

## اثر هشت هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط و مصرف کروسین بر بیان ژن هیپوکامپی MAP-Tau و NGF در موش‌های مدل دژنراسیون هیپوکامپ

فاطمه اکبری<sup>۱</sup> - مهرزاد مقدسی<sup>۲\*</sup>

۱. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد داراب، دانشگاه آزاد اسلامی، داراب، ایران ۲. دانشیار فیزیولوژی

ورزشی، گروه تربیت بدنی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۹، تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸)

### چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرین استقامتی همراه با مکمل کروسین بر بیان ژن هیپوکامپی MAP-Tau و فاکتور رشد عصب (NGF) در موش‌های آلزایمری مدل تری متیل تین بود. در پژوهش تجربی حاضر، ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد اسپراگ داوولی با تزریق درون‌صفاقی ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن سم تری متیل تین (TMT) مبتلا به بیماری آلزایمر شده و به‌طور تصادفی به پنج گروه ۱. کنترل مبتلا به آلزایمر هفته اول، ۲. کنترل مبتلا به آلزایمر هفته آخر، ۳. تمرین استقامتی، ۴. تمرین استقامتی + مصرف مکمل کروسین و ۵. مصرف مکمل کروسین تقسیم شدند. به‌منظور بررسی تأثیر القای بیماری آلزایمر بر متغیرهای تحقیق ۱۶ سر موش صحرایی سالم در گروه کنترل قرار گرفتند و ۸ سر موش هفته اول و ۸ سر موش هفته آخر قربانی شدند. موش‌های صحرایی گروه‌های ۳ و ۴ به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته، هر جلسه ۱۵ تا ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر بر دقیقه روی نوار گردان ویژه موش‌های صحرایی دویدند و گروه‌های ۴ و ۵ به مدت هشت هفته روزانه ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن مکمل کروسین را به‌صورت صفاقی دریافت کردند. بیان ژن MAP-Tau و NGF در بافت هیپوکامپ با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل تحقیق از آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه با آزمون تعقیبی توکی و آزمون تحلیل واریانس دوره‌ای در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. نتایج نشان داد تزریق TMT موجب افزایش بیان ژن MAP-Tau در گروه مبتلا به آلزایمر نسبت به گروه کنترل سالم شد ( $P=0/001$ ). پس از هشت هفته مداخله، بیان ژن MAP-Tau در گروه تمرین ( $P=0/003$ )، گروه مصرف مکمل کروسین ( $P=0/002$ ) و گروه تمرین + مکمل کروسین ( $P=0/001$ ) کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل مبتلا به آلزایمر پیدا کرد و این کاهش در گروه تمرین + مکمل کروسین از همه بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد تزریق TMT موجب کاهش سطح NGF در گروه مبتلا به آلزایمر نسبت به گروه کنترل سالم شد ( $P=0/001$ ). پس از هشت هفته مداخله، بیان ژن NGF در گروه تمرین ( $P=0/002$ )، گروه مصرف مکمل کروسین ( $P=0/001$ ) و گروه تمرین + مکمل کروسین ( $P=0/003$ ) افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل مبتلا به آلزایمر پیدا کرد و این افزایش در مکمل کروسین از همه بیشتر بود. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد تمرین استقامتی موجب بهبود روند آلزایمر در موش‌ها می‌شود و مصرف مکمل کروسین این بهبود را تقویت می‌کند.

### واژه‌های کلیدی

آلزایمر، تخریب هیپوکامپ، تمرین استقامتی، کروسین، نروتروفین.

## مقدمه

هایپرفسفوریل‌شدن پروتئین MAP-Tau را در آسیب‌های عصبی نمی‌توان انکار کرد (۸). در مورد آسیب‌های ناشی از فسفوریل‌شدن MAP-Tau می‌توان به بیماری آلزایمر، پارکینسون و مولتیپل اسکلروزیس<sup>۳</sup> اشاره کرد (۴). همچنین بررسی مدل موش‌های تراریخته نشان می‌دهد که افزایش پروتئین فسفوریل‌شدن MAP-Tau موجب کاهش سلول‌های عصبی و اختلال در حافظه می‌شود و سرکوب بیان آن نیز به بهبود حافظه و افزایش تعداد اتصالات سیناپسی منجر می‌شود (۹).

از طرف دیگر، نوروتروفین‌ها طبقه مهمی از مولکول‌های ارسال سیگنال در مغزند که مسئول هدفمندی آکسون‌ها، رشد نورون‌ها، بلوغ سیناپس‌ها در طول توسعه و قابلیت انعطاف‌پذیری است (۱۰، ۱۱). این خانواده از مولکول‌ها شامل عامل رشد عصب<sup>۴</sup>، عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز<sup>۵</sup>، نوروتروفین-۳<sup>۶</sup> و نوروتروفین-۴<sup>۷</sup> هستند (۱۰). NGF یکی از مهم‌ترین نوروتروفین‌هاست که حدود ۶۰ سال پیش در موش و در سال ۱۹۸۳ در انسان شناسایی شده است (۱۲). NGF یک عامل پلی‌تروفیک در سیستم عصبی مرکزی است که در تکثیر، ترمیم و رشد نورون‌ها نقش دارد (۱۳). علاوه بر این، NGF نقش حفاظتی در برابر از دست دادن حافظه بر اثر پیری دارد و مشخص شده است که این پروتئین، نورون‌ها را در مقابل آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۱۴). مشخص شده است که سطح NGF در بیماران مبتلا به آلزایمر کاهش یافته (۱۵) و هر عاملی که بتواند سطح NGF را افزایش دهد، می‌تواند در بهبود آلزایمر نیز مؤثر باشد (۱۶).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند فعالیت‌های ورزشی و به‌خصوص تمرینات هوازی به‌واسطه افزایش جریان خون

بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری تحلیل‌برنده عصبی<sup>۱</sup> در افراد سالخورده است که میلیون‌ها نفر در سرتاسر دنیا گرفتار آن هستند (۱). این بیماری نوعی بیماری مغزی پیشرونده است که سبب اختلال در سیستم یادگیری و حافظه می‌شود. اختلال در گفتار و سایر فعالیت‌های شناختی در افراد مبتلا به مرور بروز می‌کند (۲). این بیماری با علائم بالینی اختلال در حافظه و ادراک، اختلالات رفتاری و روانی و اختلال در فعالیت‌های روزانه زندگی مشخص می‌شود (۳). دو علت آسیب‌شناسی این بیماری به‌صورت گسترده بررسی شده است که عامل اول، تجمع پپتید آمیلوئید بتا<sup>۲</sup> است که رسوبات به‌صورت پلاک آمیلوئیدی می‌توانند درون مغز تجمع کنند و تشکیل پلاک‌های پیری دهند و دومین عامل، تجمع پروتئین MAP-Tau است که به شکل نوروفیبریل‌های درهم‌پیچیده است (۴). MAP-Tau پروتئینی ساختاری-عملکردی است که به میکروتوبول متصل شده و توسط فسفاتازها و کینازها تنظیم می‌شود. این پروتئین اغلب در سلول‌های عصبی مرکزی بیان می‌شود (۵، ۶). این پروتئین، جفت شدن میکروتوبول‌ها را در بافت طبیعی افزایش می‌دهد و مراحل فعال رشد و تجمع آنها را محدود می‌کند. جهش‌های ژنی MAP-Tau با پیرایش نامناسب mRNA پیغامبر آن، سبب تغییرات غیرطبیعی پس از ترجمه مانند هایپر فسفوریل‌شدن و نیز ایجاد تعدادی از اختلالات تحلیل‌برنده عصبی می‌شود که در مجموع به تاوپاتی (آسیب‌های MAP-Tau) معروف است (۶). تحقیقات نشان می‌دهد که فسفوریل‌شدن پروتئین MAP-Tau می‌تواند به مرگ ناگهانی نورون‌ها منجر شود (۷). شایان ذکر است که نقش

5. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

6. Neurotrophic-3

7. Neurotrophic-4

1. Neurodegenerative disorder

2. Beta Amyloid Peptide (A $\beta$ )

3. Multiple Sclerosis (MS)

4. Nerve Growth Factor (NGF)

و تنتورهای آن در طب سنتی به‌عنوان ضداسپاسم، کمک به هضم طبیعی غذا، آرام‌بخش، ضدنفخ، محرک تمایلات جنسی و ایجاد قاعدگی زودرس استفاده می‌شود (۲۵). با مطالعه اثر کروسین در بیماری آلزایمر مشخص شده است که کروسین می‌تواند تأثیرات حفاظتی چندگانه‌ای بر مغز داشته و استفاده از آن برای پیشگیری از آلزایمر توصیه شده است (۲۶). اخیراً ثامنی و همکاران (۱۳۹۹) نیز دریافته‌اند که مصرف روزانه ۳۰ میلی‌گرم کروسین به ازای هر کیلو وزن بدن و به مدت دو هفته اثر محافظتی در برابر آسیب نورونی در هیپوکامپ و اختلالات حافظه‌ای در موش‌های آلزایمری ایجاد می‌کند (۲۷).

با وجود تأثیرات مثبت احتمالی جداگانه فعالیت ورزشی و کروسین در بهبود عملکرد مغز بیماران مبتلا به آلزایمر اما بر اساس اطلاعات ما تاکنون تحقیقی به بررسی همزمان فعالیت هوازی و مصرف کروسین بر بهبودی بیماری آلزایمر از طریق سازوکار تغییرات بیان ژن MAP-Tau و NGF نپرداخته است؛ از این‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تعاملی تمرین استقامتی همراه با مکمل کروسین بر بیان هیپوکامپی پروتئین‌های MAP-Tau و NGF در موش‌های آلزایمری مدل تری متیل تین (TMT) انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌های

در این تحقیق تجربی ابتدا ۵۶ سر موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ داوولی با میانگین سنی هشت هفته، و میانگین وزنی  $220 \pm 30/65$  گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری و به‌عنوان نمونه آماری در نظر گرفته شدند. پس از انتقال به مدت یک هفته به‌منظور سازگاری در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو، و تعداد پنج سر موش

مغزی، موجب تسهیل رشد و عملکرد عصبی شده و این تغییرات عروقی، سبب افزایش شکل‌پذیری قشری (به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ)، رشد و محافظت ساختار عصبی می‌شود (۱۷). همچنین تحقیقات انجام‌گرفته روی افراد سالمند حاکی از آن هستند که فعالیت بدنی، فعالیت ذهنی، رژیم غذایی و تغییر در پاسخ به محرک‌های استرس‌زا موجب حفظ سلامت مغز و کاهش خطر زوال عقل می‌شود (۱۸). مشخص شده است که تمرینات هوازی با شدت پایین و متوسط در مقایسه با تمرینات هوازی شدید به‌دلیل وارد کردن استرس کمتر می‌تواند موجب افزایش بیشتر سطح نروتروفین‌ها در ناحیه هیپوکامپ شود (۱۹). اگرچه برخی پژوهش‌ها به تأثیرات احتمالی فعالیت ورزشی در بهبود حافظه اشاره کرده‌اند، سازوکار اثر آنها به‌واسطه اثرگذاری بر تغییرات MAP-Tau و NGF در بیماران آلزایمری به‌درستی مشخص نیست و نتایج موجود متناقض‌اند. برای نمونه برخی تحقیقات حاکی از کاهش هایپرفسفریلاسیون MAP-Tau در هیپوکامپ موش‌های موش‌ها پس از انجام فعالیت ورزشی بوده‌اند (۲۰، ۲۱)، در حالی که این موضوع در برخی پژوهش‌ها به تأیید نرسیده است (۲۲).

