

## نقش تمرین هوازی و دریافت مکمل امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری‌شده با هوموسیستئین

رضا قراری عارفی<sup>۱</sup>، مرضیه ثاقب‌جو<sup>۲</sup>، مهدی هدایتی<sup>۳</sup>، رزینا فتحی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشگاه بیرجند

۲. دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشگاه بیرجند\*

۳. دانشیار بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴. دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشگاه مازندران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۷

### چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر هشت هفته تمرین هوازی و دریافت مکمل امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری‌شده با هوموسیستئین می‌باشد. بدین‌منظور، ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (سن ۱۲ هفته و میانگین وزن  $222/31 \pm 11/91$  گرم) به شش گروه مساوی آلزایمری + امگا سه، آلزایمری + تمرین، آلزایمری + تمرین + امگا سه، کنترل سالم، شم و کنترل آلزایمری تقسیم شدند. شایان‌ذکر است که برای القای آلزایمر از تزریق هوموسیستئین با دوز  $0/6$  مولار به درون بطن مغز استفاده شد و تمرین با سرعت  $20$  متر در دقیقه ( $60$  دقیقه در هر جلسه، پنج روز در هفته روی نوار گردان) اعمال گردید. گروه‌های مکمل در مدت هشت هفته، روزانه  $800$  میلی‌گرم به-ازای هر کیلوگرم وزن بدن، مکمل امگا سه دریافت کردند. لازم‌به‌ذکر است که سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او به روش الایزا اندازه‌گیری گشت. تحلیل داده‌ها نیز با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان می‌دهد که سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او هیپوکامپ در گروه‌های آلزایمری + تمرین، آلزایمری + مکمل امگا سه و کنترل سالم نسبت به گروه کنترل آلزایمری به‌صورت معناداری پایین‌تر بود (مقادیر  $P$  به‌ترتیب  $0/03$ ،  $0/01$  و  $0/003$ ). درمقابل، سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او هیپوکامپ در گروه آلزایمری + تمرین + مکمل امگا سه نسبت به گروه کنترل آلزایمری تفاوت معناداری نداشت ( $P = 0.34$ ). به‌نظر می‌رسد تمرین هوازی و مصرف امگا سه به‌طور مستقل می‌توانند باعث کاهش پروتئین فسفریله‌ت‌او در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری گردند و نیز این‌که استفاده هم‌زمان از دو شیوه باعث تعدیل اثر هریک از این مداخلات می‌شود.

**واژگان کلیدی:** تمرین هوازی، اسید چرب امگا سه، آلزایمر، پروتئین تاو، هوموسیستئین

## مقدمه

بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری تحلیل‌برندهٔ عصبی<sup>۱</sup> در افراد سالخورده است (۱). این بیماری با علائم بالینی اختلال در حافظه و ادراک، اختلالات رفتاری و روانی و اختلال در فعالیت‌های روزانهٔ زندگی مشخص می‌شود (۲). دو علت آسیب‌شناسی این بیماری به‌صورت گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است که عامل اول، تجمع پپتید آمیلوئید بتا<sup>۲</sup> (A $\beta$ ) است (که رسوبات به‌صورت پلاک آمیلوئیدی می‌توانند درون مغز تجمع کنند و تشکیل پلاک‌های پیری دهند) (۳) و دومین عامل، تجمع پروتئین‌های هایپرفسفریلهٔ تاو<sup>۳</sup> می‌باشد (که به‌شکل نوروفیبریل‌های درهم‌پیچیده<sup>۴</sup> می‌باشد) (۳،۴). رابطهٔ بین این دو آسیب‌شناسی تاکنون به‌صورت کامل شناخته نشده است، اما برای درمان موفقیت‌آمیز آن، این احتمال وجود دارد که نیاز به کاهش هر دو عامل باشد. مدل‌های موش آلزایمری برای بررسی روش‌های درمانی جدید با این امید که این یافته‌ها قابل‌تعمیم به انسان باشد بسیار مفید خواهد بود (۳).

تاو، پروتئینی متصل به میکروتوبول است و پروتئینی ساختاری و عملکردی در دستگاه عصبی می‌باشد (۵) که توسط فسفاتازها و کینازها تنظیم می‌شود (۴) و عمدتاً در سلول‌های عصبی دستگاه عصبی مرکزی بیان می‌شود (۶). به‌لحاظ عملکردی، پروتئین تاو نقش مهمی در محافظت، ثبات و گسترش اتصال میکروتوبول‌ها و ساختار ریخت‌شناسی طبیعی نورون‌ها دارد و در انتقال پیام در نورون‌ها بااهمیت می‌باشد (۷). این پروتئین، جفت‌شدن میکروتوبول‌ها را در بافت طبیعی افزایش می‌دهد و مراحل فعال رشد و تجمع آن‌ها را محدود می‌کند. جهش‌های ژن تاو با پیرایش نامناسب mRNA پیغامبر آن، سبب تغییرات غیرطبیعی پس از ترجمه از قبیل هایپرفسفریله‌شدن و نیز ایجاد تعدادی از اختلالات تحلیل‌برندهٔ عصبی می‌شود که در مجموع به تاو پاتی<sup>۵</sup> (آسیب‌های تاو) معروف می‌باشد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فسفریله‌شدن پروتئین تاو می‌تواند منجر به مرگ ناگهانی نورون‌ها شود. شایان‌ذکر است که نقش هایپرفسفریله‌شدن پروتئین تاو را در آسیب‌های عصبی نمی‌توان انکار کرد (۹،۸). درمورد آسیب‌های ناشی از فسفریله‌شدن تاو می‌توان به بیماری آلزایمر، پارکینسون و مولتیپل اسکلروزیس (ام‌اس) اشاره نمود (۱۰). درخصوص علت رابطهٔ بین فسفوریلاسیون پروتئین تاو و اختلال در عملکرد عصبی اطلاعات دقیقی وجود ندارد، اما دو فرضیهٔ مهم در این مورد مطرح می‌باشد. فرضیهٔ اول بیان می‌کند که ازدست‌دادن عملکرد ممکن است به-

- 
1. Neurodegenerative Disorder
  2. Beta Amyloid Peptide
  3. Hyper Phosphorylation of the Tau Protein
  4. Neurofibrillary Tangles
  5. Tauopathies

علت کاهش اتصال پروتئین فسفوریله‌ت‌او به میکروتوبول ایجاد شود و در نتیجه، باعث ایجاد بی‌ثباتی در میکروتوبول و اختلال در نقل‌وانتقال آکسون گردد. فرضیه دوم نیز بیان می‌کند که افزایش پروتئین فسفوریله‌ت‌او منجر به تجمع اثرات سمی در سلول‌های عصبی می‌شود. مطالعات اخیر در مدل‌های موش‌های تراریخته نشان می‌دهد که افزایش پروتئین فسفوریله‌ت‌او باعث کاهش سلول‌های عصبی و اختلال در حافظه می‌شود و سرکوب بیان آن نیز منجر به بهبود در حافظه و افزایش تعداد اتصالات سیناپسی می‌گردد (۴).

