Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 53, Volume 14, Issue 1

Research Article

The Effect of Resistance Training Along with Royal Jelly Supplementation on Genes Expression of ProNGF and P75 Receptor in the Hippocampal Tissue of Alzheimer's Rats

Amin Ashofteh[1], Sadegh Cheragh-Birjandi[2,*], Hossein TaheriChadorneshin[3]

[1]PhD in Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
[2]Assistance Professor in Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
[3]Assistance Professor in Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, University of Bojnord, Bojnord, Iran

***Corresponding author:** Sadegh Cheragh-Birjandi, Assistance Professor in Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran. E-mail: s_birjandi2001@yahoo.com

DOI: 10.52547/nkums.14.4.1

How to Cite this Article:
Ashofteh A, Cheragh-Birjandi S, TaheriChadorneshin H. The Effect of Resistance Training Along with Royal Jelly Supplementation on Expression of Nerve Growth Factor and Tyrosine Kinase A Receptor in the Hippocampal Tissue of Alzheimer's Rats. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2022;**14**(1):1-8. DOI: 10.52547/nkums.14.4.1

Received: 12 Jul 2021
Accepted: 03 Jan 2022
Keywords:
Resistance Training
Royal Jelly
Pro-Nerve Growth Factor
P75
Alzheimer's Disease

Abstract

Introduction: Current study aimed to investigate the effects of resistance training (RT) along with royal jelly (RJ) supplementation on hippocampal expression of nerve growth factor (proNGF) and p75 receptor in a rat's model of Alzheimer's disease.

Method: 42 male Sprague-Dawley rats were treated with Trimethyltin chloride (8 mg/kg). Then, the rats were randomly divided into seven equal groups control, RT, RT + supplementation of RJ 100 mg/kg (RT+RJ100), RT+supplementation of RJ200 (RT+RJ200), supplementation of RJ100, supplementation of RJ200, and sham group. Supplement groups received 100 and 200 mg/kg/day of RJ for eight weeks. The incremental RT protocol was performed for eight weeks, three weekly sessions at intensity according to 30-100% of body weight.

Results: The RT protocol significantly increased proNGF expression compared to the control group. In addition, RJ100 and RJ200 resulted in a significant increase in the expression of proNGF and p75. Furthermore, the interaction effect of RT+RJ100 and RT+RJ200 induced a considerable increase in proNGF and p75 expression. Also, the impact of RJ on proNGF and p75 expression was dose-dependent, and the effect of the 200 mg/kg dose was significantly higher than the 100 mg/kg dose.

Conclusion: Both RT protocol and RJ supplementation synergistically increase neurotrophin expression in the hippocampus of Alzheimer's rats. The effects of RJ in combination use are dose-dependent, with higher doses having higher effects on neurotrophin and receptor expression. In the case of using a single dose of RJ, a lower dose is more desirable.

Copyright © 2022 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

اثر تمرین مقاومتی همراه با مکمل دهی ژل رویال بر سطوح بیان ژن‌های پیش ساز عامل رشد عصب و گیرنده P ۷۵ در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مدل آلزایمری شده

امین آشفته[۱]، صادق چراغ بیرجندی[۲*]، حسین طاهری چادرنشین[۳]

[۱]دانشجوی دکتری گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
[۲]استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
[۳]استادیار فیزیولوژی ورزش، گروه علوم ورزشی، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** صادق چراغ بیرجندی، استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران. ایمیل: s_birjandi2001@yahoo.com

DOI: 10.52547/nkums.14.4.1

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳

واژگان کلیدی:
تمرین مقاومتی
ژل رویال
پیش برنده عامل رشد عصبی
P ۷۵
بیماری آلزایمر

چکیده

مقدمه: هدف مطالعه حاضر بررسی اثر RT همراه با مصرف RJ بر بیان هیپوکامپی پیش ساز عامل رشد عصب (proNGF) و گیرنده P ۷۵ در موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری آلزایمر بود.

