

## Comparison of the effect of voluntary exercise in enriched environment and forced exercise on Wnt-5a expression and Amyloid Beta accumulation in hippocampus of rats with type 3 diabetes

Sanaz Zanjanian<sup>1</sup>, Mohammad Reza Kordi<sup>2\*</sup>, Ali Asghar Ravasi<sup>2</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Alborz Campus, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, University of Tehran, Tehran, Iran

\* Corresponding author e-mail: [mrkordi@ut.ac.ir](mailto:mrkordi@ut.ac.ir)

Citation: Zanjanian S, Kordi MR, Ravasi AA. Comparison of the effect of voluntary exercise in enriched environment and forced exercise on Wnt-5a expression and Amyloid Beta accumulation in hippocampus of rats with type 3 diabetes. *Daneshvar Medicine* 2022; 30(5):62-78. doi: 10.22070/DANESHMED.2022.16470.1233

### Abstract

**Background and Objective:** Type 3 diabetes or brain diabetes is a term for Alzheimer, which insulin resistance selectively affects brain and causes cognitive loss. Wnt signaling pathways play role in nervous system, reducing symptoms of Alzheimer's disease, insulin synthesis and diabetes. Although positive effect of physical activities in diseases has been reported, the comparison of types of exercises has been less investigated. The aim of this study was to compare the effect of voluntary in an enriched environment and forced exercise on Wnt-5a expression and A  $\beta$  in hippocampus of type3 diabetic rats.

**Materials and Methods:** 25 rats were divided into 5 groups: healthy control, sham, diabetes3, diabetes3+voluntary exercise in rich environment, diabetes3+forced exercise. Type3 diabetes was induced by intraventricular injection of streptozocin and the model was confirmed by behavioral test. The protocol was done during eight weeks. Wnt-5a expression was done by western blot method and A  $\beta$  accumulation was done by thioflavin S staining. Data analysis was done by ANOVA and Tukey's post hoc test ( $P \leq 0.05$ ).

**Results:** Two exercise group had a significant increase in expression of Wnt-5a in hippocampus ( $P \leq 0.05$ ). In the comparison between exercise groups, the expression of Wnt-5a increased more in rich environment rats. The accumulation of A  $\beta$  in exercise groups was significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ) compared to the type 3 diabetes group, which was greater in the rich environment.

**Conclusion:** Forced and voluntary exercises by activating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in brain reduced accumulation of A  $\beta$  plaques. Rich environment has better effect in reducing the symptoms of patients compared to forced exercise, which may be due to reduced stressors in brain.

**Keywords:** Type 3 diabetes, High intensity interval, Rich environment, Wnt-5a, Amyloid Beta

Received: 17 July 2022  
Last revised: 04 Oct 2022  
Accepted: 23 Oct 2022

## مقاله پژوهشی

# مقایسه اثر دو شیوه تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده و تمرین اجباری بر بیان Wnt-5a و تجمع آمیلوئید بتا در بافت هیپوکامپ موشهای مبتلا به دیابت نوع ۳

نویسندگان: ساناز زنجانیان<sup>۱</sup>، محمد رضا کردی<sup>۲\*</sup>، علی اصغر رواسی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، پردیس البرز

دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران،

تهران، ایران

Email: mrkordi@ut.ac.ir

\*نویسنده مسئول: محمد رضا کردی

### چکیده

**مقدمه و هدف:** دیابت نوع ۳ یا دیابت مغزی اصطلاحی است برای بیماری آلزایمر که مقاومت انسولینی مغز را به طور انتخابی درگیر و سبب کاهش شناخت و حافظه می شود. مسیر سیگنالینگ Wnt در سیستم عصبی، کاهش علائم بیماری آلزایمر، سنتز انسولین و دیابت نقش دارد. اگرچه تأثیر مثبت فعالیت‌های بدنی در بیماری‌ها گزارش شده است، اما مقایسه نوع تمرینات کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از پژوهش حاضر مقایسه اثر تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده و تمرین اجباری بر بیان پروتئین Wnt-5a و آمیلوئید بتا ( $A\beta$ ) در بافت هیپوکامپ موشهای دیابت نوع ۳ می باشد.

**مواد و روش‌ها:** ۲۵ سر موش به ۵ گروه کنترل سالم، شش، دیابت ۳، دیابت ۳ + تمرین اختیاری در محیط غنی و دیابت ۳ + تمرین اجباری تقسیم شدند. القای دیابت ۳ با تزریق استروپتوزوسین داخل بطنی و تأیید مدل با آزمون رفتاری صورت گرفت. پروتکل تمرینی طی هشت هفته اجرا شد. بیان پروتئین Wnt-5a به روش وسترن بلات و تجمع  $A\beta$  با رنگ آمیزی تیوفلاوین S انجام شد. تحلیل داده با آزمون آنالیز واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی صورت گرفت ( $P \leq 0.05$ ).

**نتایج:** تمرین اجباری و اختیاری سبب افزایش معنادار در بیان پروتئین Wnt-5a شد ( $P \leq 0.05$ ). در مقایسه گروههای تمرینی، Wnt-5a در موشهای محیط غنی افزایش بیشتری داشت. تجمع  $A\beta$  در هر دو گروه تمرینی در مقایسه با گروه دیابت ۳ کاهش معناداری یافت ( $P \leq 0.05$ ) که این کاهش در محیط غنی بیشتر بود.

**نتیجه‌گیری:** تمرینات اجباری و اختیاری با فعال کردن مسیر سیگنالینگ Wnt/ $\beta$ -catenin در مغز باعث کاهش تجمع پلاکهای  $A\beta$  گردید. به نظر می‌رسد محیط غنی تأثیر بهتری در کاهش علائم مبتلایان دیابت نوع ۳ در مقایسه با تمرین اجباری دارد که احتمالاً ناشی از کاهش عوامل استرس‌زا بر مغز باشد.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت نوع ۳، تمرین تناوبی شدید، غنی سازی محیط، Wnt-5a، آمیلوئید بتا

دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۲

آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۹/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰

## مقدمه

بیماری آلزایمر<sup>۱</sup> (AD) یک بیماری تحلیل برنده عصبی است که با اختلال در عملکرد مدارهای سیناپسی و آسیب زدن به سلولهای مغز به خصوص ناحیه هیپوکامپ که مرکز حافظه می باشد موجب از دست رفتن نورونها و کاهش حافظه و عملکرد شناختی می شود. دو ویژگی عمده بیماری شناسی آلزایمر تجمع و رسوب پلاکهای آمیلوئیدبتا<sup>۲</sup> (A $\beta$ ) در خارج از سلول و تجمع توده های رشته ای داخل نورونی (NFT)<sup>۳</sup> و هایپر فسفریلاسیون میکروتوبولهای تائو (Tau)<sup>۴</sup> مغز می باشد (۱). بر هم خوردن تعادل بین کینازها و فسفاتازهای تنظیم کننده فسفریلاسیون تائو سبب افزایش تجمع تائو فسفریله می گردد و نقص سیستم آندولیزوزومی در پاکسازی تجمعات سمی پلاکهای  $\beta A$  باعث ورود تجمعات به میکروگلیا و ایجاد التهاب می شود، در نتیجه تخریب نورونها و اختلال شناختی و کاهش حافظه به ویژه در پیری رخ می دهد (۲). بیماری دیابت نوع ۲ به عنوان یک مشکل بزرگ بهداشتی با افزایش بی تحرکی و میانسالی در جمعیت جهانی رو به ازدیاد است. دیابت نوع ۲ با تخریب و اختلال سلولهای بتای پانکراس مقاومت به انسولین را ایجاد می کند. نقص در پیام رسانی انسولین سبب افزایش قند خون و التهاب سیستماتیک در کبد، عضله، بافت چربی و مغز گردیده و در نتیجه کاهش حساسیت سلول و افزایش مقاومت به انسولین سبب بروز دیابت می شود (۳). مطالعات نشان می دهد بیماران دیابتی، به دلیل اختلال در سیگنال انسولین در مغز، در مقایسه با بیماران هم سن غیردیابتی ۵۰ تا ۷۵ درصد ریسک بیماری AD را دارند و افرادی که شاخص توده بدنی (BMI)<sup>۵</sup> بالاتری دارند با کاهش حجم مغز در بخش پیشانی، گیجگاهی، هیپوکامپ و سایر بخش های مغز مواجه می شوند (۴). همچنین افراد میانسال مبتلا به دیابت نوع ۲ همراه با مقاومت انسولینی با کاهش عملکرد شناختی و حافظه و خطر AD روبرو هستند (۵). لذا مقاومت به انسولین مغزی به عنوان دیابت نوع ۳ شناخته