علاوه‌براین، هوموسیستئین<sup>۱</sup> یک ماده متابولیکی میانجی مهم در سوخت‌وساز اسیدآمینه‌های حاوی گوگرد است و یک عامل خطر مستقل برای بیماری‌های عروق مغزی محسوب می‌شود. همچنین، اسیدآمینه‌های تحریکی است که به‌صورت قابل‌توجهی آسیب اکسیداتیو سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهد. سطح بالای هوموسیستئین باعث مرگ سلول‌های عصبی در نواحی مختلفی از جمله ناحیه هیپوکامپ (به‌عنوان مرکز حافظه و یادگیری)، قشر مغز و سلول‌های گرانول مخچه می‌شود. سطح پلاسمايي بیشتر از ۱۴ میکرومولار، به‌عنوان هاپرهوموسیستئینمیا<sup>۲</sup> می‌باشد که به‌عنوان یک عامل خطر مستقل برای چندین بیماری تخریب‌کننده عصبی مانند بیماری آلزایمر، سکتة مغزی و زوال عقل شناخته می‌شود. به‌تازگی پیشنهاد شده است که تزریق هوموسیستئین به درون بطن مغز، به آسیب حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت منجر می‌شود. یکی از دلایلی که هوموسیستئین باعث ایجاد سمیت می‌شود این است که از طریق شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن فعال سبب ایجاد استرس اکسیداتیو درون سلولی می‌شود که در نهایت، منجر به التهاب و مرگ سلول‌های عصبی می‌شود (۹). علاوه‌براین، نقش عوامل ژنتیکی در بروز بیماری آلزایمر کمتر از یک درصد می‌باشد و نشان‌دهنده این است که در اکثر موارد، عوامل محیطی نقش مهمی در بروز بیماری آلزایمر بازی می‌کند (۱۱). با توجه به شیوع این اختلالات، علاقه علمی و بالینی زیادی به‌وجود آمده است تا روش‌های جدیدی توسعه یابند که بتوانند از شروع زود هنگام این بیماری جلوگیری نمایند و یا باعث کاهش پیشرفت بیماری شوند. با این حال، شواهد نشان می‌دهد که داشتن یک رژیم غذایی و شیوة زندگی سالم می‌تواند به پیش‌گیری از زوال عقل زودرس کمک نماید. همچنین، مصرف اسیدهای چرب اشباع‌نشده به‌ویژه اسید چرب امگا سه (۲)، ورزش منظم، اجتناب از مصرف غذاهای چرب، نکشیدن سیگار، نخوردن الکل و حفظ فعالیت‌های ذهنی و اجتماعی تا دوران پیری می‌تواند در کاهش خطر ابتلا به بیماری آلزایمر و زوال عقل کمک نماید (۱۲). مطالعات همه‌گیرشناسی نشان می‌دهد که افزایش مصرف اسیدهای چرب اشباع‌نشده امگا سه حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)<sup>۳</sup>، با کاهش خطر

- 
1. Homocysteine
  2. Hyperhomocysteinemia
  3. Docosahexaenoic acid

بیماری آلزایمر همراه می‌باشد. دوکوزاهگزانوئیک اسید، فراوان‌ترین اسید چرب امگا سه در مغز می‌باشد. یافته‌های حاصل از مطالعات حیوانی از این فرضیه حمایت می‌کند که شاید DHA به واسطه دارابودن خواص آنتی‌اکسیدانی و مکانیزم‌های حفاظتی عصبی و اثرات ضدآمیلوئیدی، یک روش درمانی برای بیماری آلزایمر باشد (۲). در این راستا، ما<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که پیروی از یک رژیم غذایی همراه با امگا سه به مدت چهار ماه باعث کاهش معنادار متغیرهای مرتبط با بیماری آلزایمر و بهبود عملکرد شناختی در موش‌های تراریخته آلزایمری می‌شود (۱۳). آرنش<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان کردند که یک رژیم غذایی سرشار از اسیدهای چرب امگا سه، تأثیری بر متغیرهای خونی مرتبط با آلزایمر و عملکرد شناختی در موش‌های تراریخته آلزایمری ندارد (۱۴). علاوه بر این، نتایج مشابهی توسط دوور<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۹) و فروند<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۰۹) در افراد مسن در معرض بیماری آلزایمر مشاهده شده است (۱۵،۱۶).

در برخی از پژوهش‌ها نشان داده شده است که ورزش استقامتی طولانی مدت می‌تواند سطح پروتئین هایپرفسفریله تاوی را به صورت محسوسی کاهش دهد و به موازات آن، سطح پروتئین دفسفریله تاوی را افزایش دهد (۱۷). در همین رابطه، لیم<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۰۹) عنوان کردند که سه ماه تمرین استقامتی باعث کاهش پروتئین فسفریله تاو در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری می‌شود. آن‌ها نتیجه گرفتند که ورزش استقامتی طولانی مدت ممکن است یک پتانسیل درمانی برای کاهش آسیب‌شناسی پروتئین تاو را ارائه نماید (۱۷). بلاری<sup>۶</sup> و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تأثیر نه ماه تمرین ارادی در موش‌های آلزایمری شده پرداختند و نشان دادند که نه ماه تمرین ارادی باعث کاهش پروتئین فسفریله تاو در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری می‌شود (۱۸). همچنین، این احتمال وجود دارد که ورزش طولانی مدت، تشکیل تجمعات نوروفیبریلی را سرکوب نماید. کاهش در پروتئین هایپرفسفریله تاوی می‌تواند به دلیل مهار یا فعال‌سازی تاوکینازها باشد (۱۷)، اما لیانگ<sup>۷</sup> و همکاران (۲۰۱۰) نشانگرهای زیستی مرتبط با آلزایمر را در مایع مغزی - نخاعی افراد سالمند فعال و غیرفعال مقایسه نمودند و اختلاف معناداری را در میزان پروتئین تاو و هایپرفسفریله تاو بین دو گروه مشاهده نکردند (۱۹).