از طرف دیگر، یافته‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که استرس اکسایشی ممکن است نقش مهمی را در عوامل بیماری‌زایی آلزایمر ایفا کند. بنابراین خطر بیماری آلزایمر ممکن است با مصرف آنتی‌اکسیدان‌هایی که تأثیرات نامطلوب استرس اکسایشی را خنثی می‌کنند، کاهش یابد (۲۳). ترکیبات پلی‌فنولی مختلف دارای فعالیت پاک‌کنندگی و توانایی فعال‌سازی آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدانی در مغز دارند؛ در نتیجه چرخه معیوب استرس اکسایشی و آسیب بافتی را مهار می‌کنند (۲۴). گیاه زعفران با نام علمی *crocus sativus* گیاهی علفی، بدون ساقه و پایاست. ترکیبات عمده زعفران شامل کروسیتین، کروسین و سافرانال است که از زعفران، عصاره‌ها

### ملاحظات اخلاقی

این طرح با اخذ مجوز و تحت نظارت کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد لارستان و کد اخلاق IR.SUMS.REC.1396.S446 از دانشگاه علوم پزشکی شیراز و بر اساس معاهده نگهداری و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی ۱۹۹۳ انجام گرفته است.

### پروتکل تمرین

برای انجام تمرینات استقامتی با استفاده از نوار گردان ویژه موش‌های صحرایی ساخت شرکت دانش‌سالار ایرانیان، استفاده شد. موش‌های صحرایی به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته بدون شیب به تمرینات مورد نظر پرداختند. برای آشنایی حیوانات با نوار گردان موش‌های صحرایی به مدت یک هفته به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با سرعت ۵ تا ۸ دقیقه روی نوار گردان بدون شیب راه رفتند. همچنین در مرحله اضافه بار، موش‌های صحرایی به مدت دو هفته، هر جلسه ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه به تمرین استقامتی پرداختند و پس از آن شدت و مدت تمرینات به تدریج تا ۳۰ دقیقه و سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در هفته هشتم رسید. همچنین در هر جلسه تمرین پنج دقیقه برای گرم کردن و پنج دقیقه برای سرد کردن به مدت زمان تمرینات اصلی افزوده شد (۲۹).

### تشریح حیوانات آزمایشگاهی

به منظور بررسی اثر متغیر مستقل بر تغییرات احتمالی متغیرهای وابسته طبق برنامه از پیش تعیین شده، همه حیوانات مورد بررسی ابتدا با ترکیب ۳ به ۵ کتامین و زایلوزین بی‌هوش شدند و پس از بی‌هوشی کامل و اطمینان از بی‌هوشی و عدم حس درد پس از شکافتن جمجمه بافت هیپوکامپ توسط متخصصان از مغز جدا شد (۲۹). بافت هیپوکامپ برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر با دمای

صحرایی در هر قفس نگهداری شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد و چرخه روشنایی- تاریکی نیز هر ۱۲ ساعت یک بار به‌طور دقیق توسط تنظیم‌کننده الکترونیکی نور سالن تنظیم می‌شد. سر موش صحرایی با تزریق درون‌صفاقی ۸ mg/kg نوروئوکسین (TMT ساخت شرکت سیگما آلمان) قرار گرفتند (۳۳) و پس از ۲۴ ساعت برای بررسی القای آلزایمر رفتار حیوان مشاهده شد. عنوان شده است که پس از تزریق TMT، یک‌سری علائم رفتاری در موش‌ها مشاهده می‌شود. این علائم بالینی عبارت‌اند از: ۱. رعشه‌های عضلانی، ۲. افزایش دمای بدن، ۳. خونریزی از چشم و بینی، ۴. حالت تهوع، ۵. تشنج و ۶. پیچ‌وتاب‌های دمی (۲۸). پس از ۲۴ ساعت که از تأثیر کامل آن بر هیپوکامپ اطمینان حاصل شد، نمونه‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه ۸ سری ۱. کنترل مبتلا به آلزایمر هفته اول، ۲. کنترل مبتلا به آلزایمر هفته آخر، ۳. تمرین استقامتی، ۴. تمرین استقامتی + مصرف مکمل کروسین و ۵. مصرف مکمل کروسین تقسیم شدند. شایان ذکر است که برای بررسی تأثیرات تزریق نوروئوکسین TMT بر سطوح متغیرهای پژوهش، ۱۶ سر موش صحرایی سالم در دو گروه کنترل سالم هفته اول و گروه کنترل سالم هفته آخر قرار گرفتند. این موش‌ها تحت تأثیر ماده بی‌اثر سالین قرار داشتند. در ادامه موش‌های صحرایی گروه‌های ۳ و ۴ به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته و هر جلسه ۱۵ تا ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر بر دقیقه روی نوار گردان ویژه موش‌های صحرایی دویند (۲۹) و گروه‌های ۴ و ۵ به مدت هشت هفته روزانه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از وزن موش‌های صحرایی، عصاره کروسین را به‌صورت درون‌صفاقی دریافت کردند.