می شود (۶). در مسیرهای پیام سلولی در AD، انسولین متابولیسم  $\beta A$  و Tau را تنظیم می کند و بر رهایش  $\beta A$  در مغز تأثیر دارد (۸،۷). اختلال و نقص در مصرف گلوکز مغز و متابولیسم انرژی سبب افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری و بروز ناهنجاری های اولیه AD می شود (۹). یکی از مسیرهای کلیدی درگیر در بیماری AD و دیابت مسیر Wnt/ $\beta$ -catenin است که در بروز سرطانها و بیماری های تخریب کننده عصبی نقش مهمی دارد. Wntها گلیکوپروتئین های ترشحی تعدیل شده لیبیدی هستند که پیام دهی را از طریق گیرنده های سطح سلول به درون سلول منتقل می کنند. آبشار پیام رسانی این مسیر توسط پروتئین سیتو پلاسمی به نام Axin آغاز می شود. سپس از طریق اتصال یکی از لیگاندهای پروتئین Wnt به گیرنده خانواده Frizzled و کورسپتور LRP5/6، پیام دهی به پروتئین<sup>۷</sup> (DVL) منتقل می گردد. در نتیجه پروتئین  $\beta$ -catenin وارد هسته شده و فاکتور های رونویسی TCF/LEF را به DNA متصل می کند و ترجمه پروتئین فعال شده و در نهایت منجر به رونویسی ژنهای هدف شامل دی سیکلین (cyclin D1) و c-myc می شود (۱۲،۱۱). لیگاندهای Wnt نقش مهمی در فرایند نوروزن، تمایز پذیری، توسعه سیستم عصبی مرکزی و مدارهای سیناپسی، انعطاف پذیری سیناپسی و تنظیم گیرنده های فضای پیش سیناپسی درون هیپوکامپ دارند. اختلال یا مهار در مسیر Wnt/ $\beta$ -catenin، باعث کاهش فاکتور رشد مشتق از مغز<sup>۸</sup> (BDNF) و افزایش هایپر فسفریله شدن Tau و تجمع رسوب  $\beta A$  می شود و نورونها در هیپوکامپ و شکنج های دندانیه ای<sup>۸</sup> (DG) مغز کاهش می یابد و سبب کاهش حافظه و هجوم بیماری AD می شود (۱۳،۱۴). بنابراین فعال سازی مسیر سلولی Wnt نقش مهمی در محافظت نورونی در برابر تجمع پلاکهای  $\beta A$  را به دنبال دارد (۱۵). پروتئین Wnt-5a در سلولهای آستروسیت هیپوکامپ بالغ بیان می شود و در اثر افزایش سن و سالخوردگی کاهش می یابد (۱۶). ایزوفرم Wnt-5a در هیپوکامپ بزرگسالان نقش مهمی در فرآیند

<sup>1</sup> Alzheimer Disease

<sup>2</sup> Amyloid Beta

<sup>3</sup> Neurofibrillary Tangles

<sup>4</sup> Tau

<sup>5</sup> Body Mass Index

<sup>6</sup> Disheveled

<sup>7</sup> Brain Derived Neurotrophic Factor

<sup>8</sup> Dendrite Gyrus

$\beta$ A-12 طی شش هفته تمرین تناوبی شدید در موشهای آلزایمری گزارش شد (۲۵). همچنین هشت هفته تمرین ایتروال با شدت بالا و شدت متوسط روی بیماران دیابت نوع ۲ در سطح قند خون و همچنین پروتئین DKK-1 در مسیر Wnt کاهش معنی داری ایجاد کرد (۲۶). از دیگر استراتژی‌های هدفمند به عنوان یک روش غیر تهاجمی برای درمان برخی بیماری‌ها، فعالیتهای داوطلبانه در زیست محیط های غنی شده از امکانات است که اخیرا توجه ویژه‌ای به آن شده است. محیط غنی سازی شده مجموعه‌ای از محرکهای حسی و حرکتی و شناختی و اجتماعی است که در جوندگان به شکل قفسی بزرگتر از قفس عادی شامل اشیاء مختلف مانند تونل، اسباب بازی و چرخ‌هایی برای ورزش داوطلبانه و اختیاری است که اجازه تعامل اجتماعی با حیوانات هم‌نوع خود را می‌دهد (۲۷). تغییرات رفتاری و شناختی ایجاد شده در محیط غنی با تغییرات مولکولی نوروزن، آنژیوزن و جوانه زنی آکسون‌ها و شاخه سازی دندریته‌ها در مغز بزرگسالان مربوط است (۲۸). پایدی و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی اثربخشی درمان محیط غنی سازی شده بر بهبود حافظه فضایی و یادگیری و به حداقل رسیدن آسیب شناسی عصبی رفتار شناختی را در مغز موش‌های دیابتی گزارش کردند (۲۹). بنابراین محیط غنی می‌تواند با ایجاد محرک‌های جسمی شناختی و اجتماعی در جبران رخ داده‌های آسیب رسان مغز و بهبود یادگیری موشهای مبتلا به زوال عقل از مسیر Wnt مؤثر باشد (۳۰، ۳۱). با بررسی تحقیقات انجام شده، پژوهشی که به مقایسه بین تمرینات اختیاری و اجباری برمبتلایان دیابت نوع ۳ پرداخته باشد تا کنون صورت نگرفته است، لذا هدف از پژوهش حاضر مقایسه اثر دو شیوه تمرین اختیاری و اجباری بر آمیلوئید بتا و پروتئین Wnt-5a در بافت هیپوکامپ موشهای دیابت نوع ۳ می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به شکل تجربی و شیوه آزمایشگاهی انجام شد. آزمودنی‌های تحقیق را تعداد ۲۵ موش صحرایی نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن ( $220 \pm 30$  gr) و میانگین سنی ۸ هفته تشکیل می‌دادند که از موسسه انستیتو پاستور

نوروزن نسبت به سایر لیگاندها دارد. این لیگاند با افزایش خوشه‌های سیناپسی و تراکم پروتئین PSD-95<sup>۱</sup> سبب افزایش شکل‌گیری شاخه‌های دندریته بیشتر<sup>۲</sup> در هیپوکامپ شده و با تنظیم جریانهای ان میتیل دی آسپارات<sup>۳</sup> (NMDA) بر فاز آخر تقویت طولانی مدت LTP<sup>۴</sup> تأثیر می‌گذارد و موجب بهبود عملکرد شناختی می‌شود (۱۷). Wnt‌ها نقش مهمی به عنوان واسطه توسعه یافته در پانکراس دارند و با تنظیم بیان ژن پپتید شبه گلوکاگن<sup>۵</sup> GLP-1 موجب تنظیم مسیر انسولین و انتقال گلوکز و افزایش حساسیت انسولین بافتهای محیطی می‌شود (۱۸). مهار این مسیریام رسانی، باعث مقاومت انسولینی و افزایش استرس اکسیداتیو و تسریع پیری می‌شود (۱۹). در مطالعات متعدد گزارش شده است که فعالیت ورزشی و سبک زندگی فعال سبب ایجاد مشخصه‌های ماندگار عصبی فیزیولوژیکی مانند نوروزن، انعطاف‌پذیری سیناپسی، افزایش بیان فاکتورهای رشد مغز، کاهش استرس اکسیداتیو و به تعویق افتادن مسیر بیماری‌های عصبی گردیده و روند پیری مغز را به تعویق می‌اندازد (۲۰). همچنین تحقیقات متعدد به اثرات سودمند فعالیت بدنی منظم و با شدت بالا در کاهش سطح قند خون و مقاومت انسولینی و جلوگیری از اختلالات عصبی و چاقی و افزایش وزن بیماران دیابتی اشاره دارند (۲۱). در مطالعه‌ای با بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید طی هشت هفته کاهش مقاومت انسولینی، وزن بدن، توده چربی، گلوکز خون ناشتا و بهبود تحمل گلوکز و تحمل انسولین در موش‌های دیابتی گزارش شد (۲۲). یانگ و همکاران (۲۰۱۹) طی هشت هفته تمرین تناوبی شدید در موشهای دیابتی شده، کاهش وزن بدن، قند و انسولین ناشتا را از طریق افزایش مسیر Wnt/ $\beta$ -catenin گزارش کردند (۲۳). در مطالعه‌ای مشابه روی موش‌های دیابتی شده، هشت هفته تمرین با شدت بالا روی تردمیل سبب افزایش پروتئین Wnt و کاهش GSK3 $\beta$ <sup>۶</sup> در هیپوکامپ موشها و بهبود حافظه شد (۲۴). در بررسی‌های مربوط به اثر فعالیت بدنی کاهش