- 
1. Ma
  2. Arendash
  3. Devore
  4. Freund
  5. Leem
  6. Belarbi
  7. Liang

با توجه به اطلاعات موجود، یافته‌های پژوهشی در زمینه تأثیر مستقل تمرین ورزشی و مصرف امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله تاو، از توافق جمعی برخوردار نمی‌باشد. از سوی دیگر، پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه تأثیر هم‌زمان انجام تمرین ورزشی و مصرف امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله تاو محدود است؛ لذا، در پژوهش حاضر به دنبال پاسخ‌گویی به این سؤال هستیم که در صورت بروز بیماری آلزایمر، آیا انجام تمرین هوازی و مصرف مکمل امگا سه به صورت مستقل می‌تواند باعث کاهش سطح پروتئین فسفریله تاو شود؟ و نیز این که در صورت تأثیر مثبت احتمالی تمرین هوازی و مصرف مکمل امگا سه به تنهایی، آیا اعمال هم‌زمان این دو متغیر نیز می‌تواند منجر به بروز اثرات تجمعی در کاهش سطح پروتئین فسفریله تاو شود؟

### روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع مطالعات تجربی است و به منظور انجام آن از ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرم و سن هشت هفته استفاده شد که از انیستیتو پاستور شمال ایران (آمل) خریداری شدند و به آزمایشگاه جوندگان دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران منتقل گشتند. موش‌ها در محیطی با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای  $50 \pm 5$  درصد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در قفس‌های پلی‌کربنات (پنج موش در هر قفس) نگهداری شدند. پس از رسیدن موش‌ها به دامنه وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم، کانول‌گذاری و القای هوموسیستئین در گروه‌های آلزایمری و شم انجام شد. شایان‌ذکر است که در تمامی مراحل پژوهش، حیوانات دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. همچنین، لازم‌به‌ذکر است که تمامی مراحل اجرایی پژوهش شامل: کانول‌گذاری، القای آلزایمر، اجرای پروتکل تمرین، کشتار و بافت‌برداری، براساس آیین‌نامه کمیته اخلاق در پژوهش زیستی دانشگاه مازندران انجام گرفت. ذکر این نکته ضروری است که تعداد موش‌ها در تمام گروه‌ها مساوی در نظر گرفته شد (۱۰ سر در هر گروه)، اما پس از جراحی و مراحل تمرین، در مجموع، ۱۲ سر موش به علت مرگ و یا ناتوانی در انجام تمرین مربوطه از گروه‌ها حذف شدند؛ بنابراین، تعداد نمونه‌های هر گروه تا پایان مطالعه به شرح ذیل بود: آلزایمری + امگا سه (هشت سر)، آلزایمری + تمرین (نه سر)، آلزایمری + تمرین + امگا سه (هشت سر)، کنترل سالم (نه سر)، شم (شش سر) و کنترل آلزایمری (هشت سر).

آماده‌سازی و تزریق درون‌بطنی<sup>۱</sup> هوموسیستئین: هوموسیستئین مورد استفاده از شرکت سیگما<sup>۲</sup> - ساخت کشور آمریکا، تهیه‌شده از شرکت پادگین طب تهران) خریداری شد و برای تزریق آن، ابتدا

1. Intracerebroventricular (ICV) Injection
2. Sigma

پودر هوموسیستئین در بافر فسفات سالین<sup>۱</sup> (PBS) ریخته شد و با افزودن اسید هیدروکلریک (یک مولار)، پودر هوموسیستئین درون PBS حل گردید. سپس، pH محلول با افزودن محلول سود NaOH (۰/۱ مولار) روی ۷/۴ تنظیم گشت و محلول هوموسیستئین تازه در غلظت ۰/۶ مولار آماده شد. در مرحله بعدی، در گروه شم، حلال هوموسیستئین (شامل اسید هیدروکلریک، PBS و NaOH می باشد که pH روی ۷/۴ تنظیم شد) و در گروه‌های آلزایمری، محلول هوموسیستئین درون بطن مغز تزریق گردید (۲۰). بدین منظور، موش‌های گروه‌های آلزایمری و شم با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (به ترتیب با دوز ۵۰ و چهار میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس، سر موش درون دستگاه استروتاکس<sup>۲</sup> قرار داده شد و جمجمه موش براساس اطلس پکسینوس و واتسون<sup>۳</sup> جهت گیری گردید. پس از یک برش ساجیتال، درز برگما و لامبدا مشخص گشت و سوراخی با مته براساس مختصات (۰/۸) میلی متر خلفی از برگما<sup>۴</sup>، (۱/۵) میلی متر جانبی از درز ساجیتال<sup>۵</sup> و (۳/۷) میلی متر بطنی<sup>۶</sup> حفر گردید. سپس، کانول‌های بریده شده به طول ۱۰ میلی متر از جنس سر سوزن شماره ۲۲ توسط کانول راهنمای دستگاه استروتاکس، درون بطن مغز قرار داده شد و به کمک سیمان دندان پزشکی به جمجمه متصل گردید. یک هفته پس از کانول گذاری و ترمیم زخم، به وسیله یک سرنگ هامیلتون با قطر کانول ۰/۳ میلی متر، یک میکرولیتر از محلول هوموسیستئین و یا حلال هوموسیستئین با سرعت یک میکرولیتر در هر دو دقیقه به ترتیب به درون بطن مغز موش‌های گروه‌های آلزایمری و شم تزریق گشت و کانول سرنگ هامیلتون به مدت پنج دقیقه در محل نگه داشته شد تا محلول یا حلال هوموسیستئین در بطن مغز با انتشار غیرفعال از نوک کانول انجام شود (۲۰). ذکر این نکته ضروری است که هوموسیستئین جهت تزریق به صورت تازه تهیه گردید؛ زیرا، محلول حاصل به سرعت رسوب می کند.

آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال<sup>۷</sup>: به منظور بررسی تغییرات رفتاری و اطمینان از ایجاد بیماری آلزایمر، از آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال (آزمون شاتل باکس)<sup>۸</sup> استفاده شد. دستگاه شاتل باکس، وسیله‌ای جهت درک و بررسی حافظه و یادگیری برای حیواناتی نظیر موش می باشد که در آن از نور به عنوان محرک شرطی استفاده می شود. این آزمون شامل: مرحله یادگیری و مرحله

1. Phosphate Buffered Saline
2. Stereotax
3. Paxinos & Watson
4. Posterior to Bregma
5. Lateral to the Sagittal Suture
6. Ventrally
7. Passive Avoidance Test
8. Shuttle Box Test

حافظه کوتاه مدت می‌باشد. شایان ذکر است که یک روز پس از مرحله یادگیری، آزمایش به‌خاطر - آوری انجام شد؛ بدین ترتیب که حیوان در محیط روشن دستگاه قرار می‌گرفت و پس از ۳۰ ثانیه، درب گیوتینی باز می‌شد و مدت زمانی که طول می‌کشید تا موش وارد اتاقک تاریک شود، ثبت می‌گردید. ذکر این نکته ضروری است که جهت تأیید آلیزیمری بودن می‌بایست زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری کمتر باشد (۲۰).

تمرین هوازی با شدت پایین: پس از انجام کانول گذاری و القای آلیزیمر و نیز رسیدن موش‌ها به سن ۱۲ هفته، اجرای برنامه تمرین هوازی به مدت هشت هفته (پنج روز در هفته) روی نوار گردان آغاز شد. شایان ذکر است که برنامه تمرین از سه مرحله آشنایی، اضافه بار و تثبیت بار تشکیل شده بود. در مرحله آشنایی (هفته اول)، موش‌ها هر روز به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه روی نوار گردان راه رفتند. در مرحله اضافه بار (هفته دوم و سوم)، موش‌ها ابتدا به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۱۲ متر در دقیقه روی نوار گردان راه رفتند و به تدریج طی دو هفته، به شدت و مدت فعالیت افزوده شد تا به میزان نهایی ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۰ متر در دقیقه برسد. در مرحله حفظ یا تثبیت (هفته چهارم تا هشتم) نیز تمرین با همین شدت ادامه یافت. این شدت فعالیت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی موش می‌باشد (۲۱، ۲۲).

مصرف مکمل امگا سه: گروه‌های دریافت کننده امگا سه در مدت هشت هفته، روزانه ۸۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش، مکمل امگا سه<sup>۱</sup> را به صورت خوراکی و به روش گاوآژ دریافت کردند (۲۳). مکمل امگا سه مورد استفاده شامل: ۱۳۶ میلی گرم بر میلی لیتر DHA و ۱۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر ایکوزاپنتانویک اسید (EPA)<sup>۲</sup> بود (۲۴).

آماده سازی بافت و روش اندازه گیری پروتئین فسفریله تاو: تمامی آزمودنی‌ها ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و دریافت مکمل امگا سه، با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (چهار میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند (۲۰). به منظور جمع آوری نمونه‌های هیپوکامپ، سر آزمودنی‌ها از ناحیه گردن توسط قیچی مخصوص جدا شد. ابتدا، با استفاده از تیغ جراحی، جمجمه شکافته شد و مغز با احتیاط خارج گردید. سپس، مغز سالم توسط تیغ جراحی (دقیقاً) از وسط به دو نیم تقسیم شد و با توجه به مختصات هیپوکامپ و به کمک اطلس پاک سینوس، هیپوکامپ از دستگاه لمبیک جدا گردید. سپس، نمونه‌های هیپوکامپ جمع آوری شده برای اندازه گیری‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۰). همچنین، به منظور اندازه گیری سطح پروتئین فسفریله تاو، ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت هیپوکامپ در

1. Menhaden Fish Oil, Sigma co Germany, Product Number: F8020

2. Eicosapentaenoic Acid

محلول بافر سیترات - سالین سرد قرار داده شد. در ادامه، بافت مذکور توسط میکروهموژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه هموژن گردید. سپس، بافت هموژن شده، سانتریفوژ گشت و مایع رویی به داخل اپندورف منتقل شد. از این محلول برای اندازه‌گیری پروتئین فسفریل<sup>۱</sup> تاو در بافت هیپوکامپ استفاده گردید. سطح پروتئین فسفریل<sup>۱</sup> تاو هیپوکامپ به روش الیزا با استفاده از کیت پژوهشی مخصوص موش‌های صحرایی (ساخت شرکت کازابو<sup>۱</sup> چین، تهیه شده از شرکت پادگین طب تهران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که حساسیت کیت اندازه‌گیری، ۰/۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات آن نیز ۶/۸ درصد بود.

علاوه بر این، به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس نسخه ۲۱۹ استفاده شد. آزمون شاپیرو ویلک نیز جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها به کار رفت. آزمون لون نیز برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به طبیعی بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (آنووا)<sup>۳</sup> و آزمون تعقیبی توکی انجام شد. سطح معناداری نیز ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

## نتایج

مقادیر میانگین و انحراف معیار مربوط به وزن و داده‌های حاصل از آزمون شاتل باکس (زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک) در جدول شماره یک نشان داده شده است.

---

1. Cusabio
2. SPSS 19
3. ANOVA

جدول ۱- مقادیر وزن موش‌ها قبل و بعد از هشت هفته مداخله و داده‌های حاصل از آزمون شاتل باکس

شاخص گروه	وزن (گرم)		زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک (ثانیه) پیش آزمون
	پیش آزمون	پس آزمون	
آلزامر + امگا سه (تعداد=۸)	۲۲۷/۱۱±۲۵/۹۷	۳۰۳/۲۹±۱۳/۵۱	۲۳/۱۸±۷۵/۲۰*
آلزامر + تمرین (تعداد=۹)	۲۲۱/۱۱±۳۳/۷۰	۳۲۷/۴۴±۳۳/۹۰	۲۳/۱۵±۴۴/۹۶#*
آلزامر + تمرین + امگا سه (تعداد=۸)	۲۲۷/۱۱±۶۳/۹۰	۳۰۷/۳۱±۳۸/۷۰	۲۵/۲۵±۵۰/۵۲#*
کنترل سالم (تعداد=۹)	۲۱۷/۱۳±۲۲/۹۰	۳۲۵/۳۸±۱۱/۹۰	۱۸۳/۸۲±۷۸/۲۹
شم (تعداد=۶)	۱۰±۲۲۰/۹۰	۳۱۴/۳۲±۱۷	۱۶۵/۴۵±۵۰/۱۰
کنترل آلزامر (تعداد=۸)	۲۲۰/۹±۶۳/۹۰	۳۰۱/۲۴±۲۵/۹۰	۲۵/۲۱±۵۰/۷۸#*