مورد نیاز ترکیب شد و محصول به مدت ۵ ثانیه ورتکس جهت مخلوط شدن و ۵ ثانیه میکروپیوژ شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه جهت سنتز cDNA بر روی Dry-Block در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، در نهایت برای توقف سنتز cDNA به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. توالی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از سایت NCBI به دست آمد و با به‌کارگیری امکانات موجود در این سایت، پرایمرهای اختصاصی برای هر کدام از ژن‌ها طراحی شد. سپس با نرم‌افزارهای دیگر پرایمرهای طراحی شده بررسی شد. در طراحی این پرایمرها نهایت دقت به عمل آمد تا خصوصیات لازم برای استفاده از آنها در Real-time PCR نیز لحاظ شود. جدول ۱ اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده برای سنجش هر ژن را ارائه می‌دهد.

کمی‌سازی میزان تکثیر ژن هدف و ژن کنترل داخلی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Normalized target gene expression level in sample} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

جدول ۱. ویژگی‌های پرایمرهای طراحی شده برای هر ژن

Gene	Primer sequence
Tau	F: 5' TGCCCATGCCAGACCTAAAG 3'
	R: 5' CCACACTTGGACTGGACGTT 3'
NGF	F: 5' ATGCCAGATGGAACAGAAGAT3'
	R: 5' CTGGCAGTCGTGTTGAGAGAG3'

متغیرهای مورد بررسی از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه همراه با آزمون تعقیبی توکی و تحلیل واریانس دوره‌ای در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. حداقل سطح معناداری  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی آزمایش‌ها در آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انجام گرفت.

### روش اندازه‌گیری متغیرها

جداسازی مولکول‌های ANR از بافت فریزشده هیپوکامپ پس از هموژنایز، طبق روش استاندارد، ANR نمونه‌ها از بافت هیپوکامپ استخراج شد. پس از استخراج ANR کمیت و کیفیت آن با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانو دراپ ارزیابی شد، در روش اسپکتروفتومتری غلظت نمونه ANR، با استفاده از تعیین جذب نوری در طول موج ۰۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین خلوص RNA از محاسبه نسبت A260/A280 استفاده شد. نمونه‌های دارای OD<sup>1</sup> مناسب (محدوده ۱/۸ تا ۲) برای انجام مراحل بعد انتخاب شدند. در ادامه طبق دستور کیت Ruhs ساخت آلمان، مقدار RNA لازم جهت سنتز ۲۰ میکرولیتر cDNA با مواد

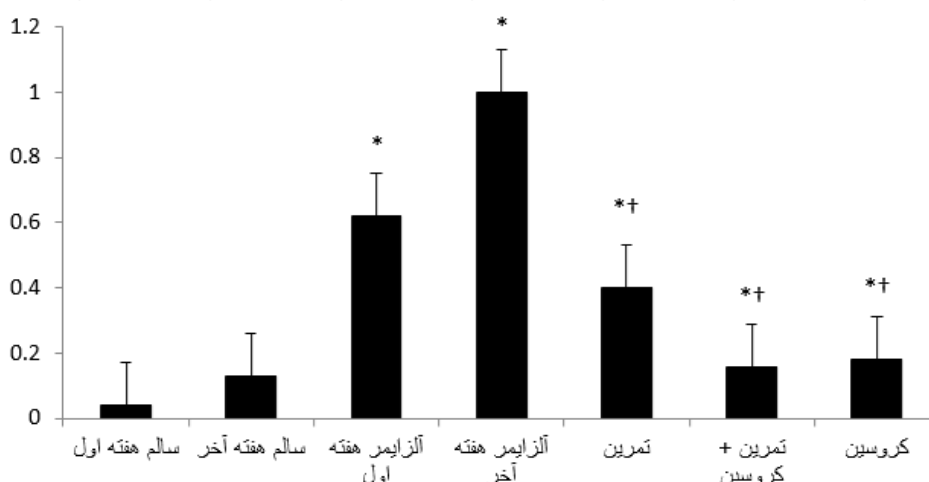
### تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش ابتدا به منظور بررسی توزیع طبیعی اطلاعات از آزمون شاپیروویلک استفاده شد. از آنجا که داده‌ها دارای توزیع طبیعی بودند، برای بررسی تغییرات

## یافته‌ها

کروسین و فعالیت ورزشی بر بیان ژن MAP-Tau از آزمون تحلیل واریانس دوراهه استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد پس از هشت هفته مداخله، بیان ژن MAP-Tau در گروه تمرین (اندازه اثر  $0.17$ ،  $P=0.03$ )، گروه مصرف مکمل کروسین (اندازه اثر  $0.2$ ،  $P=0.02$ ) و گروه تمرین + مکمل کروسین (اندازه اثر  $0.24$ ،  $P=0.001$ ) کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل مبتلا به آلزایمر پیدا کرد و این کاهش در گروه تمرین + مکمل کروسین از همه بیشتر بود (شکل ۱).

نتایج نشان آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد تفاوت معناداری در مقدار بیان ژن هیپوکامپی Tau-MAP وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن MAP-Tau گروه کنترل سالم هفته اول و گروه کنترل سالم هفته آخر اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ( $P=0.57$ )، در حالی که بیان ژن این پروتئین در گروه کنترل مبتلا به آلزایمر به طور معناداری نسبت به گروه کنترل سالم بالاتر بود ( $P=0.001$ ). برای تشخیص اثر تعاملی مصرف