<sup>1</sup> Postsynaptic Density Protein 95 (PSD-95)

<sup>2</sup> Dendritic Branches

<sup>3</sup> N-Methyl-D-Aspartate

<sup>4</sup> Long Term Potentiation

<sup>5</sup> Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

<sup>6</sup> Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

کیلوگرم) بیهوش شده، پوست بالای مجسمه برداشته شد و مختصات مربوط به بطن های جانبی با استفاده از دستگاه استریوتاکسی و اطلس Paxinos (قدامی خلفی ۰/۹ میلی متر، جانبی ۵ میلی متر و پشت بطنی ۳/۲ میلی متر) اندازه گیری گردید و سوراخی در مجسمه ایجاد و یک تزریق از طریق سوراخ به داخل هر بطن جانبی صورت گرفت. سپس استروپتوزوسین در گروه های تمرینی و کنترل دیابت ۳ (۳ میلی گرم بر کیلوگرم/۵ میکرو متر) تزریق شدند. پس از عمل جراحی به منظور کنترل درد در محل بخیه با سرنگ انسولین لیدوکائین تزریق شد. بعد از گذشت ۱۰ روز از جراحی تایید القای مدل دیابت نوع ۳ با آزمون رفتاری مازآبی موریس<sup>۵</sup> مورد تایید قرار گرفت (۳۳).

پس از آماده سازی موشها و تایید مدل، گروه تمرین اجباری به مدت هشت هفته در یک برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا بر روی تردمیل و گروه محیط تمرین اختیاری، هشت هفته فعالیت را در قفسی به شکل غنی سازی شده انجام دادند. گروه های کنترل سالم و شم و کنترل دیابت ۳ در هیچ برنامه تمرینی شرکت نداشتند و برای یکسان سازی شرایط، ۵ روز در هفته روزانه به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه روی تردمیل خاموش قرار داده شدند.

#### پروتکل تمرین اجباری

جهت اجرای تمرین اجباری ابتدا آزمون پروتکل ظرفیت تمرینی تناوبی با شدت بالا مطابق با پروتکل وانگ و همکاران (۲۰۱۷) در موشها انجام شد (۳۴). در این پروتکل موش ها با سرعت ۸ متر بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه بر روی تردمیل شروع به دویدن کردند. بعد از هر ۲ دقیقه سرعت یک متر در دقیقه افزایش یافت تا جایی که موشها افزایش سرعت را برای بیش از ۱۰ ثانیه متوالی نتوانستند تحمل کنند. آزمون ظرفیت تمرینی<sup>۱</sup> (S max) برای تعیین میانگین حداکثر سرعت و سرعت طی شده روی تردمیل در هفته های دوم، چهارم، ششم و هشتم ثبت گردید و بر مبنای میزان حداکثر سرعت در هفته های زوج شدت تمرین محاسبه شد. جدول ۱ میانگین حداکثر سرعت و مسافت موشها را در آزمون ظرفیت تمرینی نشان می دهد.

تهیه شدند. موشها در آزمایشگاه حیوانات در شرایط کنترل شده نوردی، دمای  $23 \pm 3$  درجه سانتی گراد و رطوبت  $45 \pm 5$  درصد و در قفس هایی با ابعاد  $43 \times 27 \times 25$  سانتی متر مکعب) با دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. تمام موشها بعد از یک هفته آشنا سازی با محیط، جهت آشنایی با نوارگردان به مدت یک هفته هر روز ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و با شیب صفر در معرض آن قرار گرفتند. همچنین سه سر موش به صورت پایلوت جهت بررسی میزان فعالیتشان به مدت یک هفته در قفس محیط غنی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس موشها با میانگین سنی ۱۰ هفته به شکل تصادفی ساده به ۵ گروه پنج تایی تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل سالم که در هیچ فعالیتی شرکت نداشتند (Control)، ۲- گروه شم که جراحی را با تزریق سالین انجام دادند و در هیچ فعالیتی شرکت نکردند (Sham)، ۳- گروه کنترل دیابت نوع ۳ که تزریق استروپتوزوسین درون بطنی مغز<sup>۱</sup> (ICV-STZ) را انجام داده و هیچ فعالیتی نداشتند<sup>۲</sup> (T3DM)، ۴- گروه تمرین اجباری که تزریق ICV-STZ را انجام داده و در تمرین اجباری تناوبی با شدت بالا<sup>۳</sup> (HIIT) شرکت کردند (T3DM+HIIT)، ۵- گروه تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده<sup>۴</sup> (EE) که تزریق ICV-STZ را انجام داده و در قفس غنی شده فعالیت اختیاری داشتند (T3DM+EE).

#### القاء مدل دیابت نوع ۳

برای ایجاد مدل دیابت نوع ۳ در مغزو سلولهای عصبی CNS از روش القای مقاومت به انسولین در مغز با تزریق استروپتوزوسین درون هیپوکامپ استفاده شد تا جنبه های بیماری آلزایمر را در حیوانات ایجاد کند. تزریق ICV STZ داخل مغزی بدنی به طور مزمن باعث کاهش گلوکز و آسیب به گیرنده های گلوکز مغزی و افزایش پلاک های آمیلوئید بتا مغزی شده که به عنوان یک الگوی آزمایشی معتبر در پاتوفیزیولوژیکی اولیه بیماری های عصبی استفاده می شود (۳۲). حیوانات پس از استراحت شبانه روزی با تزریق کتامین و زایلازین (به نسبت ۶ به ۶۰ میلی گرم بر

<sup>1</sup> Intracerebroventricular Streptozotocin Injections

<sup>2</sup> Type 3 Diabetes Miletus

<sup>3</sup> High Intensity Interval Training

<sup>4</sup> Enrichment Environment

<sup>5</sup> Morris Water Maze

<sup>6</sup> Maximal Speed

گرم کردن روی تردمیل را انجام دادند. سپس طی ۹ تناوب شدید به مدت ۱,۵ دقیقه با شدت ۸۵ درصد Smax (بدست آمده در هفته های زوج) و شیب صفر و ۸ تناوب بازیافت به مدت ۲ دقیقه با شدت ۴۵ درصد Smax فعالیت داشتند و در پایان ۵ دقیقه برنامه سرد کردن روی تردمیل را اجرا کردند. جدول ۲ پروتکل تمرین اجباری را نشان می دهد.

جدول ۱. میانگین حداکثر سرعت و مسافت موشها در آزمون ظرفیت تمرینی Smax

هفته های زوج	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم
میانگین حداکثر سرعت (Smax) (متر/ دقیقه)	۲۶/۴	۲۸/۲	۳۰/۲	۳۳
میانگین مسافت طی شده (متر)	۶۳۳/۶	۷۲۴	۷۶۶	۸۰۶

پروتکل تمرین اجباری یا تمرین تناوبی شدید با توجه به پژوهش های قبل انجام گرفت (۳۵). در این پروتکل موش های گروه تمرین اجباری، ابتدا ۵ دقیقه برنامه

جدول ۲. پروتکل تمرین اجباری

سرد کردن	بدنه اصلی تمرین ( تناوب)		گرم کردن	مراحل تمرین مؤلفه تمرین
	تناوب باز یافت	تناوب شدید(۹ تناوب)		
۵ دقیقه	۲ دقیقه	۱/۳۰ ثانیه	۵ دقیقه	زمان تمرین ( دقیقه)
٪۴۰	٪۴۵	٪۸۵	۴۰ درصد	شدت تمرین( برحسب درصد Smax)
صفر	صفر	صفر	صفر	شیب تردمیل ( درجه)

### پروتکل تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده

شکل شماره ۱ قفس ساخته شده برای گروه تمرین اختیاری را نشان می دهد.



شکل ۱. قفس ساخته شده برای گروه تمرین اختیاری در محیط غنی

جهت انجام پروتکل تمرین اختیاری، با ملاحظات از کتابچه خطوط راهنما برای اسکان جوندگان، قفس محیط غنی از جنس فلزی به ابعاد (۱۰۰ در ۱۰۰ در ۸۰ سانتی متر) به صورت مشبک ساخته شد و با ابزاری مانند پارک بازی، سرسره، لوله، توپ، نردبان، پله و ویل رانینگ و مکعب های رنگی تجهیز گردید (۳۶). دسترسی آب به موش ها آزادانه داده شد و در طول دوره تمرین وسایل داخل قفس به صورت هفتگی تغییر داده شد. پنج موش هر روز به مدت ۲ ساعت که قبلا پایلوت شده بودند در قفس قرار داده شده و آزادانه به فعالیت بدنی و تعامل پرداختند و فعالیت موش ها با نرم افزار Kinovea رویت گردید.