روش کار: ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو ـ داولی با تری متیل تین کلراید (mg/kg۸) آلزایمری شدند. موش‌ها به طور تصادفی به ۷ گروه برابر کنترل، RT، RT+ مصرف (RT+RJ۱۰۰) ۱۰۰ mg/kg RJ، RT+ مصرف (RT+RJ۲۰۰) ۲۰۰ RJ، مصرف RJ۱۰۰، مصرف ۲۰۰ RJ و گروه شم تقسیم شدند. گروه‌های مکمل دوزهای ۱۰۰ mg/kg/day و ۲۰۰ ژل RJ را به صورت صفاقی برای ۸ هفته دریافت کردند. پروتکل RT فزاینده برای ۸ هفته، ۳ جلسه در هفته با شدتی متناظر با ۳۰-۱۰۰٪ وزن بدن انجام شد.

یافته‌ها: در مقایسه با گروه کنترل، پروتکل RT موجب افزایش بیان proNGF گردید. همچنین، ۱۰۰ RJ و ۲۰۰ RJ موجب افزایش معنی دار بیان proNGF و P۷۵ شد. بعلاوه، اثر تعاملی ۱۰۰ RJ + RT و ۲۰۰ RJ + RT موجب افزایش معنی دار بیان proNGF و P۷۵ شد. همچنین اثر RJ بر بیان proNGF و P۷۵ وابسته به دوز مصرفی بود و اثر دوز ۲۰۰ mg/kg نسبت به دوز ۱۰۰ mg/kg به طور معنی داری بیشتر بود.

نتیجه گیری: هر دو پروتکل RT و مصرف RJ به تنهایی و به طور سینرژیستی موجب افزایش بیان نوروتروفین در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به آلزایمر می‌گردد. اثرات RJ در حالت استفاده ترکیبی وابسته به دوز مصرفی است به گونه‌ای که دوزهای بالاتر اثرات بالاتری بر بیان نوروتروفین و گیرنده آن دارد. در حالت استفاده از تک دوز RJ دوز پایین‌تر مطلوب‌تر است.

مقدمه

بیماری آلزایمر (AD) از شایع‌ترین اختلالات تخریب کننده عصب (نورودژنراتیو) وابسته به سن است که در سالمندان و افراد بالای ۶۵ سال خطر بروز این بیماری دو برابر می‌شود (۱). پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ تقریباً ۴۴ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شوند (۲). در نوروپاتولوژی این بیماری عواملی متعددی چون ژنتیک، تغذیه و سبک زندگی اثر گذار است و عواملی چون افزایش آمیلوئیدبتا (Aβ)، جهش ژنتیکی در پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP)، تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی و هایپرفسفریلاسیون پروتئین تائو نقش دارند (۳). افزایش Aβ در فضای خارج سلولی منجر به افزایش پلاسمینوژن، فعال شدن پلاسمینوژن بافتی، نوروسرپین، ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP-۹) می‌شود که در ادامه موجب اختلال در عملکرد نوروتروفین‌ها می‌گردند (۴). پیش ساز Aβ و عامل رشد عصبی (NGF) در اتصال به گیرنده نوروتروفینی P75 با هم رقابت دارند به طوری که اتصال Aβ به این گیرنده آپوپتوز نورون القا می‌شود، همچنین متالوپروتئینازها با تخریب گیرنده‌های سطحی غشا مانند گیرنده تیروزین کیناز A (TrkA) موجب متوقف شدن مسیرهای بیولوژیک نورون می‌گردند (۴, ۵). NGF و پیش ساز آن، پیش ساز عامل رشد عصبی (proNGF)، به وضوح نقش‌های متعددی در هر دو هدف عصبی و غیر عصبی دارند که از طریق سه نوع گیرنده انجام می‌شود. مهم این که به نظر می‌رسد اینها به روشهای مختلف و با واکنشهای فنوتیپی متفاوت ظاهر می‌شوند. این تفاوتها هنگام مقایسه بافت‌های طبیعی و نئوپلاستیک حاد هستند. تحقیقات نشان داده است که NGF و ProNGF (و احتمالاً سایر فاکتورهای عصبی) نیز می‌توانند به طور مستقیم بر سلولهای تومور تأثیر بگذارند یا می‌توانند بر ترکیب و پاسخ سلولهای ریزی که بخش

Copyright © 2022 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مهمی از عامل زنده ماندن ما هستند، تأثیر بگذارند و فرآیندهای حساس به تومور را مانند آنژیوژنز (پاسخ ایمنی و درد) تحریک کنند (۵).