(میانگین±انحراف معیار)

\* وجود تفاوت معنادار با گروه کنترل آلزامری ( $P<0.05$ )# وجود تفاوت معنادار با گروه شم ( $P<0.05$ )

براساس نتایج، بین زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک بین گروه‌های پژوهش تفاوت معناداری مشاهده می‌شود ( $P=0.001$ ). یافته‌های حاصل از آزمون تعقیبی درمورد مقایسه جفتی زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک در گروه‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که این شاخص در ابتدای مطالعه در گروه‌های آلزامری + امگا سه، آلزامری + تمرین، آلزامری + تمرین + امگا سه و کنترل آلزامری درمقایسه با گروه کنترل سالم (مقادیر  $P$  به ترتیب  $0.001$ ،  $0.001$ ،  $0.001$  و  $0.001$ ) و گروه شم (مقادیر  $P$  به ترتیب  $0.001$ ،  $0.001$ ،  $0.001$  و  $0.001$ ) به‌طور معناداری کمتر می‌باشد. شایان‌ذکر است که بین گروه‌های کنترل سالم و شم، تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود ( $P=0.96$ ). مقایسه میانگین و انحراف معیار و نیز یافته‌های آزمون آماری درخصوص اثر تمرین هوازی و مصرف امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله‌تو در جدول شماره دو ارائه شده است. براساس یافته‌ها مشخص می‌شود که بین میانگین سطح پروتئین فسفریله‌تو در گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد ( $P=0.005$ ).

جدول ۲- مقادیر پروتئین فسفریله‌ت‌او (میانگین±انحراف معیار) پس از هشت هفته مداخله

مقدار P	مقدار F	شاخص گروه	پروتئین فسفریله‌ت‌او (پیکوگرم بر میلی‌گرم بافت)
*۰/۰۰۵	۳/۹۹	آلزایمر + امگا سه	۱۱۳/۶۲±۳۸/۵۹
		آلزایمر + تمرین	۱۲۸/۵۶±۵۶/۵۳
		آلزایمر + تمرین + امگا سه	۱۶۴/۴۸±۳۸/۸۲
		کنترل سالم	۱۰۰/۵۸±۷۸/۱۸
		شم	۱۵۸/۱۰۰±۸۳/۰۵
		کنترل آلزایمر	۲۳۴/۸۸±۵۰/۰۹

\* وجود تفاوت معنادار بین گروه‌های مورد مطالعه ( $P < 0.05$ )

براساس اطلاعات جدول شماره سه، سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او هیپوکامپ در گروه کنترل آلزایمری نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری بالاتر می‌باشد ( $P=0.003$ ). از سوی دیگر، سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او در گروه‌های آلزایمر + تمرین و آلزایمر + امگا سه نسبت به گروه کنترل آلزایمری به شکل معناداری پایین‌تر است (مقادیر P به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۱). همچنین، بین سطح پروتئین فسفریله‌ت‌او در هیپوکامپ موش‌های گروه آلزایمر + تمرین + امگا سه نسبت به گروه کنترل آلزایمر، گروه آلزایمر + تمرین و گروه آلزایمر + امگا سه تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود (مقادیر P به ترتیب ۰/۳۴، ۰/۸۹ و ۰/۶۸).

جدول ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی

مقدار P	گروه‌ها
۰/۹۹	آلزایمر + تمرین هوازی
۰/۶۸	آلزایمر + تمرین هوازی + امگا سه
۰/۹۹	کنترل سالم
۰/۸۲	کنترل شم
*۰/۰۱	کنترل آلزایمر
۰/۸۹	آلزایمر + تمرین هوازی + امگا سه
۰/۹۵	کنترل سالم
۰/۹۶	شم
*۰/۰۳	کنترل آلزایمر

ادامه جدول ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی

مقدار P	گروه‌ها
۰/۴۲	کنترل سالم
۰/۹۹	شم
۰/۳۴	کنترل آلزایمر
۰/۶۰	شم
*۰/۰۰۳	کنترل آلزایمر

\* وجود تفاوت معنادار بین دو گروه مورد مطالعه ( $P < 0.05$ )

### بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج آزمون شاتل باکس مشخص شد که تزریق محلول ۰/۶ مولار هوموسیستئین به درون بطن مغز موش‌ها در گروه‌های مداخله در ابتدای پژوهش، به آلزایمری شدن موش‌ها منجر گردید. از سوی دیگر، سطح پروتئین فسفریلهٔ تاو هیپوکامپ در گروه کنترل آلزایمری نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری بالاتر بود. شایان ذکر است که افزایش هوموسیستئین باعث هایپرفسفریلاسیون پروتئین تاو می‌شود که خود منجر به تخریب سلول‌های عصبی در بافت مغز می‌شود (۲۵). هایپرهوموسیستئین نیز با نشانه‌های زوال عقل مانند فسفوریللاسیون پروتئین تاو، افزایش تجمع آمیلوئید بتا، تشکیل کلافه‌های تارهای عصبی، التهاب و انحطاط سلول‌های عصبی همراه است (۹). در همین رابطه، زانگ<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که هوموسیستئین باعث تحریک فسفریلاسیون پروتئین تاو از طریق غیرفعال‌سازی پروتئین فسفاتاز A2 در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود (۲۶). هوموسیستئین اسیدآمینۀ غیرضروری، حاوی گوگرد تولیدشده در چرخهٔ متیونین است. هنگامی که سطح متیونین کم است، هوموسیستئین به متیونین تبدیل می‌شود. سپس متیونین توسط ATP به شکل فعال s-آدنوزیل متیونین<sup>۲</sup> (SAM) تبدیل می‌شود. پس از دمتیلاسیون، SAM به s-آدنوزیل هوموسیستئین<sup>۳</sup> (SAH) و در نهایت، به هوموسیستئین هیدرولیز می‌گردد (۲۷). همچنین، هنگامی که سطح متیونین زیاد شود، هوموسیستئین به سیستاتیونین<sup>۴</sup> تبدیل می‌شود و متعاقب آن در یک واکنش برگشت‌ناپذیر به سیستئین تبدیل می‌شود؛ بنابراین، افزایش سطح هوموسیستئین با پتانسیل متیلاسیون کم همراه است که به وسیلهٔ رژیم غذایی حاوی