**روش آزمایشگاهی**

پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین جلسه تمرینات، از موش‌ها آزمون رفتاری ماز آبی موریس جهت بررسی تغییرات شناختی گرفته شد. سپس مطابق با ضوابط راهنمای کمیته اخلاق پژوهش در علوم زیستی دانشگاه تهران، همه حیوانات با روش مرگ راحت<sup>۱</sup> به وسیله گاز CO<sub>2</sub> (غلظت ۳۰-۴۰ درصد) بیهوش و کشته شدند. سپس مغز موشها توسط عمل جراحی خارج گردید و هیپوکامپ آنها از هر دو نیمکره چپ و راست جدا و سریعاً داخل میکرو تیوب و تانک ازت به منظور آزمایش قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان تجمع  $\beta A$  با روش رنگ‌آمیزی تیوفلاوین S و اندازه‌گیری بیان پروتئین Wnt-5a به روش وسترن بلات در بافت هیپوکامپ در ۵ نمونه در هر گروه انجام شد (۳۷،۳۸).

**تکنیک رنگ آمیزی تیوفلاوین**

ابتدا لام‌ها را دیپارافینه کرده و مراحل آبدهی انجام شد. به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه محلول تیوفلاوین ۱ (درصد-T1892) (Sigma) در تاریکی بر روی لامها ریخته شد. سپس لامها را با اتانول ۸۰٪ برای ۲ مرتبه و هر مرتبه ۳ دقیقه شستشو داده و لام‌ها به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۹۵٪ قرار داده شد. پس از آن نمونه‌ها را با آب مقطر شستشو داده و محلول گلیسرول و (PBS (P4417-Sigma را بر روی نمونه ریخته و لامل به منظور عکس برداری فلورسنت (با میکروسکوپ Olympus) بر روی لام قرار داده شد.

**تکنیک وسترن بلات**

روش وسترن بلات انتقال پروتئین از ژل SDS-PAGE به غشا را امکان پذیر می‌کند. پروتئین‌های بلات شده یک کپی دقیق از ژل را تشکیل می‌دهند و با این روش شناسایی اختصاصی پروتئین هدف با آنتی‌بادی مناسب صورت می‌گیرد. برای استخراج پروتئین از نمونه‌های سلولی ابتدا سلول‌ها را تریپسینه<sup>۲</sup> کرده و به صورت معلق در آورده و سپس لیز سلول‌ها با استفاده از یک بافر لیز کننده همراه با مهار کننده پروتئاز<sup>۳</sup> انجام شد. سپس محلول لیز را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را جمع کرده و در نهایت مایع رویی (یا مخلوط پروتئین) را به یک لوله تازه منتقل و

در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد شده. پس از آماده سازی ژل نمونه‌ها را به همراه بافر نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده و سپس در چاهک‌های ژل تزریق و در نهایت پس از اتمام الکتروفورز<sup>۴</sup>، پروتئین‌ها بر روی ژل SDS-PAGE بر اساس اندازه تفکیک شدند.

در مرحله ترانسفر، پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل به کاغذ PVDF بصورت پیوسته و مرطوب منتقل گردید. بدین منظور ابتدا مقداری از بافر انتقال را در یک ظرف تمیز ریخته و ژل را پس از بریدن بخش متراکم کننده آن در بافر قرار داده شد. کاغذ PVDF را در متانول و سپس در بافر انتقال خیس نموده و چند پد صافی و دو عدد اسفنج را که قرار است در طرفین غشا و ژل قرار بگیرند را در بافر انتقال قرار داده تا کاملاً خیس گردید. سپس اجزای فوق رو هم قرار گرفت و نهایتاً ساندویچ بلات را در قاب پلاستیکی مربوطه در تانک بلات که تا ارتفاع مناسب با بافر پر شده است، قرار داده شد.

در مرحله بلاکینگ و تشخیص با آنتی بادی اولیه و ثانویه پس از اتمام مرحله ترانسفر، کاغذ PVDF به منظور حذف اتصالات غیر اختصاصی و جهت تشخیص اختصاصی در محلول بلاکر به مدت یک ساعت قرار گرفت. سپس غشای PVDF را در محلول آنتی بادی اولیه با رقت مناسب به مدت یک شبانه روز در C<sup>۴</sup> بر روی شیکر قرار می‌دهیم تا انکوبه شود. بعد از شستشو غشاء با TBST به مدت ۵ دقیقه غشای PVDF را در محلول آنتی بادی ثانویه کانژوگه شده<sup>۵</sup> با آنزیم (alkaline phosphatase or horse radish peroxidase) با رقت مناسب به مدت ۱/۵ بر روی شیکر قرار داده تا انکوبه شود. در مرحله آخر یا شناسایی با روش ECL<sup>۶</sup> و ظهور باندها بر روی فیلم x-Ray به نسبت مساوی از دو محلول کیت ECL را بر روی کاغذ PVDF ریخته شد و باندها بر روی فیلم X-RAY قابل مشاهده گردید.

<sup>4</sup> Electrophoresis<sup>5</sup> Conjugate<sup>6</sup> Electro chemiluminescence<sup>1</sup> Euthanasian<sup>2</sup> Trypsin<sup>3</sup> Protease

### آزمون رفتاری ماز آبی موریس

مدت زمان صرف شده و مسافت طی شده در ربع دایره هدف (NE zone) که قبل از سکو در آن قرار داشت اندازه‌گیری شد (۳۹).

### تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از آمار توصیفی برای گزارش میانگین و انحراف استاندارد استفاده گردید. برای تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA)<sup>۱</sup> و برای بررسی اختلاف بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری (P≤۰/۰۵) استفاده شد. محاسبات با نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Prism 5 انجام شد.

### نتایج

در جدول ۳ یافته‌های توصیفی میانگین تجمع پلاک‌های آمیلوئید بتا و بیان پروتئین Wnt-5a را در گروه‌های آزمودنی طی هشت هفته نشان می‌دهد.

در آزمون موریس ابتدا حیوان را در یک مخزن آب فلزی با دیواره سیاه به ارتفاع ۵۰-۶۰ سانتیمتر و قطر ۱۲۰-۲۰۰ سانتیمتر قرار می‌دهند که تا ارتفاع ۲۵-۳۰ سانتیمتری از آب با دمای ۲۵±۲ درجه سانتیگراد پر شده است. حیوان می‌بایست با استفاده از علائم بینایی و نشانه‌هایی که در فضای بیرونی ماز قرار دارند، مکان سکویی که در زیر آب مخفی شده است را به یاد آورند. حوضچه آب به ۴ ربع فرضی تقسیم می‌گردد و در فاصله ۱ تا ۵ سانتیمتری زیر سطح آب در وسط یکی از ربع‌ها، سکوی فلزی تیره با قطر ۱۰-۱۱ سانتیمتری قرار داده می‌شود. این سکو به منزله راه فرار حیوان از آب است و باید برای حیوان غیرقابل دید باشد. این آزمون در سه مرحله انجام شد.

### مرحله اول سازش یافتن

به منظور عادت کردن به ماز ۲۴ ساعت قبل از آموزش موشها به مدت دو دقیقه در مخزن فاقد صفحه پلکسی گلاس شنا کردند.

### مرحله دوم یادگیری

در این مرحله موش‌ها به مدت ۵ روز و هر روز در ۴ بار آزمایش جداگانه هر بار به مدت یک دقیقه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم شمال شرقی قرار داشت تحت آموزش قرار گرفتند.

بدین شکل که حیوان به طور تصادفی از یکی از چهار جهت اصلی به نحوی داخل آب رها می‌شد که سر حیوان به سمت دیواره حوضچه قرار داشته باشد. حیوان شنا می‌کرد تا سکوی پنهان زیر آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. اگر موش قادر به پیدا کردن سرکوب در مدت ۶۰ ثانیه نبود با دست به طرف آن هدایت می‌شد.

در صورتی حیوان نتواند سکو را پیدا کند به مدت ۳۰ ثانیه روی سکو قرار گرفته و استراحت می‌کند و مجدداً آزمایش را تکرار می‌کنند. مدت زمان پیدا کردن سکو تاخیر در رسیدن به سکو در هر بار آزمایش اندازه‌گیری و ثبت شد.