با توجه به نقش تغییر سبک زندگی در سلامت جسمی و روانی افراد به نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی منظم با مکانیسم افزایش نوروتروفین‌ها، بتا اندورفین‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو موجب بهبود عملکرد سیستم عصبی می‌گردند (۶). مطالعات نشان دادند که تمرینات استقامتی موجب افزایش بیان عامل رشد شبه انسولین ـ ۱ (IGF-1) و گلیکوژن هیپوکامپی (۷)، افزایش NGF و کاهش Aβ (۵) در موش‌های صحرایی مبتلا به AD گردید. همچنین تمرینات استقامتی با شدت متوسط و بالا (۱)، تمرینات مقاومتی (RT) (۸) اثر معنی‌داری بر سطوح سرمی عوامل نوروتروفیک دارند، اما در مطالعه‌ای گزارش شد تمرینات ورزشی کمتر از ۴ هفته اثر معنی‌داری بر سطوح NGF موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت و سالم نداشت (۹). همچنین تمرینات ترکیبی موجب کاهش غلظت NGF قشر مغز گردید (۱۰). تحقیقات نشان داده است اتصال ProNGF به گیرنده P75 باعث تولید مکانیسمی جهت رشد عصبی می‌شود و ProNGF، به وضوح نقش‌های متعددی دارد که از طریق گیرنده انجام می‌شود (۱۱). این امر proNGF را در نقش اصلی در تشخیص و مدیریت بسیاری از سرطان‌های پستان و پروستات قرار می‌دهد و تشخیص و مهار آن ممکن است از نظر بالینی مهم باشد (۱۲). اگرچه تمرینات ورزشی اثرات مطلوبی بر بهبود شرایط و کیفیت زندگی دارند، ولی تغذیه مناسب در کنار فعالیت‌های ورزشی همواره توسط کارشناسان تغذیه و ورزش پیشنهاد می‌شود. استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی به عنوان راهکاری غیر تهاجمی و جایگزین داروهای سنتتیک شناخته شده‌اند (۶). از این بین ژل رویال (RJ) به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده است که از غدد زیر فکی زنبور عسل کارگر ترشح می‌شود و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، محافظت نورونی، ضد دیابت، کاهنده کلسترول خون و بهبود بیماری‌های مرتبط با سن معرفی شده است (۱۳). همچنین ترکیبات فنولی، استروئیدی، فسفولیپیدی آن دارای فعالیت‌های بیولوژیکی در سیستم عصبی می‌باشد (۱۳). تأثیر تمرین قدرتی بر میزان حافظه و یادگیری فضایی در موش‌های آلزایمری شده با بتا آمیلوئید موجب بهبود حافظه و یادگیری فضایی در حیوانات آلزایمری می‌شود و از پیشرفت روند آسیب شناختی از بیماری آلزایمر جلوگیری می‌کند (۱۴). تمرینات ورزشی، بقاء سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهند و برقراری عملکردهای مغز را بعد از آسیب تسهیل می‌کنند (۱۵). با توجه به محدودیت اطلاعات، یافتن بهترین و موثرترین تمرین و دوز RJ در کنار فعالیت‌های ورزشی می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری به محققین حوزه تغذیه و فیزیولوژی ورزشی ارائه نماید. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر RT همراه با مصرف RJ بر سطوح بیان ژنی proNGF و گیرنده P۷۵ در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD انجام شد.