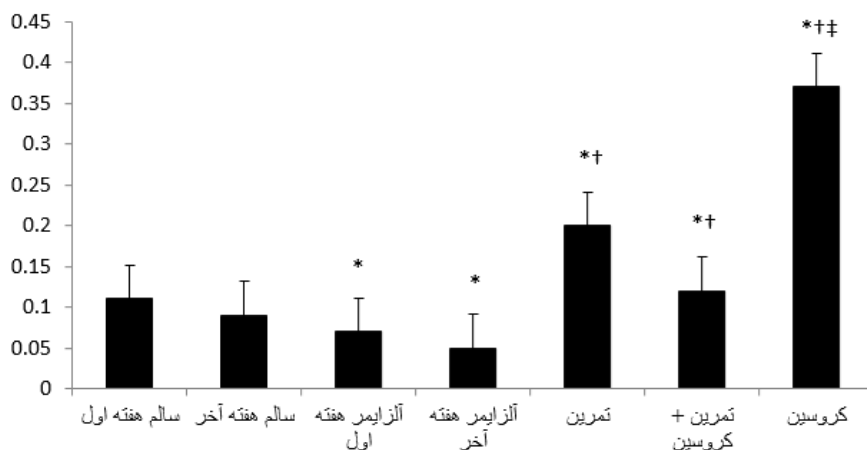
شکل ۱. تغییرات بیان ژن MAP-Tau در گروه‌های مختلف

\* اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم هفته اول ( $P < 0.05$ )

† اختلاف معنادار با گروه آلزایمر ( $P < 0.05$ )

و فعالیت ورزشی بر بیان ژن NGF از آزمون تحلیل واریانس دوراهه استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد پس از هشت هفته مداخله، بیان ژن NGF در گروه تمرین (اندازه اثر  $0.19$ ،  $P=0.02$ )، گروه مصرف مکمل کروسین (اندازه اثر  $0.26$ ،  $P=0.01$ ) و گروه تمرین + مکمل کروسین افزایش معناداری (اندازه اثر  $0.16$ ،  $P=0.03$ ) نسبت به گروه کنترل مبتلا به آلزایمر پیدا کرد و این افزایش در گروه کروسین از همه بیشتر بود (شکل ۲).

در خصوص تغییرات بیان ژن NGF نتایج نشان آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد تفاوت معناداری در مقدار بیان ژن این پروتئین ( $P=0.001$  و  $F=22.54$ ) در گروه‌های تحقیق وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن NGF کنترل سالم هفته اول و گروه کنترل سالم هفته آخر اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ( $P=0.34$ )، در حالی که بیان ژن این پروتئین در گروه کنترل مبتلا به آلزایمر به طور معناداری نسبت به گروه کنترل سالم پایین تر بود ( $P=0.001$ ). برای تشخیص اثر تعاملی مصرف کروسین



شکل ۲. تغییرات بیان ژن NGF در گروه‌های مختلف

\* اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم (۰/۰۵)  $R <$

† اختلاف معنادار با گروه آژایمر (۰/۰۵)  $R <$

‡ اختلاف معنادار با گروه تمرین + کروسین (۰/۰۵)  $R <$

## بحث

پژوهش حاضر با هدف مشخص ساختن اثر تعاملی تمرین استقامتی و مصرف کروسین بر بیان ژن این دو پروتئین در موش‌های مبتلا به آژایمر انجام گرفت. نتایج نشان داد پس از القای آژایمر توسط TMT، بیان ژن MAP-Tau در بافت هیپوکامپ افزایش معناداری پیدا کرد، اما مقدار بیان ژن آن در موش‌هایی که تمرینات استقامتی، مصرف کروسین و ترکیبی از این دو را داشتند، نسبت به گروه کنترل آژایمر کاهش معناداری داشته است. در این میان، موش‌های آژایمری که تمرین استقامتی را در کنار مصرف کروسین داشتند با کمترین مقدار بیان ژن MAP-Tau مواجه شدند. مطالعات بالینی گذشته نشان داده‌اند که بیان ژن MAP-Tau در هیپوکامپ افراد مبتلا به آژایمر افزایش (۴)، درحالی که بیان ژن NGF کاهش پیدا می‌کند (۱۵).

پروتئین MAP-Tau اساساً در تنظیم پایداری میکروتوبول و همچنین انتقال آکسونی محموله‌های مولکولی بین جسم سلولی و سیناپس نقش دارد (۳۰).

MAP-Tau همچنین به‌عنوان یک پروتئین داربستی اختصاصی عمل می‌کند و به این وسیله در گرفتن بخشی از پیام‌های مختلف در هدایت آبخار پیام‌رسانی نقش دارد. اما سمیت مرتبط با MAP-Tau در بیماری آژایمر، ناشی از موقعیت اشتباه آن در جسم سلولی یا دندریت و یا فسفریلاسیون زیاد آن است که موجب میان کنش آن با مولکول‌های نابجا می‌شود. بدین‌منظور که در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی از جمله آژایمر، فسفریلاسیون‌های غیرطبیعی MAP-Tau عملکرد طبیعی آن را مختل می‌کند و به تشکیل خود تجمعی به‌صورت رشته‌های نامحلولی به نام رشته‌های ماریچی جفت منجر می‌شود (۳۱). از این رو سازوکارهای کلیدی مسئول هایپرفسفریلاسیون MAP-Tau به‌طور دقیقی مشخص نشده است، اما به احتمال زیاد ناشی از برهم خوردن تعادل بین کینازها و فسفاتازهایی است که فسفریلاسیون این پروتئین را بر عهده دارند (۳۲). پژوهش‌های اخیر در خصوص مدل‌های موش‌های تراویخته نشان می‌دهد که افزایش پروتئین فسفوریل‌شده MAP-Tau موجب کاهش

تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌واسطه فعال شدن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است (۳۶). از دیگر سازوکارهای کاهش بیان ژن MAP-Tau در هیپوکامپ، افزایش بیان ژن SIRT 1 است (۳۶). مطالعات بالینی نشان داده‌اند که بیان ژن SIRT 1 با پیشرفت بیماری آلزایمر کاهش پیدا می‌کند (۳۷) و فعال‌سازی SIRT 1 به‌واسطه کاهش MAP-Tau می‌تواند در بهبود آلزایمر مؤثر باشد (۳۶). فعالیت ورزشی هوازی در افزایش بیان ژن SIRT 1 مؤثر است (۳۸) و سازوکار احتمالی دیگری که می‌تواند در کاهش بیان ژن MAP-Tau مؤثر دانست، افزایش بیان ژن SIRT 1 است. البته از آنجا که در پژوهش حاضر استرس اکسایشی، سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و SIRT 1 اندازه‌گیری نشده، بررسی این سازوکارهای احتمالی نیازمند مطالعات بیشتری است.