### مرحله سوم آزمون انتقال

۲۴ ساعت بعد از آخرین روز آموزش حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت در این مرحله موش‌ها فقط یکبار در یک آزمون ۶۰ ثانیه‌ای که طی آن سکو از داخل آب برداشته می‌شد مورد ارزیابی قرار گرفتند و

<sup>1</sup> Analysis of Variance



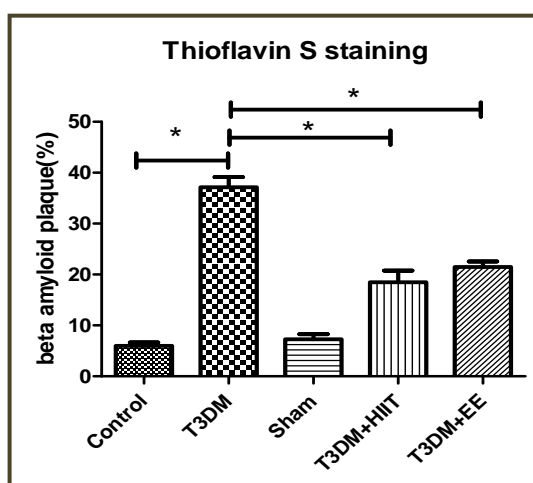
جدول ۳. یافته های توصیفی میزان تجمع پلاکهای  $\beta A$  و بیان پروتئین Wnt-5a در گروههای آزمودنی

گروه	گروه	گروه	گروه	گروه	آزمودنی ها
کنترل سالم (Control)	شم (Sham)	کنترل دیابت نوع ۳ T3DM	دیابت نوع ۳+تمرین اجباری T3DM+HIIT	دیابت نوع ۳+تمرین محیط غنی T3DM+EE	
۵/۹۶۷±۱/۱۹۳	۷/۲۶۷±۱/۷۱۰	۳۷/۱۳±۳/۴۵۳	۱۸/۴۷±۴/۰۱۵	۲۱/۴۷±۱/۹۰۴	میانگین تجمع $\beta A$
۰/۶۸۸	۰/۹۸۷	۱/۹۹۴	۲/۳۱۸	۱/۰۹۹	خطای معیار میانگین (Std E)
۱/۰۲۳±۰/۰۵۷۶	۱/۰۲۵±۰/۰۳۹۳	۰/۱۶۹۶±۰/۰۸۸۸	۰/۷۴۴۵±۰/۰۳۰۲	۰/۴۷۵۲±۰/۲۶۸۵	بیان پروتئین Wnt-5a
۰/۴۰۱۵	۰/۰۲۷۸۰	۰/۰۶۲۸۳	۰/۰۳۰۲۲	۰/۰۲۶۸۵	خطای معیار میانگین (Std E)

داده ها به میانگین و انحراف استاندارد (M±SD)

دو گروه تمرینی، مشاهده گردید تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده سبب کاهش بیشتری در پلاکهای  $A\beta$  بافت هیپوکامپ در مقایسه با تمرین اجباری شده است. نمودار ۱ درصد پلاکهای آمیلوئید بتا را در گروههای آزمودنی نشان می دهد.

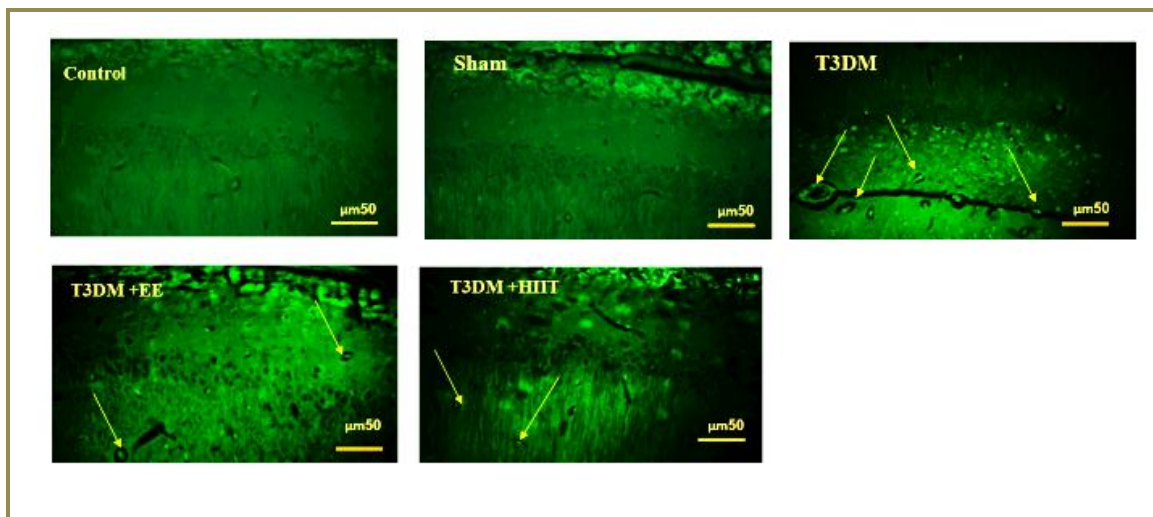
در بررسی میزان تجمع پلاکهای  $A\beta$  در گروههای آزمودنی با استفاده از آزمون تعقیبی توکی، نشان داده شد هر دو گروه تمرین اختیاری و تمرین اجباری کاهش معناداری در میزان پلاکهای  $A\beta$  در مقایسه با گروه کنترل دیابت نوع ۳ داشتند ( $P \geq 0.05$ ). همچنین در مقایسه بین



نمودار ۱. کاهش معنادار درصد پلاکهای آمیلوئید بتا در نتایج آزمون توکی بین گروه محیط غنی سازی شده و گروه تمرین اجباری در مقایسه با کنترل دیابت نوع ۳ ( $P \leq 0.05$ ) \*

در شکل همانطورکه مشاهده می شود میزان پلاک‌های آمیلوئیدی در دو گروه تمرین نسبت به گروه کنترل دیابت ۳ کاهش یافته است.

در شکل ۲ با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی تیوفلاوین S و علامت‌های مشخص شده تجمع پلاک‌های آمیلوئید بتا در ۵ گروه آزمودنی بعد از برنامه تمرینی نشان داده شده است.

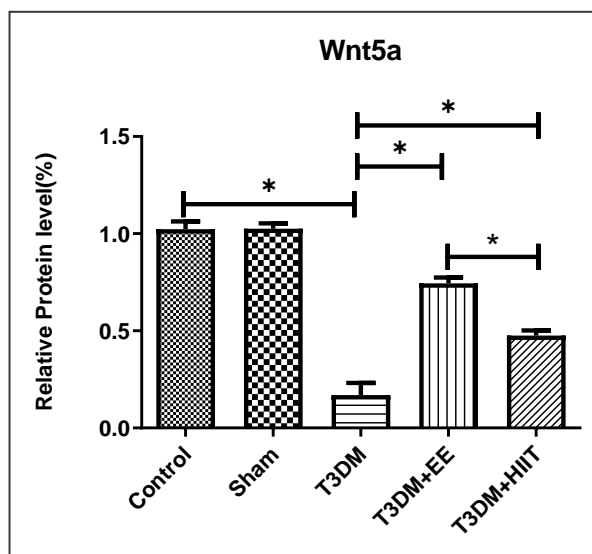


شکل ۲. تکنیک رنگ آمیزی تیوفلاوین در بافت هیپوکمپ گروه‌های آزمودنی برای نشان دادن پلاک‌های آمیلوئیدی

### بحث

به تمرین اجباری بیشتر بود ( $P \leq 0/05$ ). در نمودار ۲ نتایج آزمون توکی و مقایسه سطح پروتئین Wnt-5a بین گروه‌های آزمودنی نشان داده شده است.

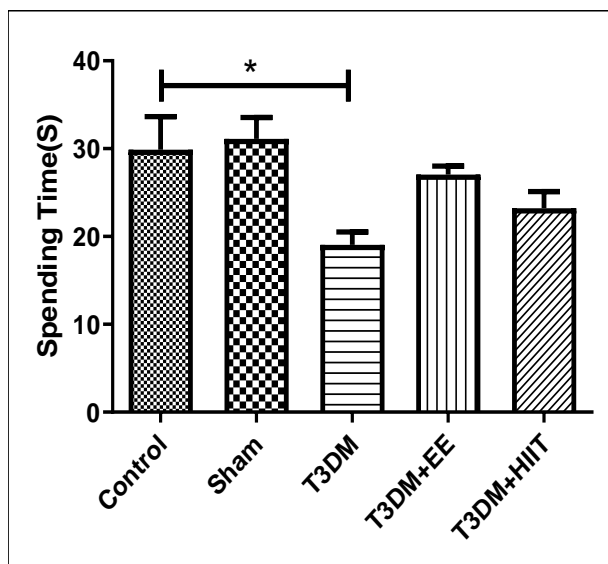
در بررسی نتایج آزمون توکی در پروتئین Wnt-5a افزایش معناداری در بیان Wnt-5a گروه تمرین محیط غنی سازی شده و گروه تمرین اجباری در مقایسه با گروه کنترل دیابت نوع ۳ مشاهده شد ( $P \leq 0/05$ ). همچنین بین دو گروه تمرینی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که این افزایش در تمرین اختیاری محیط غنی سازی شده نسبت



نمودار ۲. مقایسه تغییرات پروتئین Wnt-5a در گروه‌های آزمودنی ( $P \leq 0/05$ )

سپری کرده‌اند. اگرچه این تفاوت در مقایسه با گروه کنترل معنادار نیست. اما در تأیید مدل القاء، گروه دیابت نوع ۳ در مقایسه با گروه کنترل سالم معنا دار شده است.

