهده می شود ( به ترتیب  $ES=98/33$   $ES=95/28$ ، در هر دو گروه  $p = 0/001$ ) (نمودار ۲). به این ترتیب، مقادیر اندازه اثر به ما نشان داد که قسمت عمده تغییرات سطوح SAM بین گروه های آلزایمری کنترل و سالم کنترل، مربوط به تزریق  $A\beta 1-42$  می باشد. اما علی رغم تغییرات فوق، بین میانگین سطوح CBS هیپوکمپ رت های گروه آلزایمری کنترل، در مقایسه با رت های گروه سالم کنترل و گروه شم تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ) (نمودار ۳).

بر اساس نتایج واریانس یک طرفه و محاسبات صورت گرفته، مقادیر F و ES محاسبه شده برای داده های CBS و SAM به ترتیب به صورت ذیل به دست آمد: ( $F=6/295$ ،  $p = 0/005$ ،  $ES=0/541$ )، ( $F=107/885$ ،  $p = 0/001$ ). به عبارت دیگر، بین میانگین سطوح CBS و SAM در گروه های تحقیق اختلاف معنی داری مشاهده شد. بعد از مقایسه جفتی سطوح CBS و SAM هیپوکمپ گروه های مختلف توسط آزمون تعقیبی توکی و مجذور امگا نتایج به دست آمده به شرح زیر بود: نتایج نشان داد که بین میانگین سطوح SAM هیپوکمپ رت های آلزایمری کنترل، در مقایسه با گروه های



نمودار ۲. مقایسه میانگین سطوح SAM هیپوکمپ رت ها در گروه های مختلف \* تفاوت معنی دار با گروه سالم کنترل و گروه شم ( $p \leq 0/05$ )، \* تفاوت معنی دار با گروه آلزایمری کنترل ( $p \leq 0/05$ ) (مقادیر به شکل انحراف معیار  $\pm$  میانگین بیان شده است).



نمودار ۳. مقایسه میانگین سطوح CBS هیپوکمپ رت‌ها در گروه‌های مختلف

\* تفاوت معنی دار با گروه سالم کنترل و گروه شم ( $p \leq 0/05$ )، \* تفاوت معنی دار با گروه آزایمیری کنترل ( $p \leq 0/05$ ) (مقادیر به شکل انحراف معیار  $\pm$  میانگین بیان شده است).

نتایج نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی ویژه سطوح CBS هیپوکمپ رت‌های گروه آزایمیری تمرین را نسبت به رت‌های گروه‌های سالم کنترل و شم افزایش معنی داری می‌دهد (به ترتیب  $ES= 44/07$ ،  $p = 0/014$ ،  $ES= 56/78$ ،  $p = 0/024$ ) (نمودار ۳).

به عبارت دیگر، مقادیر اندازه اثر به ما نشان داد ۴۴/۰۷ درصد تغییرات سطوح CBS بین گروه‌های آزایمیری تمرین و سالم کنترل مربوط به انجام تمرین هوازی ویژه و تزریق  $A\beta 1-42$  می‌باشد.

اما به طور معکوس، بین میانگین سطوح SAM هیپوکمپ رت‌های آزایمیری تمرین کرده نسبت به رت‌های گروه‌های سالم کنترل و شم کاهش معنی داری مشاهده شد (به ترتیب  $ES= 79/67$ ،  $ES= 95/28$ ، در هر دو گروه  $p = 0/001$ ) (نمودار ۲).

به عبارت دیگر، نتایج به دست آمده از اندازه اثر به ما نشان داد ۷۹/۶۷ درصد تغییرات سطوح SAM بین گروه‌های آزایمیری تمرین و سالم کنترل مربوط به انجام تمرین هوازی ویژه و تزریق  $A\beta 1-42$  می‌باشد.

یافته‌ها نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی ویژه سطوح بیان ژنی CBS هیپوکمپ رت‌های گروه آزایمیری تمرین کرده را در مقایسه با رت‌های آزایمیری کنترل به طور معنی داری افزایش می‌دهد ( $ES= 53$ ،  $p = 0/007$ ) (نمودار ۳). به عبارت دیگر، مقادیر اندازه اثر به ما نشان داد که ۵۳ درصد تغییرات سطوح CBS بین گروه‌های آزایمیری تمرین و آزایمیری کنترل مربوط به انجام تمرین هوازی ویژه می‌باشد. بقیه تغییرات بین این دو گروه به عوامل ناشناخته مربوط می‌شود.