از دیگر یافته‌های تحقیق حاضر، افت بیان ژن MAP-Tau در گروه مصرف مکمل کروسین بود و این کاهش در گروه تمرین + مکمل کروسین از دیگر گروه‌های مداخله‌گر بیشتر بود. راشدی‌نیا و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده‌اند که مصرف مکمل کروسین موجب کاهش فسفریلاسیون پروتئین Tau در موش‌های آلزایمری می‌شود (۳۹). این محققان عنوان کرده‌اند مصرف کروسین به‌عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌واسطه کاهش استرس اکسایشی از طریق مسیر پروتئین کیناز فعال‌شده توسط میتوزن (MAPK) در کاهش فسفریلاسیون Tau و پیشگیری از پیشرفت بیماری آلزایمر مؤثر باشد (۳۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیان ژن NGF در گروه کروسین، گروه تمرین و گروه تمرین + مکمل کروسین افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل مبتلا به آلزایمر پیدا کرده است و این افزایش در گروه کروسین از همه بیشتر بود. سطح تمامی نوروتروفین‌ها به‌خصوص BDNF و

سلول‌های عصبی و اختلال در حافظه می‌شود و سرکوب بیان آن نیز به بهبود حافظه و افزایش تعداد اتصالات سیناپسی منجر می‌شود (۲۰). با توجه به تأثیر شایان توجه نوروتوکسین TMT بر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و فعال‌سازی مسیرهای اتوفاژی (۳۳)، به‌نظر می‌رسد افزایش MAP-Tau در تحقیق حاضر تحت تأثیر مسیر سیگنالی این سم قرار گرفته باشد.

نتایج نشان داد در گروه تمرین، بیان ژن MAP-Tau در هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل آلزایمر به‌طور معناداری پایین‌تر است و این نتایج همراستا با تحقیقات گذشته است (۳۴، ۳۵). پیش از این برای نمونه لئو و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کرده‌اند که پس از یک دوره تمرین مقدار بیان ژن MAP-Tau در موش‌های آلزایمری کمتر شده است (۳۵). اوہیا- نوکو او همکاران (۲۰۱۴) علت تعدیل فسفریلاسیون پروتئین Tau را افزایش بیان ژن پروتئین‌های سیناپسی عنوان کرده‌اند (۳۴). دلیل آن است که مشخص شده هایپرفسفریلاسیون پروتئین Tau با از دست رفتن پروتئین‌های سیناپسی از جمله سیناپتوفیسین، سیناپسین-۱ و پروتئین پس‌سیناپسی-۹۵ و افت عملکرد آنها ارتباط دارد (۳۴).

از طرف دیگر علت کاهش فسفریلاسیون Tau پس از اجرای فعالیت‌های ورزشی، افزایش سطح نوروتروفین‌های مغز عنوان شده است (۳۴). در تحقیق حاضر بیان ژن NGF در گروه تمرین افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل آلزایمر داشت و به‌نظر می‌رسد افزایش بیان ژن NGF می‌تواند یکی از سازوکارهای مسئول در افت بیان ژن MAP-Tau باشد.

اخیراً مشخص شده است که هایپرفسفریلاسیون Tau با استرس اکسایشی ارتباط مستقیم دارد (۳۶) و یکی از دلایل کاهش بیان ژن این پروتئین در هیپوکامپ کاهش



آنتی‌اکسیدانی کروسین، موجب افزایش بیان ژن NGF در نمونه‌های آلزایمری شود. با این حال از آنجا که تغییرات گونه‌های فعال اکسیژن و میزان استرس اکسایشی در تحقیق حاضر اندازه‌گیری نشده‌اند، از این‌رو بررسی سازوکار احتمالی مذکور نیازمند مطالعات خاصی در این زمینه است.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد القای بیماری آلزایمر توسط TMT موجب افزایش بیان ژن MAP-Tau و کاهش بیان ژن NGF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی می‌شود. فعالیت هوازی و مصرف آنتی‌اکسیدان کروسین می‌تواند به‌تنهایی و در تعامل با یکدیگر در کاهش بیان ژن MAP-Tau و افزایش NGF در موش‌های آلزایمری مؤثر باشد. از آنجا که اثر مصرف کروسین در تعامل با فعالیت ورزشی بر سطوح نروتروفین‌های مغز به‌خصوص NGF در نمونه‌های آلزایمری کمتر بررسی شده و سازوکارهای مربوط به تغییرات این پروتئین در بافت هیپوکامپ به‌درستی مشخص نیست، بنابراین انجام مطالعات بیشتر برای شناسایی سازوکارهای درگیر پیشنهاد می‌شود.

### تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

NGF در بیماران مبتلا به آلزایمر کاهش پیدا می‌کند (۱۵) و همراستا با نتایج تحقیق حاضر مشخص شده است که فعالیت ورزشی می‌تواند سطح NGF را در نمونه‌های آلزایمری افزایش دهد (۴۰). تحقیقات نشان داده‌اند تمرینات هوازی با افزایش دادن جریان خون مغز موجب تسهیل رشد و عملکرد عصبی شده و این تغییرات عروقی، سبب افزایش شکل‌پذیری قشری (به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ)، رشد و محافظت ساختار عصبی می‌شود (۱۷). علاوه بر این مشخص شده است که تمرینات هوازی با شدت پایین و متوسط در مقایسه با تمرینات هوازی شدید به‌دلیل وارد کردن استرس کمتر می‌تواند موجب افزایش بیشتر سطح نروتروفین‌ها در ناحیه هیپوکامپ شود (۱۹). شاهد و همکاران (۱۳۹۶) افزایش بیان ژن NGF در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری شده به‌واسطه فعالیت هوازی را نقش محافظتی بیشتر نروتروفین‌ها و فاکتورهای رشد عصب در برابر پیشرفت بیماری آلزایمر عنوان کرده‌اند. اگرچه پیش از این مشخص شده است که مصرف کروسین به‌تنهایی یا در تعامل با فعالیت ورزشی می‌تواند در افزایش بیان ژن NGF مؤثر باشد (۴۱، ۴۲)، اما بر اساس اطلاعات ما تاکنون اثر مصرف کروسین بر بیان ژن NGF در هیپوکامپ بیماران آلزایمری انجام نگرفته است. وانگ و همکاران (۲۰۱۹) عنوان کرده‌اند مصرف کروسین گونه‌های فعال اکسیژن را در موش‌های مبتلا به آلزایمر کاهش و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و به این واسطه در بهبود بیماری آلزایمر مؤثر است (۴۳). گزارش شده است که مصرف روزانه ۳۰ میلی‌گرم کروسین به ازای هر کیلو وزن بدن و به مدت دو هفته اثر محافظتی در برابر آسیب نورونی در هیپوکامپ و اختلالات حافظه‌ای در موش‌های آلزایمری ایجاد کرده است (۲۷). با توجه به ارتباط معکوس بین سطح استرس اکسایشی و سطح نروتروفین‌ها، ممکن است کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌دلیل خاصیت

## References

1. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 2013; 9: 63-75.
2. Gold CA, Budson AE. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert Rev Neurotherapeutic* 2008; 8: 1879-1891.
3. Hong-Qi Y, Zhi-Kun S, Sheng-Di C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: Focused on considerations targeting A $\beta$  and tau. *Transl Neurodegener* 2012; 1: 1-12.
4. Ohia-Nwoko O, Montazari S, Lau YS, Eriksen JL. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 54-71.
5. Goedert M, Spillantini MG. Pathogenesis of the tauopathies. *J Mol Neurosci* 2011; 45: 425-431.
6. Karakaya T, Fusser F, Prvulovic D, Hampel H. Treatment options for tauopathies. *Curr Treat Options Neurol* 2012; 14: 126-136.
7. Kamat P, Vacek J, Kalani A, Tiagy N. Homocystein induced cerebrovascular dysfunction: A link to Alzheimers disease etiology. *Open Neural J* 2015; 9: 9-14.
8. Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 2008; 85: 148-75.
9. Liu Z, Li T, Li P, Wei N, Zhao Z, Liang H, et al. The ambiguous relationship of oxidative stress, Tau hyperphosphorylation, and autophagy dysfunction in Alzheimers disease. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 352723.
10. Hiempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* 2006; 3: 19-24.
11. Reichardt LF. Neurotrophine-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-1564.
12. Ullrich A, Gray A, Berman C. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*, 1983; 303:821-825.
13. Fischer W, Björklund A, Chen K. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 1991; 11: 1889-1906.
14. Ang ET, Gomez-Pinilla F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2564-2571.
15. Scott SA, Crutcher KA. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 1994; 5: 179-211.
16. Lapchak PA. Nerve growth factor pharmacology: application to the treatment of cholinergic neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1993; 124: 16-20.
17. 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.

18. Shah T, Verdile G, Sohrabi H, Campbell A, Putland E, Cheethman, C, et al. A combination of physical activity and computerized brain training improves verbal memory and increases cerebral glucose metabolism in the elderly. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e487.
19. Vosadi E, Ravasi AA, Choobine S, Barzegar H, Borjianfard M. Effect of endurance training and omega-3 supplementation in brain-driven neurotrophic factor (BDNF) in male adult rat hippocampus. *Razi J Med Sci* 2007; 15: 33-40.
20. Liu Y, Chu JMT, Yan T, Zhang Y, Chen Y, Chang RCC, Wong GTC. Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2020; 17: 4-20.
21. Liang KY, Mintun MA, Fagan AM, Goate AM, Bugg JM, Holtzman DM, et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann Neurol* 2010; 68: 311-318.
22. Omidi M, Ghanbarzadeh M, Nikbakht M, Habibi A, Ranjbar R. Effect of continuous aerobic exercise on nerve growth factor in diabetic rats. *Ann Mil Health Sci Res* 2018; 16: e85194.
23. Gwaram SN, Abdulla AM, Sukumaran DS. Synthesis, Characterization, X-ray Crystallography, Acetyl choline cholinesterase Inhibition and Antioxidant Activities of some Novel ketone Derivatives of Gallic Hydrozide-Derived Schiff Bases. *Molecules* 2012; 17: 27-38.
24. Farbood Y, Sarkaki A, Hashemi SH. The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/ reperfusion in wistar rats. *Avicenna J* 2013; 25: 1-12.
25. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 1996; 10: 189-193.
26. Finley JW, Gao S. A perspective on crocus sativus L. (Saffron) constituent crocin: A potent water-soluble antioxidant and potential therapy for Alzheimer's diseases. *J Agric Food Chem* 2017; 65: 1005-1020.
27. Sameni HR, Talebian A, Vafaei AA, Zarbakhsh S, Yaghoubi Z, Aldaghi M. Effect of crocin on histological changes of hippocampus and memory impairment induced by scopolamine in male rats. *J Gorgan Uni Med Sci* 2020; 22: 35-41.
28. Yazdani H, Soltani Tehrani B, Babaei P. Effects of kiss peptin13 on spatial memory in streptozotocin-induced Alzheimer's disease (AD) in Rats. *J Guilan Uni Med Sci* 2015; 24: 54-62.
29. Bazyar Y, Edalatmanesh MA, Hosseini SA, Zar A. The effects of endurance training and gallic acid on BDNF and TNF-a in male rats with Alzheimer. *Intern J Appl Exerc Physiol* 2016; 5: 45-54.
30. Barbier P, Zejnelli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, et al. Role of Tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. *Fronti Aging Neurosci* 2019, 11: 1-14.
31. Peric A, Annaert W. Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol* 2015; 129: 363-381.