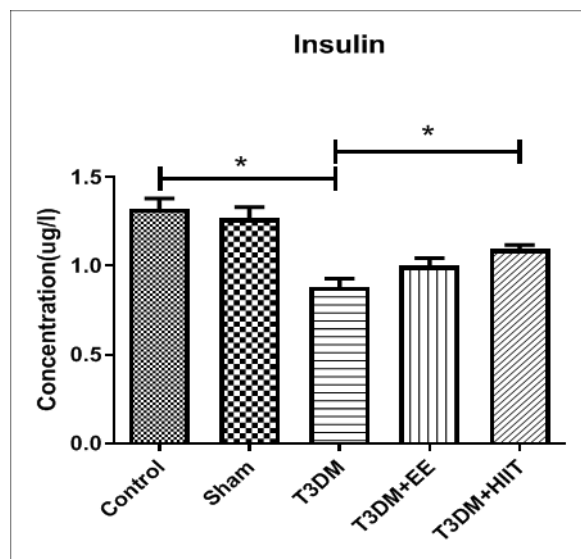
در نمودار ۳ نتایج آزمون رفتاری ماز آبی موریس آورده شده است که نشان می‌دهد موشهای گروه تمرین اختیاری و اجباری مدت زمان بیشتری را در منطقه سکوی هدف



نمودار ۳. نتایج آزمون ماز آبی موریس در گروههای آزمودنی ( $P \geq 0.05$ ) \*

اختیاری تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل سالم داشت ولی با گروه دیابت نوع ۳ معنی دار نبود.

در نمودار ۵ نتایج غلظت انسولین برای تأیید مدل دیابت نشان داده است. در این نمودار غلظت انسولین در گروه تمرین اجباری کاهش معناداری در مقایسه با گروه دیابت نوع ۳ داشته است ( $P \geq 0.05$ ). همچنین گروه تمرین



نمودار ۴. غلظت انسولین در گروههای آزمودنی ( $P \leq 0.05$ ) \*

## بحث

جمله قشر مغز، هیپوکمپ، انعطاف پذیری سیناپسی و نوروپلاستیستی است (۴۵).

در پژوهش حاضر، مشاهده شد با ایجاد یک مدل آلزایمری دیابتی (دیابت نوع ۳) دو شیوه تمرین اختیاری در محیط غنی سازی شده و تمرین اجباری تناوبی با شدت بالا طی هشت هفته منجر به افزایش معنادار در بیان پروتئین Wnt-5a و کاهش تجمع  $\beta A$  در بافت هیپوکامپ موشهای مبتلا به دیابت نوع ۳ گردید ( $P \leq 0.05$ ). همچنین در مقایسه دو برنامه تمرین، فعالیت اختیاری در محیط غنی شده به کاهش بیشتر پلاکهای  $\beta A$  در مقایسه با تمرین اجباری منجر شده است. مطالعات به این مهم اشاره دارند که محیط غنی سازی شده می تواند یک روش درمانی جایگزین برای از بین بردن استرس، جلوگیری از آسیب عصبی در قشر حرکتی مغز و دستیابی به کنترل قند خون مؤثر در دیابت همراه با افزایش عملکرد حافظه و شناخت عنوان باشد (۴۶).

این یافته‌ها نشان می‌دهند که فعال سازی سیگنال‌دهی Wnt/ $\beta$ -catenin یک مکانیسم بالقوه است که زمینه ساز بهبود شناختی مرتبط با سبک زندگی فعال است. در مطالعه دیگر همسو با پژوهش حاضر، ۱۲ هفته تمرین روی تردمیل با شدت متوسط کاهش پلاکهای  $\beta A$  در موشهای آلزایمری و افزایش عملکرد شناختی و حافظه فضایی را به دنبال داشت (۴۵). از سویی با بررسی اثرات محافظتی سه وضعیت غنی سازی محیطی، غنی سازی اجتماعی و فعالیت بی هواری بر استرس اکسیداتیو ناشی از  $\beta A$  و اختلالات یادگیری طی ۸ هفته روی موشهای مدل آلزایمری، مشاهده شد غنی سازی محیط و فعالیت بدنی اثرات محافظتی عصبی بر کاهش حافظه و یادگیری ناشی از مسمومیت  $\beta A$  دارد و می‌تواند سبب کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو شود (۴۶). در مطالعات مربوط به غنی سازی محیط زیست با افزایش تحریک چند جهته در حرکت و سیستم های حسی و شناختی حیوانات، بهبود شناختی، انعطاف پذیری سیناپسی (۴۷) و تقویت فعل و انفعالات قشر مغز و توسعه هیپوکامپ و همچنین کاهش اولیگو مریهای  $\beta A$  در موشهای میانسال حاصل گردید (۴۸).

محققان امروزه به دنبال کشف راه‌های جدیدی برای درمان بیماری‌های متعدد هستند. بخش وسیعی از این مطالعات مربوط به حوزه علوم پزشکی بوده که جنبه‌های دارو درمانی دارد و هزینه زیادی را بر فرد بیمار تحمیل می‌کند. اما همگام با تحقیقات ارزشمند پزشکی، در حوزه علوم ورزشی پژوهش‌های سودمندی همسو با مطالعات زیستی، سلولی و مولکولی صورت گرفته که نشان می‌دهد تمرینات منظم ورزشی به عنوان یک استراتژی مناسب در راستای پیشگیری از بیماریها و جلوگیری از روند رو به گسترش بیماری مؤثر بوده و در مقایسه با روشهای درمان دارویی کم هزینه و بی خطر است. طی چند دهه اخیر، اثر مثبت فعالیت ورزشی بر بهبود عملکرد شناختی، نوروزن، انعطاف پذیری سیناپسی<sup>۱</sup> و کاهش استرس اکسیداتیو و به تعویق انداختن مسیر بیماری‌های عصبی در پژوهشها اثبات شده است (۴۰). از سوی دیگر پژوهش‌هایی بر روی بیماران دیابتی به اثرات مفید و سودمند فعالیت بدنی منظم در کاهش سطح قند خون و مقاومت انسولینی و همچنین جلوگیری از افسردگی و اختلالات عصبی و چاقی در ارتباط با این بیماری پرداخته است (۴۱). در مسیرهای سیگنال سلولی مشترک در بیماری دیابت و آلزایمر، بروز مقاومت انسولینی در مغز و کاهش رسیدن انسولین به نورونها، سبب اختلال عملکرد شناختی می‌گردد اصطلاح دیابت نوع ۳ مورد استفاده قرار گرفته است (۴۲). مسیر Wnt/ $\beta$ catenin از مسیرهای پیام رسان در بیماری آلزایمر و دیابت می‌باشد که افزایش بیان پروتئین‌های این سیگنال در کاهش پاتولوژی آلزایمر و دیابت مؤثر است. تا جایی که بیان پروتئین‌های لیگاند Wnt/ $\beta$ -catenin تعدیل سیگنال انسولین در مغز می‌شود (۴۳). از دیگر استراتژی‌های موفق برای پیشگیری از روند رو به پیشرفت زوال عقل، ایجاد شرایط محیط مناسب و غنی سازی شده می‌باشد. یعنی محیط‌هایی که از نظر استانداردها شبیه محیط زندگی بوده اما به دور از شرایط استرس‌زا و همراه با فعالیت‌های اختیاری می‌باشد که در بسیاری از مطالعات دهه‌های اخیر به آن اشاره شده است (۴۴). یکی از تاثیرات غنی سازی محیط زیست روی قسمت‌های مختلف مغز از

<sup>1</sup> Synaptic Plasticity

دیابت نوع ۲ از طریق تعدیل Wnt /  $\beta$ -catenin در پیری می شود (۴۷).