هم‌چنین، یافته‌ها نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی ویژه سطوح بیان ژنی SAM (فعال کننده آلوستریکی آنزیم CBS) هیپوکمپ رت‌های گروه آزایمیری تمرین کرده را در مقایسه با رت‌های آزایمیری کنترل به طور معنی داری افزایش می‌دهد ( $ES= 92/22$ ،  $p = 0/001$ ) (نمودار ۲).

به عبارت دیگر، مقادیر اندازه اثر به ما نشان داد که ۹۲/۲۲ درصد تغییرات سطوح SAM بین گروه‌های آزایمیری تمرین و آزایمیری کنترل مربوط به انجام تمرین هوازی ویژه می‌باشد.



## بحث

در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر چهار هفته تمرین هوازی ویژه بعد از القای بیماری آلزایمر با تزریق  $A\beta 1-42$  بر سطوح بیان ژنی CBS و SAM (آنزیم های تولید کننده اندوژنیکی H2S در بافت مغز) در هیپوکمپ رت های نر نژاد ویستار پرداخته شد. بر اساس جستجوهای صورت گرفته، این اولین مطالعه‌ای است که تأثیر تمرین هوازی ویژه بر سطوح اندوژنیکی آنزیم های CBS و SAM در هیپوکمپ رت های نر آلزایمری القا شده با تزریق  $A\beta 1-42$  را مورد بررسی و مطالعه قرار داده است.

ذکر این نکته ضروری می رسد که بیماری آلزایمر یک بیماری چند عاملی است که به هر دو عامل اکتسابی و ژنتیکی مرتبط می باشد (۲۳). این بیماری از تجمع پلاکت های عصبی و پلاکت های  $A\beta$  در مغز حاصل می شود (۲۴). از آنجایی که فعالیت های ورزشی بسیاری از فرآورده های ژنی را هم در سطح mRNA و هم در پروتئین تعدیل می کند، القاء کننده تغییرات عصبی- شیمیایی و الکتروفیزیولوژیکی افزایش دهنده شکل پذیری نورونی می باشد، این احتمال وجود دارد که چندین مسیر ممکن است برای تنظیم سطح  $A\beta$  به طور مستقیم و یا غیر مستقیم فعال باشد (۲۴). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که القای بیماری آلزایمر با تزریق  $A\beta 1-42$  به درون بطن مغز رت های نر نژاد ویستار باعث کاهش معنی دار سطوح SAM در هیپوکمپ رت ها می گردد. در حالی که بین سطوح CBS هیپوکمپ رت های آلزایمری بدون تمرین نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری مشاهده نشد. همسو با نتایج این مطالعه، مطرح شده است که میزان H2S در مغز افراد مبتلا به بیماری آلزایمر کمتر از افراد سالم می باشد، اگر چه میزان بیان CBS بین این گروه ها تفاوت معناداری نداشته است. در مقابل، میزان گونه فعال کننده آلوستریکی CBS، یعنی SAM دچار کاهش معنی داری شده است (۱۰). بنابراین نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات در زمینه کاهش SAM و عدم تغییر CBS هم سو است. در

این مطالعه یافته ها نشان داد چهار هفته تمرین هوازی ویژه منجر به افزایش معنی داری در سطوح CBS و SAM هیپوکمپ رت های نر نژاد ویستار آلزایمری القا شده با تزریق  $A\beta 1-42$  شد که ممکن است بیان گر تأثیر حمایتی متغیرهای پژوهش از طریق مسیرهای مختلف فیزیولوژیکی در حفاظت و ترمیم سلول های نورونی باشد. در این راستا، لیو و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان داده اند که تعداد و اندازه پلاک های  $A\beta$  در هیپوکمپ موش های آلزایمری پس از ۵ ماه تمرین روی نوارگردان با شدت ۴۵ تا ۵۵ درصد  $VO_{2max}$  کاهش معنی داری یافت (۲۵). به همین ترتیب، باکر و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اظهار کردند که ورزش ممکن است افزایش دهنده تجزیه پیش ساز آمیلوئید (APP) باشد (۲۶). از طرف دیگر، ولف و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که در موش های تراریخته که در شرایط غنی سازی محیطی قرار گرفته بودند، علیرغم بار ثابت پلاک  $A\beta$ ، عملکرد ماز آبی موریس بهبود یافت، نوتروفین های هیپوکمپ به صورت مثبت تنظیم شد و نوروزنر هیپوکمپ افزایش یافت (۲۵).