1. Zhang
2. S-adenosyl Methionine
3. S-adenosyl Homocysteine
4. Cystathionine

اسیدفولیک و ویتامین ب - کمپلکس (۲۷)، امگا سه (۴) و فعالیت بدنی (۲۸) می‌تواند پلاک تشکیل‌شده توسط پپتید آمیلوئید بتا و کلافه‌های تارهای عصبی و نیز فرم هایپر فسفریل‌ پروتئین تاو را کاهش دهد (۲۷).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطح پروتئین فسفریل‌ تاو در هیپوکامپ موش‌های گروه تمرین نسبت به گروه کنترل آلزایمری به شکل معناداری پایین‌تر بود. در گروه تمرین آلزایمری همرا با مصرف امگا سه نیز تغییر معناداری در پروتئین فسفریل‌ تاو نسبت به گروه کنترل آلزایمری مشاهده نشد. همچنین، سطح پروتئین فسفریل‌ تاو در گروه کنترل آلزایمری مصرف‌کننده امگا سه در مقایسه با گروه کنترل آلزایمری متعاقب هشت هفته مصرف امگا سه به طور معناداری پایین‌تر بود. در تأیید این یافته‌ها، لکی<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۴) اثرات فعالیت بدنی و مصرف امگا سه را بر عملکرد شناختی در افراد بزرگسال مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که فعالیت بدنی همراه با مصرف امگا سه، تأثیر افزایشی یا فزاینده‌ای بر عملکرد مغزی ندارد و مصرف امگا سه، اثرات فعالیت بدنی بر عملکرد مغزی را تعدیل می‌کند. علاوه بر این، حجم بالای فعالیت بدنی و مصرف مقادیر زیاد اسیدهای چرب امگا سه، هر دو به صورت مستقل باعث بهبود عملکرد شناختی خواهند شد. با توجه به این که اثرات زیستی اسیدهای چرب امگا سه و فعالیت بدنی با هم تداخل دارند، مصرف اسیدهای چرب ممکن است اثرات فعالیت بدنی بر عملکرد عصبی را تغییر دهد (۲۹). در این راستا، بیود<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۱۱) اثر طولانی مدت تمرین هوازی را بر برخی از متغیرهای محافظتی عصبی در هیپوکامپ و قشر مغز موش‌های سالم بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها بیانگر این بود که ۳۶ هفته تمرین هوازی (پنج روز در هفته به مدت ۳۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه) باعث کاهش معنادار پروتئین فسفریل‌ تاو در هیپوکامپ موش‌های سالم می‌شود (۲۸). یوم<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۱) نیز به بررسی تأثیر سه ماه تمرین هوازی (با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، به مدت ۶۰ دقیقه و پنج روز در هفته) بر موش‌های تراریخته آلزایمری پرداختند و گزارش کردند که تمرین هوازی با شدت پایین باعث کاهش پروتئین فسفریل‌ تاو می‌شود (۳۰). علاوه بر این، اوها و کو<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۴) - تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی (با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه، پنج جلسه در هفته و ۴۰ دقیقه در هر جلسه) را بر آسیب‌شناسی تاو در موش‌های تراریخته آلزایمری بررسی کردند. براساس یافته‌های آن‌ها مشخص شد که تمرین هوازی باعث بهبود حرکت عمومی و فعالیت‌های اکتشافی و نیز کاهش معنادار پروتئین فسفریل‌ تاو در نخاع و هیپوکامپ می‌شود (۳۱). مطالعات در ارتباط با تمام افراد،

- 
1. Leckie
  2. Bayod
  3. Um
  4. Ohia-Nwoko

به‌ویژه افراد سال خورده به‌وضوح نشان داده است که انجام ورزش منظم باعث بهبود حافظه، یادگیری و عملکرد اجرایی و نیز مقابله با آتروفی مغز مرتبط با بیماری‌های وابسته به سن می‌شود که این امر برای فرایندهای شناختی بسیار مهم می‌باشد (۲۸).

علاوه‌براین، به احتمال زیاد، اسیدهای چرب امگا سه وظایف مشابهی در مغز و دیگر بافت‌ها دارند (تولید ایکوزانوئید ضدالتهابی) که باعث حفظ یا افزایش عملکرد مغز می‌شود. دوکوزاهگزانوئیک اسید، سیالیت غشا و فرایندهای غشایی را در غشای سلول‌های مغز بهبود می‌بخشد که ممکن است از طریق توانایی اتصال به لیگاندها و شروع یک سری از فرایندهای انتقال پیام به عملکرد مغز کمک نماید (۳۲). از آن‌جاکه اسیدهای چرب امگا سه دارای خواص ضدالتهابی می‌باشد و شاخص‌های التهابی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر افزایش می‌یابد؛ بنابراین، منطقی به نظر می‌رسد که اسیدهای چرب امگا سه بتواند بروز بیماری آلزایمر را با کاهش عوامل التهابی و نیز افزایش عوامل غیرالتهابی و نوروتروفین به تأخیر بیندازد (۳۲). در این راستا، فروند و همکاران (۲۰۱۳) اثر شش ماه مصرف اسید چرب امگا سه غنی از DHA را بر انتقال اسیدهای چرب امگا سه و نشانگرهای آلزایمر در پلاسما و مایع نخاعی - مغزی بیماران مبتلا به آلزایمر مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که مصرف امگا سه به مدت شش ماه باعث تغییر قابل توجهی در DHA پلاسما و مایع نخاعی - مغزی شده است؛ در حالی که در گروه دارونما هیچ تغییری مشاهده نشد. همچنین، شاخص‌های مرتبط با بیماری آلزایمر (سطح پروتئین تاو تام، پروتئین فسفریله تاو و آمیلوئید بتا-۴۲) در مایع نخاعی - مغزی کاهش غیرمعناداری داشت و رابطه معکوسی بین تغییرات سطح DHA در مایع نخاعی - مغزی با پروتئین تاو تام و پروتئین فسفریله تاو مشاهده شد (۳۳). گرین<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه روی موش‌های آلزایمری تراریخته نشان دادند که ۱۲ ماه مصرف DHA باعث کاهش فسفوریلاسیون پروتئین تاو می‌شود (۳). نتایج مشابهی نیز در پژوهش ما و همکاران (۲۰۰۹) پس از تجویز روغن ماهی به موش‌های تراریخته آلزایمری مشاهده شد (۱۳). در هر دو پژوهش، کاهش فسفوریلاسیون پروتئین تاو به مهار c-جون n-ترمینال کیناز<sup>۲</sup> (JNK) نسبت داده شد. c-جون n-ترمینال کیناز یک عضو از خانواده پروتئین کیناز فعال شده با میتوز<sup>۳</sup> (MAPK) می‌باشد که تنظیم‌کننده طیف وسیعی از فرایندهای زیستی دخیل در ایجاد تومور و اختلالات عصبی است (۳۴). همچنین، یافته‌های آن‌ها نشان داد که مصرف مقادیر کم امگا سه و کاهش نسبت امگا سه به امگا ۶ در رژیم غذایی منجر به تشدید آسیب پروتئین تاو در موش‌های تراریخته می‌شود (۳، ۱۳).