این چنین به نظر می رسد Wnt5a به عنوان واسطه ای برای بقای نورون قشر مغز عمل می کند و  $\beta$  با کاهش بیان Wnt5a، آپوپتوز نورون قشر مغز را ارتقا می دهد. لذا در مسیر سلولی فعال سازی چرخه سلولی با کاهش اثر مهاری Wnt5a در نورون های قشر تحت درمان با  $\beta$  انجام می شود. علاوه بر این، در این مکانیسم سلولی Wnt5a از طریق مسیر Wnt/Ca2 سیگنال می دهد تا بیان سیکلین D1 را سرکوب کند و فعال سازی چرخه سلولی عصبی را به شیوه ای مستقل از سلول تنظیم کند. بنابر این کاهش سیگنال دهی Wnt5a یک مرحله مهم در طول آپوپتوز نورون قشر مغز ناشی از  $\beta$  است و ممکن است به تخریب عصبی مرتبط با AD کمک کند (۵۸). در این پژوهش نیز با کاهش آمیلوئید بتا تجمع یافته بیان Wnt-5a افزایش یافت که مبین این موضوع می باشد. با مقایسه این دو روش تمرین به نظر می رسد محیط های به دور از استرس و آزادانه سبب بهبود بیشتر شناخت و عملکرد حافظه شده و احتمالاً با کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو در محیط غنی شده علائم بیماری کاهش می یابد (۵۹ و ۶۰).

### نتیجه گیری

تغییر محیط و سبک زندگی به محیطی شاد و فعال و غنی شده و همچنین داشتن یک شیوه زندگی فعال توام با تمرینات ورزشی منظم می تواند سبب بقای سلول های عصبی و کاهش علائم آلزایمر در مغز گردد. علاوه بر این، با وجود اینکه تأثیر سودمند برنامه های تمرینی تناوبی شدید در تحقیقات مختلف بر بیماری آلزایمر و دیابت و ارتباط سگنالینگ این دو بیماری اثبات شده است، اما این پژوهش در یک روند مقایسه ای نشان داد که فعالیت اختیاری در زیست محیط های غنی شده از امکانات، در مقایسه با تمرینات با شدت بالا می تواند اثر مطلوبتری بر کاهش علائم دیابت نوع ۳ بگذارد و با افزایش بیان پروتئین Wnt-5a در سیگنال سلولی Wnt/ $\beta$ -catenin و کاهش تجمع پلاک های  $\beta$ A سبب بهبود شناخت و کیفیت

بنابراین قرار گرفتن در معرض زیست محیط های غنی شده به عنوان معیار درمانی برای کنترل ترس، رفتارهای غیر عادی و استرس در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد و اثرات سودمندی را در غیاب ورزش دارد (۴۹).

از طرفی فرصت بهتری برای کاهش علائم اضطراب و افسردگی در کوتاه مدت فراهم می کند که فعالیت ورزشی ممکن است به اندازه محیط غنی سازی شده کوتاه مدت برای عملکرد مغز مفید نباشد (۵۰). شاید برای ایجاد تغییرات مشاهده شده در رفتار و بهبود بیشتر حافظه، به فعالیت با دوام ورزشی بیشتر نیاز باشد. لذا به نظر می رسد محیط غنی سازی شده حتی در غیاب ورزش، عملکرد شناختی و رفتار را بهبود بخشیده و حافظه را احتمالاً از طریق مکانیسمی مستقل از تنظیم مجدد BDNF و نورونز در شکنج دندان دار تقویت می کند (۵۱ و ۵۲).

در پژوهش حاضر افزایش معنادار بیان پروتئین Wnt-5a در هیپوکامپ در گروه های تمرین بیانگر این موضوع است که ورزش از هر دو نوع می تواند بر بیان پروتئین اندازه گیری شده در مسیر سیگنال دیابت و آلزایمر تأثیر مطلوبی داشته باشد. در پژوهشی مشابه گزارش شد با کاهش سیگنال Wnt /  $\beta$ -catenin در پیری به طور مشهود در مغز جوندگان مسن بیان و ترشح Wnt-3a در هیپوکامپ به تدریج کاهش می یابد که با مطالعه صورت گرفته همخوانی دارد (۵۳). ورزش تردمیل با افزایش نورونز از طریق فعال سازی مسیر سیگنالینگ Wnt در موش های دیابتی، کاهش حافظه در آلزایمر را کاهش می دهد (۵۴). همچنین اختلال عملکرد شناختی و از دست دادن نورونز با مهار مسیر Wnt در موش های دیابتی ارتباط دارد و درمان انسولین با افزایش بیان Wnt3 در آستروسیتها باعث ایجاد نورونز می شود (۵۵).

در راستای مطالعات ناهمسو تنها در پژوهشی گزارش شد که در بیماران دیابتی با مهار سیگنال Wnt-5a کاهش مقاومت به انسولین ایجاد گردید (۵۶). همچنین همسو با پژوهش صورت گرفته با بررسی تأثیر ورزش شنا بر بیماری دیابت از طریق تعدیل مسیر wnt یانگ و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند ورزش شنا با کاهش و مهار GSK3 $\beta$  موجب کاهش مقاومت به انسولین در بیماران

### ملاحظات اخلاقی

کمیته اخلاق این پژوهش IR.UT.SPORT.REC.1399.007 می باشد.

### تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

زندگی بیماران گردیده و به عنوان راهبردی مؤثر و کم هزینه پیشنهاد گردد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تهران است و از همه افرادی که در اجرای مطالعه حاضر مشارکت داشتند تشکر و قدردانی می شود.

### منابع

1. Chen XQ, Mobley WC. Alzheimer disease pathogenesis: insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A $\beta$  and tau species. *Frontiers in Neuroscience* 2019;13:659.
2. Justice NJ. The relationship between stress and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress* 2018;8:127-133.
3. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(17):6275.
4. Pugazhenthii S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochemistry and Molecular Genetics of Disease Processes and Models of Human Disease Journal* 2017;1863(5):1037-1045.
5. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochemistry and Molecular Genetics of Disease Processes and Models of Human Disease Journal* 2017;1863(5):1078-1089.
6. Folch J, Ettcheto M, Busquets O, Sánchez-López E, Castro-Torres RD, Verdaguer E, et al. The Implication of the Brain Insulin Receptor in Late Onset Alzheimer's Disease Dementia. *Pharmaceuticals Journal (Basel)* 2018;11(1):11.
7. Rad SK, Arya A, Karimian H, et al. Mechanism involved in insulin resistance via accumulation of  $\beta$ -amyloid and neurofibrillary tangles: link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Drug Design, Development and Therapy* 2018;12:3999-4021.
8. Nguyen TT, Ta QT, Nguyen TK, Nguyen TT, Van Giau V. Type 3 Diabetes and its role Implications in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(9):3165.
9. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's disease as type 3 diabetes: Common pathophysiological mechanisms between Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 2022;23(5):2687.
10. Stanganello E, Zahavi EE, Burute M, Smits J, Jordens I, Maurice MM, et al. Wnt signaling directs neuronal polarity and axonal growth. *Journal of Science* 2019;13:318-327.
11. Arredondo SB, Valenzuela-Bezanilla D, Mardones MD, Varela-Nallar L. Role of Wnt Signaling in Adult Hippocampal Neurogenesis in Health and Disease. *Journal Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8:860.
12. Wisniewska MB. Physiological role of  $\beta$ -catenin/TCF signaling in neurons of the adult brain. *Neurochemical Research* 2013;38(6):1144-55.
13. Palomer E, Buechler J, Salinas PC. Wnt Signaling Deregulation in the Aging and Alzheimer's Brain. *Journal of Frontiers Cell Neuroscience* 2019;13:227.
14. Tapia-Rojas C, Inestroza NC. Loss of canonical Wnt signaling is involved in the pathogenesis of Alzheimer's