در یک تحقیق انجام شده توسط نگپور و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان داده شده است که NaHS می تواند با مهار پروتئین ۷-سکرتاز موجب کاهش سطح  $A\beta$  شود (۲۷). در همین راستا، کانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴ تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی با سرعت ۲۰ متر در دقیقه بر سطح مغز موش های آلزایمری القا شده با استروپتوزوسین را بررسی نمودند. نتایج حاکی از کاهش معنی دار  $A\beta 1-42$  در مغز موش های آلزایمری نسبت به گروه آلزایمری کنترل بود. آن ها اظهار کردند که کاهش  $A\beta 1-42$  به علت تعدیل ۷-سکرتاز بوده است (۲۸). هم چنین، ژانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان داده اند که H2S می تواند مغز را در برابر آسیب دمانس عروقی ناشی از خون رسانی مجدد بعد ایسکمی مغزی از طریق مهار آپوپتوزیس در هیپوکمپ محافظت نماید. آن ها دریافتند که موش های تحت درمان با NaHS نسبت بیشتری از Bcl-2 (ضد آپوپتوز) به bax (عامل ایجاد

در مجموع، افزایش تولید اندوژنیکی H<sub>2</sub>S در بافت مغز به واسطه آنزیم‌های CBS و SAM می‌تواند از طریق مسیرهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله تنظیم فشار خون (۱۲)، انتقال دهنده عصبی (۷)، آنتی اکسیدان (۱۳)، تنظیم التهاب (۱۴)، محافظت‌کننده قلب و عروق (۱۵)، مهار آپوپتوزیس (۱۶) و با تحریک آنژیوژنز (۱۷) و نوروژنز (۹) موجب بازسازی و ترمیم بافت‌های آسیب دیده شده و موجب بهبود عملکرد سلول‌های نورونی گردد.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القای بیماری آلزایمر با تزریق Aβ<sub>1-42</sub> به درون بطن مغز رت‌های نر نژاد ویستار باعث کاهش معنی‌دار SAM در هیپوکمپ رت‌ها می‌شود. هم‌چنین، با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد تمرین هوازی از طریق افزایش سطوح SAM و CBS در هیپوکمپ رت‌های نر نژاد ویستار آلزایمری القا شده با تزریق Aβ<sub>1-42</sub> مفید باشد. به‌طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده، چنین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین هوازی می‌تواند به عنوان یک روش درمانی غیردارویی سودمند برای مقابله با اثرات زیان‌بار بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر منتج از پایان نامه دوره دکتری می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در گردآوری این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند، کمال سپاس‌گزاری را دارند.

### منابع

1. Rolland Y, Van Kan GA, Vellas B. Healthy Brain Aging: Role of Exercise and Physical

آپوپتوز) دارند. در هیپوکمپ بیان ژن Bcl-2 افزایش و بیان ژن bax کاهش پیدا می‌کند (۱۶).

بر اساس شواهد، آنزیم CBS که هم در تولید H<sub>2</sub>S و هم در سوخت و ساز هموسیستین نقش دارد، در پاتوژنز بیماری آلزایمر درگیر می‌باشد. بیماری آلزایمر با کاهش تولید H<sub>2</sub>S همراه است که ممکن است دلیلی برای کاهش حفاظت از سلول‌های عصبی باشد، به طوری که اثرات مخرب آسیب‌رسانی و التهاب عصبی ناشی از Aβ و استرس اکسیداتیو افزایش پیدا می‌کند (۲۹). همسو با این مطالعه، لازارو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ گزارش کرده‌اند که با انجام فعالیت‌های جسمانی اثرات زیان‌بار استرس اکسیداتیو که با پیری تسریع می‌شود را لغو می‌کند و پیامدهای مطلوبی در شکل‌پذیری سیناپسی و ادراک دارد (۳۰). به علاوه، سطوح بالای فعالیت جسمانی با سطوح کمتر نشان‌گرهای التهابی در محیط همراه است که ارتباط تنگاتنگی با بیماری آلزایمر دارند. سازوکارهای فیزیولوژیکی H<sub>2</sub>S که توسط آنزیم CBS در سیستم عصبی مرکزی پستانداران تولید می‌شود، عبارت‌اند از: تعدیل انتقال عصبی، تقویت بلند مدت عصبی (LTP) و محافظت نورونی از عوامل بیماری‌زای بی-شماره‌ای که وجود دارد (۹). H<sub>2</sub>S می‌تواند بر کانال‌های یونی و عملکردهای متعددی از سیستم عصبی تأثیرگذار باشد. در این راستا، مطالعات انجام شده توسط اب و کیمورا در سال ۱۹۹۶ بر روی عملکرد بیولوژیکی اندوژنیکی H<sub>2</sub>S نشان داده‌اند که H<sub>2</sub>S باعث افزایش گیرنده ان‌متیل دی‌اسپاراتات (N-methyl-D-aspartate (NMDA)) و افزایش تقویت بلند مدت عصبی می‌شود. H<sub>2</sub>S تقویت بلند مدت عصبی را با افزایش جذب Ca<sup>2+</sup> در آستروسیت با فعال کردن کانال گیرنده‌های کاتیونی (TRPA1) (Transient Receptor Potential Ankyrin1) تسهیل می‌دهد. سپس، آستروسیت، دی-سرین (D-serine) را داخل سیناپس رها کرده و باعث افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA می‌شود.