32. Risacher SL, Saykin AJ. Neuroimaging and other biomarkers for Alzheimer's disease: the changing landscape of early detection. *Annu Rev Clin Psychol* 2013; 9: 621-648.
33. Malekzadeh S, Edalatmanesh MA, Mehrabani D, Shariati M. Drugs induced Alzheimer's disease in animal model. *Galen Med J* 2017; 6: 185-196.
34. Ohia-Nwoko O, Montazari S, Lau YS, Eriksen JL. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 54-71.
35. Liu Y, Chu JMT, Yan T, Zhang Y, Chen Y, Chang RCC, Wong GTC. Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2020; 17: 4-20.
36. Liang J, Wang C, Zhang H, Huang J, Xie J, Chen N. Exercise-induced benefits for Alzheimer's disease by stimulating mitophagy and improving mitochondrial function. *Fronti Aging Neurosci* 2021, 13: 1-17.
37. Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, et al. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 2010; 67: 953-966.
38. Koo JH, Kang EB, Oh YS, Yang DS, Cho JY. Treadmill exercise decreases amyloid-b burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2017; 288: 142-152.
39. Rashedinia M, Lari P, Abnous K, Hosseinzadeh H. Protective effect of crocin on acrolein-induced tau phosphorylation in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp* 2015; 75: 208-219.
40. Shahed A, Ravasi AA, Choubineh S, Khodadadi D. Effect of four weeks exercise prior preparation before Alzheimer's induction on the levels of nerve growth factor and beta amyloid in the hippocampus of wistar male rats. *J Arak Uni Med Sci* 2018; 20: 56-66.
41. Razavi H, Hosseini SA, Nikbakht M. Neurotrophic effects of swimming and crocin consumption on the rats with obesity induced by a high-fat diet. *J Nutr Fast Helath* 2020; 8: 48-54.
42. Razavi H, Hosseini SA, Nikbakht M. The effect of continued and interval training with crocin consumption on BDNF and NGF gene expression in heart tissue of diabetic rats. *J Kashan Uni Med Sci* 2019; 23: 10-19.
43. Wang C, Cai X, Hu W, Li Z, Kong F, Chen X, Wang D. Investigation of the neuroprotective effects of crocin via antioxidant activities in HT22 cells and in mice with Alzheimer's disease. *Intern J Molecul Med* 2019; 43: 956-966.

## Effect of Eight-Week Moderate Intensity Endurance Training with Crocin Consumption on MAP-Tau and NFG Gene Expression in Rats with Hippocampal Degeneration Model

Fatemeh Akbari<sup>1</sup> - Mehrzad Moghadasi<sup>\*2</sup>

1. Assistant professor in exercise physiology, Department of exercise physiology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran 2. Associate professor in exercise physiology, Department of exercise physiology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

(Received:2022/06/19;Accepted:2022/10/10)

### Abstract

The purpose of present study was to examine the effect of eight weeks endurance training with crocin consumption on MAP-Tau and NFG gene expression in rats treated with Trimethytin (TMT) as a model of Alzheimer's disease. In this experiment, 40 mature Sprague-Dawley male rats were subjected to Alzheimer's disease through intraperitoneally injection of 8 mg/kg Trimethytin (TMT) and then were divided into 1) Alzheimer-infected control group, 2) endurance training, 3) endurance training + crocin, 4) crocin, and 5) sham to study the impact of the disease on the variables. 8 healthy rats were assigned to the control group. The rats in the second and the third groups ran on a rat treadmill with the speed of 15 to 20 meters per minute for 15 to 30 minutes in each session, 3 times a week for 8 weeks. The rats in the third and the fourth groups received daily IP injections of 25 mg/kg body weight of crocin for 8 weeks. MAP-Tau and NFG gene expression in hippocampi were measured through Real-time PCR. To analyze the results of the tests, one-way ANOVA, Tukey post hoc test, and two-way ANOVA were run using SPSS-22. The results indicated that TMT injection increases the MAP-Tau gene expression in the Alzheimer-infected control group compare to the healthy control group ( $P=0.001$ ). After eight weeks intervention, MAP-Tau gene expression was decreased in endurance training ( $P=0.03$ ), endurance training + crocin ( $P=0.02$ ) and crocin groups ( $P=0.001$ ) and the decrease of MAP-Tau gene expression was greater in the training + crocin group. Results also demonstrated that NGF gene expression was increased in endurance training ( $P=0.02$ ), endurance training + crocin ( $P=0.03$ ) and crocin ( $P=0.01$ ) groups and the increase of NGF gene expression was greater in the saffron intake group. Generally, it seems that endurance training improves Alzheimer's disease in rats and crocin consumption enhances these effects.

### Keywords

Alzheimer's disease, hippocampal degeneration, endurance training, Crocin, Neurotrophin.

\* Corresponding Author: E-mail: mehrzad.moghadasi@gmail.com