- 
1. Green
  2. C-Jun N-Terminal Kinase
  3. Mitogen Activated Protein Kinase

علاوه بر این، هوجمنس<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی مروری، اثر طولانی مدت مصرف مکمل امگا سه را روی آسیب شناسی بیماری آلزایمر در مدل های حیوانی آلزایمری مورد بررسی قرار دادند. یافته های حاصل حاکی از آن است که مصرف طولانی مدت امگا سه باعث کاهش میزان ازدست رفتن نورون ها و بهبود متغیرهای مرتبط با بیماری آلزایمر در مدل های حیوانی می شود (۳۵). نتایج یک مطالعه متاآنالیز نیز نشان داد که افزایش مصرف ۱۰۰ گرم ماهی در هفته با کاهش ۱۱ درصدی بیماری آلزایمر همراه می باشد (۳۶).

در مجموع، پژوهش حاضر دارای محدودیت هایی مانند تعداد کم حجم نمونه، عدم امکان بررسی تأثیر مقادیر متفاوت مکمل امگا سه و شدت های متفاوت تمرین بود. هرچند، بسیاری از پژوهشگران استفاده از داروهای مختلف برای درمان آلزایمر را پیشنهاد داده اند، اما عموماً هرکدام دارای اثرات جانبی نیز می باشند؛ بنابراین به نظر می رسد تغییر در شیوه زندگی مانند داشتن یک رژیم غذایی مناسب و انجام فعالیت های ورزشی می تواند به عنوان روش های مکمل در کنار درمان های دارویی در نمونه های حیوانی مورد مطالعه قرار گیرد تا در صورت کسب نتایج مثبت و تکرار و تأیید یافته ها در مطالعات کارآزمایی بالینی بتواند مورد استفاده بیماران قرار گیرد.

**پیام مقاله:** با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می رسد تمرین ورزشی و مصرف امگا سه هرکدام به صورت مستقل می تواند از طریق کاهش سطح پروتئین فسفریلئو تاو در هیپوکامپ موش های آلزایمری، باعث کاهش میزان ازدست رفتن نورون ها و بهبود متغیرهای مرتبط با بیماری آلزایمر گردد. همچنین، براساس نتایج پژوهش حاضر و با توجه به این که انجام تمرین ورزشی همزمان با مصرف امگا سه، تغییر معناداری در سطح پروتئین فسفریلئو تاو در هیپوکامپ آزمودنی های آلزایمری ایجاد نکرد؛ لذا، ایجاد تداخل در اثرات زیستی اسیدهای چرب امگا سه و فعالیت بدنی دور از انتظار نمی باشد. البته، به دلیل کمبود مطالعات در این زمینه، بررسی و مطالعات بیشتر کاملاً ضروری است.

## منابع

1. Lin T W, Shih Y H, Chen S J, Lien C H, Chang C Y, Huang T Y, et al. Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2015; 118: 189-97.
2. Hong-Qi Y, Zhi-Kun S, Sheng-Di C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: Focused on considerations targeting A and tau. *Transl Neurodegener.* 2012; 1(1): 1-12.
3. Green K N, Martinez-Coria H, Khashwji H, Hall E B, Yurko-Mauro K A, Ellis L, et al. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid- and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci.* 2007; 27(16): 4385-95.
4. Tepper K, Biernat J, Kumar S, Wegmann S, Timm T, Hübschmann S, et al. Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(49): 34389-407.
5. Li H L, Wang H H, Liu S J, Deng Y Q, Zhang Y J, Tian Q, et al. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing  $\beta$ -catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(9): 3591-6.
6. 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 Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:352723.
7. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow E, Mandelkow E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell.* 1995; 6(12): 1887-902.
8. Wang J Z, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol.* 2008; 85(2): 148-75.
9. Kamat P, Vacek J, Kalani A, Tyagi N. Homocysteine induced cerebrovascular dysfunction: A link to alzheimer's disease etiology. *Open Neurol J.* 2015; 9: 9-14.
10. Liu S J W J. Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23: 183-7.
11. Nation D A, Hong S, Jak A J, Delano-Wood L, Mills P J, Bondi M W, et al. Stress, exercise, and Alzheimer's disease: A neurovascular pathway. *Med Hypotheses.* 2011; 76(6): 847-54.
12. Abubakari A R, Naderali M M, Naderali E K. Omega-3 fatty acid supplementation and cognitive function: Are smaller dosages more beneficial? *Int J Gen Med.* 2014; 7: 463-73. (In Persian).
13. Ma Q L, Yang F, Rosario E R, Ubuda O J, Beech W, Gant D J, et al.  $\beta$ -amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: Suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci.* 2009; 29(28): 9078-89.
14. Arendash G, Jensen M, Salem N, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, et al. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience.* 2007; 149(2): 286-302.