- disease. *Journal of Neural Regeneration Research* 2018;13(10):1705.
15. Chen CM, Orefice LL, Chiu SL, LeGates TA, Hattar S, Haganir RL, Zhao H, Xu B, Kuruvilla R. Wnt-5a is essential for hippocampal dendritic maintenance and spatial learning and memory in adult mice. *Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017;114(4):619-28.
  16. Sebastian B. Arredondo, Fernanda G. Guerrero, Andrea Herrera-Soto, Joaquin Jensen-Flores, Daniel B. Bustamante, Alejandro Oñate-Ponce, Pablo Henny. Wnt5a promotes differentiation and development of adult-born neurons in the hippocampus by noncanonical Wnt signaling, *Stem Cells* 2022;38(3):422-436
  17. Simonetti M, Kuner R. Spinal Wnt5a Plays a Key Role in Spinal Dendritic Spine Remodeling in Neuropathic and Inflammatory Pain Models and in the Proalgesic Effects of Peripheral Wnt3-a. *Journal of Neuroscience* 2020;40(35):6664-6677.
  18. Xiong X, Shao W, Jin T. New insight into the mechanisms underlying the function of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 in pancreatic  $\beta$ -cells: the involvement of the Wnt signaling pathway effector  $\beta$ -catenin. *Journal of Islets* 2012;4(6):359-65.
  19. Costa R, Peruzzo R, Bachmann M, Montà GD, Vicario M, Santinon G, et al. Impaired Mitochondrial ATP Production Downregulates Wnt Signaling via ER Stress Induction. *Journal of Cell Reports* 2019;28(8):1949-1960.
  20. Chen M, Do H. Wnt Signaling in Neurogenesis during Aging and Physical Activity. *Journal of Brain Science* 2012;2(4):745-68.
  21. Mahmoudi Y, Gholami M, Nikbakht H, Ebrahim K, Bakhtiyari S. Effect of high intensity interval training with metformin on lipid profiles and HbA1c in diabetic rats. *The Iranian Journal of Diabetes and Obesity (IJDO)* 2018;10(3):144-150.
  22. Zheng L, Rao Z, Guo Y, Chen P, Xiao W. High-Intensity Interval Training Restores Glycolipid Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Mice With Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:561.
  23. Yang D, Yang Y, Li Y, Han R. Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus: from mechanism to orientation. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2019;74:313-321.
  24. Kim DY, Jung SY, Kim K, Kim CJ. Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2016;12(4):276-83.
  25. Naderi S, Habibi A, Kesmati M, Rezaie A, Ghanbarzadeh M. The effects of six weeks high intensity interval training on Amyloid Beta1-42 Peptide in Hippocampus of Rat Model of Alzheimer's Disease Induced with STZ. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences* 2018;7(2).
  26. Rahimi Saghand M, Rajabi H, Dehkhoda M, Hosseini A. The Effects of eight weeks high-intensity interval training vs. continuous moderate-intensity training on plasma Dickkopf-1 and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Annals of Applied Sport Science Journal* 2020;8(2).
  27. Mora F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Journal of Dialogues in Clinical Neuroscience* 2013;15(1):45-52.
  28. Jin X, Li T, Zhang L, Ma J, Yu L, Li C, Niu L. Environmental enrichment improves spatial learning and memory in vascular dementia rats with activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway. *Journal of Medical Science Monitor* 2017;23:207-215.
  29. Pamidi N, Nayak S. Effect of environmental enrichment exposure on neuronal morphology of streptozotocin-induced diabetic and stressed rat hippocampus. *Biomedical Journal* 2014;37(4):225-231.
  30. Zhang X, Shi X, Wang J, Xu Z, He J. Enriched environment remedies cognitive dysfunctions and synaptic plasticity through NMDAR- $\text{Ca}^{2+}$ -Activin A circuit in chronic cerebral hypoperfusion rats. *Journal of Aging (Albany NY)* 2021;13(16):20748-20761.

31. Leon M, Woo C. Environmental Enrichment and Successful Aging. *Front Behavior Neuroscience* 2018;12:155.
32. Kamat PK. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regeneration Research Journal* 2015;10(7):1050-2
33. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of Visualized Experiments* 2011;20(53):2920.
34. Wang N, Liu Y, Ma Y, Wen D. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. *Life Science Journal* 2017;191:122-131.
35. Li B, Liang F, Ding X, Yan Q, Zhao Y, Zhang X et al. Interval and continuous exercise overcome memory deficits related to  $\beta$ -Amyloid accumulation through modulating mitochondrial dynamics. *Behavioural Brain Research* 2019;376: 112171.
36. Herring A, Blome M, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. *Brain Pathology Journal* 2010;20(1):166-75.
37. Lin, CM, Chen, HH, Lin, CA. et al. Apigenin-induced lysosomal degradation of  $\beta$ -catenin in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Science Report* 2017;7:372.
38. Christensen A, Pike CJ. Staining and Quantification of  $\beta$ -Amyloid Pathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Methods Molecular Biology Journal* 2020;2144:211-221.
39. Vorhees CV, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols* 2006;1(2):848-858.
40. de Sousa Fernandes, Ordônio TF, Santos GCJ, Santos LER, Calazans CT, Gomes DA, Santos TM. Effects of Physical Exercise on Neuroplasticity and Brain Function: A Systematic Review in Human and Animal Studies. *Neural Plast* 2020;2020:8856621.
41. Riahi S, Riyahi F, Yaribeygi H. Diabetes and Role of Exercise on its Control; A systematic Review. *Health Research Journal Baqiyatallah* 2016;1 (2):113-121.
42. Narendra Pamidi, Christina Gertrude Yap, Sathha Nayak B. Protective effect of environmental enrichment on the morphology of neurons in the motor cortex of diabetic and stressed rats. *Archives of Biochemistry and Molecular Biology* 2019;10:052-070.
43. Yoon JC, Ng A, Kim BH, Bianco A, Xavier RJ, Elledge SJ. Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes & Developmen* 2010;24(14):1507-18.
44. Clemenson, G. D., Gage, F. H., & Stark, C. E. Environmental enrichment and neuronal plasticity. *The Oxford Handbook of Developmental Neural Plasticity* 2018; 85:283-284.
45. Li B, Liang F, Ding X, Yan Q, Zhao Y, Zhang X, et al. Interval and continuous exercise overcome memory deficits related to  $\beta$ -Amyloid accumulation through modulating mitochondrial dynamics. *Behavioral Brain Research Journal* 2019; 376:112171.
46. Prado Lima MG, Schimidt HL, Garcia A, Daré LR, Carpes FP, Izquierdo I, et al. Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in Amyloid beta neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) Journal* 2018;115(10):2403-2409.
47. Ball NJ, Mercado III E, Orduña I. Enriched environments as a potential treatment for developmental disorders: A Critical Assessment. *Frontiers in Psychology* 2019;10:466.
48. Robison LS, Francis N, Popescu DL, Anderson ME, Hatfield J, Xu F, et al. Environmental enrichment: disentangling the influence of novelty, social, and physical activity on cerebral amyloid angiopathy in a transgenic mouse model. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(3):843.
49. Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment,

- in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus Journal* 2013;23(6):437-50.
50. Singhal G, Morgan J, Jawahar MC, Corrigan F, Jaehne EJ, Toben C, et al. Short-term environmental enrichment, and not physical exercise, alleviate cognitive decline and anxiety from middle age onwards without affecting hippocampal gene expression. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience Journal* 2019;19(5):1143-1169.
51. Rostami, S, Haghparast A, Fayazmilani R. The effect of combined training and play in an enriched environment during pre-pubertal period on hippocampal structure of adult rats. *Sport Physiology Journal* 2021;13(49):199-222.
52. Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers Neuroscience* 2009;3:50.
53. Orellana AM, Vasconcelos AR, Leite JA, de Sá Lima L, Andreotti DZ, Munhoz CD, et al. Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 $\beta$  and Wnt/  $\beta$ -Catenin signaling in rat hippocampus. *Aging (Albany NY)* 2015;7(12):1094-1100.
54. Lee CB, Baek SS. Impact of exercise on hippocampal neurogenesis in hyperglycemic diabetes. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2020;16(2):115-117.
55. Fujimaki S, Kuwabara T. Diabetes-Induced Dysfunction of Mitochondria and Stem Cells in Skeletal Muscle and the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(10):2147.
56. Scheibner K, Bakhti M, Bastidas-Ponce A, Lickert H. Wnt signaling: Implications in endoderm development and pancreas organogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 2019;61:48-55.
57. Yang Q, Wang WW, Ma P, Ma ZX, Hao M, Adelus TI, et al. Swimming training alleviated insulin resistance through Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling in type 2 diabetic rats. *Iran Journal of Basic Medical Science* 2017;20(11):1220-1226.
58. Zhou L, Chen D, Huang XM, Long F, Cai H, Yao WX, et al. Wnt5a Promotes Cortical Neuron Survival by Inhibiting Cell-Cycle Activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017;11:281.
59. Kimura LF, Novaes LS, Picolo G, Munhoz CD, Cheung CW, Camarini R. How environmental enrichment balances out neuroinflammation in chronic pain and comorbid depression and anxiety disorders. *Brain Journal Pharmacology* 2022;179(8):1640-1660.
60. Pamidi N, Yap CG, Nayak S. Environmental enrichment preserves hippocampal neurons in diabetes and stressed rats. *Histology & Histopathology* 2022;37(4):385-395.