- Activity. *Geriatric Medicine Clinics*. 2010; 26(1):75-87.
2. Finder VH. Alzheimer's disease: A general introduction and pathomechanism. *Journal of Alzheimer's disease*. 2010; 22 (13): 5-19.
  3. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011; 10(9):819-828.
  4. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M, Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 2010; 9(7):702-716.
  5. Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevali CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric oxide*. 2013; 35: 5-20.
  6. Farrugia G, Szurszewski JH. Carbon Monoxide, Hydrogen Sulfide, and Nitric Oxide as Signaling Molecules in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology*. 2014; 147(2): 303-13.
  7. Abe K, Kimura H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *The Journal of neuroscience*. 1996; 16(3):1066-71.
  8. Nagy P, Palinkas Z, Nagy A, Budai B, Toth I, Vasas A Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1840: 876-891.
  9. Hu L, Lu M, Hon W, Bian J. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology. *Antioxidants & redox signaling*. 2011; 15(2): 405-19.
  10. Ko E, Takashi A, Kunimasa A, Takao M, Hideo K. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 293(5): 1485-1488.
  11. Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable  $\beta$ -amyloid deposition. *Neuroreport*. 2004; 15(11):1751-1754.
  12. Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, et al. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide. *Br J Pharmacol*. 2006;149(6):625-34.
  13. Dan WU, Qingxun HU, Xinhua LU, Lilong P, Qinghui X, Yi Zhun ZH. Hydrogen sulfide protects against apoptosis under oxidative stress through SIRT1 pathway in H9c2 cardiomyocytes. *Nitric Oxide*. 2014; 46: 204-212.
  14. Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J Neurochem*. 2007;100(4):1121-8.
  15. Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—evidence for a role of K<sup>+</sup> ATP channels. *Basic Res Cardiol*. 2006;101(1):53-60.
  16. Zhang Y, Li H, Zhao G, Sun A, Zong NC, Li Z, et al. Hydrogen sulfide attenuates the recruitment of CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells and regulates Bax/Bcl-2 signaling in myocardial ischemia injury. *Scientific Reports*. 2014; 10:10-38.
  17. Antonia K, Sofia B, Anastasia P, Csaba S. Regulation and role of endogenously produced hydrogen sulfide in angiogenesis. *Pharmacol Res*. 2016; 113: 175-185.
  18. 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): 3017-3022.
  19. Liang KY, Mintun MA, Fagan AM, Goate AM, Bugg JM, Holzman DM, et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann Neurol*. 2010; 68(3): 311-318.
  20. Tahmasebi Boroujeni S, Naghdi N, Shahbazi M, Farrokhi A, Bagherzadeh F, Kazemnejad A, et al. The Effect of Severe Zinc Deficiency and Zinc Supplement on Spatial Learning and Memory. *Biological trace element research*. 2009; 130(1):48-61.
  21. Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M. et al. The beneficial

effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiol Dis.* 2012; 45(3): 1153-1162.

22.Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B, et al. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- $\beta$  peptide injection in rats. *PloS one.* 2013; 8: e53117.

23.Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297(5580): 353-6.

24.Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences.* 2002; 25(6): 295-301.

25.Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann, K. Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP)-23 Model of Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry.* 2006; 60(12):1314-1323.

26.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. *Journal of Alzheimer's disease: JAD.* 2010;22(2):569-70.

27.Nagpure BV, Bian JS. Hydrogen sulfide inhibits A2A adenosine receptor agonist induced  $\beta$ -amyloid production in SH-SY5Y neuroblastoma cells via a cAMP dependent pathway. *PloS one.* 2014; 9(2): e88508.

28. Kang EB, Cho JY. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and  $\beta$ - amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry.* 2014;18(1):89-90.

29.Xuan-li H, Ning Y, Hua Z, Yun-wen Q, Li-juan Z, Meng-jie L, et al. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment and decreases production of A $\beta$  in APP/PS1 transgenic mice. *Neurochemen Int.* 2014; 67: 1-8.

30.Lazarov O, Mattson M.P, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 2010; 33(12): 569-579.