15. Devore E E, Grodstein F, van Rooij F J, Hofman A, Rosner B, Stampfer M J, et al. Dietary intake of fish and omega-3 fatty acids in relation to long-term dementia risk. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(1): 170-6.
16. Freund-Levi Y, Hjorth E, Lindberg C, Cederholm T, Faxen-Irving G, Vedin I, et al. Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory markers in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease: The omegAD study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009; 27(5): 481-90.
17. Leem Y H, Lim H J, Shim S B, Cho J Y, Kim B S, Han P L. Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies. *J Neurosci Res.* 2009; 87(11): 2561-70.
18. Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez F J, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, et al. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis.* 2011; 43(2): 486-94.
19. Liang K Y, Mintun M A, Fagan A M, Goate A M, Bugg J M, Holtzman D M, et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann Neurol.* 2010; 68(3): 311-18.
20. Hosseinzadeh S, Roshan V D, Poursaghar 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(1): 37-44. (In Persian).
21. Garekani E T, Mohebbi H, Kraemer R R, Fathi R. Exercise training intensity/volume affects plasma and tissue adiponectin concentrations in the male rat. *Peptides.* 2011; 32(5): 1008-12. (In Persian).
22. Fathei M. The effect of eight weeks aerobic exercise on thyroid hormones in female rats with polycystic ovary syndrome. *Intl j Sport Std.* 2014; 4(3): 355-60
23. Gama C S, Canevar L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, et al. Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: A study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012; 141(2): 162-7.
24. Ma H, Wang J, Wang J, Li Y, Li J. Fish oil ameliorates the allograft arteriosclerosis of intestine on rats. *Pediatr Transplant.* 2007; 11(2): 173-9.
25. Ramesh B N, Rao T S, Prakasam A, Sambamurti K, Rao K J. Neuronutrition and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19(4): 1123-39.
26. Zhang C E, Tian Q, Wei W, Peng J H, Liu G P, Zhou X W, et al. Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2008; 29(11): 1654-65.
27. Zhuo J M, Wang H, Praticò D. Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(9): 562-71.
28. Bayod S, Del Valle J, Canudas A M, Lalanza J F, Sanchez-Roigé S, Camins A, et al. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol.* 2011; 111(5): 1380-90.
29. Leckie R L, Manuck S B, Bhattacharjee N, Muldoon M F, Flory J M, Erickson K I. Omega-3 fatty acids moderate effects of physical activity on cognitive function. *Neuropsychologia.* 2014; 59: 103-11.

30. Um H S, Kang E B, Koo J H, Kim H T, Kim E J, Yang C H, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 2011; 69(2): 161-73.
31. Ohia-Nwoko O, Montazari S, Lau Y S, Eriksen J L. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice. *Mol Neurodegener.* 2014; 9(1): 1-17.
32. Su H M. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem.* 2010; 21(5): 364-73.
33. Freund L Y, Vedin I, Cederholm T, Basun H, Faxén I G, Eriksdotter M, et al. Transfer of omega-3 fatty acids across the blood-brain barrier after dietary supplementation with a docosahexaenoic acid-rich omega-3 fatty acid preparation in patients with Alzheimer's disease: The omegAD study. *J Intern Med.* 2013; 275: 428-36.
34. Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40(1): 85-9.
35. Hooijmans C R, Pasker-de Jong P C, de Vries R B, Ritskes-Hoitinga M. The effects of long-term omega-3 fatty acid supplementation on cognition and Alzheimer's pathology in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis.* 2012; 28(1): 191-209.
36. Wu S, Ding Y, Wu F, Li R, Hou J, Mao P. Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 48: 1-9.

### شیوه استناد دهی

قراری عارفی رضا ، ثاقب جو مرضیه ، هدایتی مهدی ، فتحی رزیتا. نقش تمرین هوازی و دریافت مکمل امگا سه بر سطح پروتئین فسفریله‌ت‌اؤ در هیپوکامپ موش های آلزایمری شده با هوموسیستئین. فیزیولوژی ورزشی. پاییز ۱۳۹۵؛ ۸(۳۱): ۸۸-۱۷۱.

Gharari Arefi. R, Saghebjo. M, Hedayati. M, Fathi R. The Role of Aerobic Training and Omega-3 Supplement Intake on Phosphorylated Tau Protein in the Hippocampus of Alzheimer Induced Rats with Homocysteine. *Sport Physiology.* Fall 2016; 8 (31): 171-88. (Persian)

## The Role of Aerobic Training and Omega-3 Supplement Intake on Phosphorylated Tau Protein in the Hippocampus of Alzheimer Induced Rats with Homocysteine

R. Gharari Arefi<sup>1</sup>, M. Saghebjo<sup>2</sup>, M. Hedayati<sup>3</sup>, R. Fathi<sup>4</sup>

1. Ph.D Student at University of Birjand
2. Associate Professor at University of Birjand\*
3. Associate Professor at Shahid Beheshti University of Medical Sciences
4. Associate Professor at University of Mazandaran

Received Date: 2014/09/08

Accepted Date: 2014/12/13

### Abstract

The aim of this study was to assess the impact of eight weeks aerobic training and omega-3 supplement intake on phosphorylated Tau protein in the hippocampus of Alzheimer induced rats with homocysteine. For this purpose, 60 Wistar male rats (twelve-weeks-old and weight  $222.31 \pm 11.91$  g), divided into six groups, including: Alzheimer's rat + Omega-3, Alzheimer's rat + training, Alzheimer's rat + training + Omega-3, healthy control rat, control sham and Alzheimer's control rat. Alzheimer's disease induced by injection of homocysteine (60mM) into the rat brain ventricle. Training with a speed of 20 m/min (60 minutes at each session and five days a week on the treadmill) was applied. The supplement group, was received Omega-3 supplement 800mg/kg of body weight, daily for eight weeks. Level of phosphorylated tau protein measured using ELISA method. In data analysis, a one-way analysis of variance and Tukey test as a post hoc, were used ( $P < 0.05$ ). The obtained results showed that the level of phosphorylated Tau protein in hippocampus of Alzheimer's rat + training, Alzheimer's + Omega-3 and healthy control, were lower than the Alzheimer's control group (P value 0.03, 0.01 and 0.003 respectively). In addition, there was no significant difference level of phosphorylated tau protein in hippocampus of Alzheimer's + training + Omega-3 and the control group ( $P = 0.34$ ). It seems that aerobic training and omega-3 supplement, both can be reduced independently phosphorylated tau protein in the hippocampus of Alzheimer's rats and simultaneous use of the two methods, ameliorates the effect each of these interventions.

**Keywords:** Aerobic Training, Omega 3 Fatty Acids, Alzheimer, Tau protein, Homocysteine

\*Corresponding Author

Email: m\_saghebjo@birjand.ac.ir