روش کار

حیوانات

در این کارآزمایی تجربی ۴۸ سر موش صحرایی نر، نژاد اسپراگ-داولی با میانگین سنی هشت هفته، و میانگین وزنی ۲۲۰±۲۰/۱۲ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری و به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی، نمونه‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو (شرکت رازی، ایران)، نگهداری شدند دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد و چرخه روشنایی ـ تاریکی نیز هر ۱۲ ساعت یکبار (شروع و پایان روشنایی به ترتیب ساعت ۷ و ۱۹ بود) به طور دقیق توسط تنظیم کننده الکترونیکی نور سالن تنظیم می‌شد و نمونه‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در روز هشتم، تعداد ۴۲ سر موش صحرایی با تزریق درون صفاقی ۸ mg/kg نوروتوکسین تری‌متیل‌تین (Sigma, Germany) قرار گرفتند (۱۶) که از طریق آزمون آبی موریس اثرات القا آلزایمر بررسی و تأیید گردید. موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری آلزایمر به طور تصادفی به ۷ گروه برابر کنترل، RT، مصرف RJ ۱۰۰ mg/kg (RJ100)، مصرف RJ ۲۰۰ mg/kg (RJ200)، RT + مصرف RJ ۱۰۰ mg/kg (RT+RJ100) + مصرف RJ ۲۰۰ mg/kg (RT+RJ200) و گروهشم (Sh) (مبتلا به بیماری آلزایمر و تزریق درون صفاقی حلال ژل رویال یا نرمال سالین جهت بررسی اثر القا استرس تزریق و حلال ژل رویال بر متغیرهای تحقیق) تقسیم شدند. بعلاوه، جهت بررسی اثرات تزریق تری‌متیل‌تین بر متغیرهای پژوهش تعداد ۸ سر موش صحرایی سالم در گروه کنترل سالم (HC)[۲] قرار گرفتند. گروه‌های دریافت کننده مکمل (تهیه شده از مرکز جهاد کشاورزی شهرستان مرودشت) به مدت هشت هفته روزانه دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ RJ حل شده در نرمال سالین را به صورت صفاقی دریافت نمودند (۱۷). گروه‌های تمرینی به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته تمرینات مقاومتی را با شدت ۳۰ تا ۱۰۰ درصد وزن بدن انجام دادند (۱۵). فرایند آزمایشگاهی مطالعه تجربی حاضر بر اساس دستورالعمل‌های استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی (اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی؛ نشر NIH، با شماره ۸۶ ـ ۲۳، تجدید نظر ۱۹۹۶) اجرا شد.

پروتکل RT

جهت آموزش تمرین مقاومتی به موش‌های صحرایی به مدت یک هفته و سه جلسه در هفته، هر یک از آنها روی پایین‌ترین پله نردبان قرار گرفته و بدون اتصال وزنه بالا رفتن از نردبان آموزش داده شد. برای وادار کردن موش‌های صحرایی به حرکت روی نردبان هنگام ایستادن روی یک پله نردبان و توقف از طریق لمس دم و ایجاد صدا به طور همزمان

استفاده شد. پروتکل تمرین مقاومتی شامل هشت هفته بالا رفتن از نردبانی به ارتفاع یک متر، فاصله بین هر دو پله چهار سانتی متر و شیب قائم انجام شد. قبل از شروع برنامه تمرینی در هر جلسه، موش‌ها چهار تکرار را بدون وزنه و بدون استراحت بین تکرارها به منظور گرم کردن از نردبان بالا می‌رفتند. وزنه انتخاب شده در شروع تمرین ۳۰ درصد وزن بدن موش‌های صحرایی در هفته اول بود و تا ۱۰۰ درصد وزن آن‌ها در هفته آخر افزایش داده شد. پروتکل تمرین به این صورت بود که در هرجلسه تمرین ابتدا موش‌های صحرایی چند تکرار بدون وزنه از نرده بان بالا می‌رفتند، پس از آن برای هر جلسه، تمرین در ۴ ست دو تکراری در نظر گرفته شد، بدین صورت که در ست اول موش‌های صحرایی وزنه‌ای معادل ۵۰ درصد وزنه در نظر گرفته شده برای آن هفته (بر اساس وزن موش‌های صحرایی) را در دو تکرار با فاصله ۳۰ تا ۴۰ ثانیه استراحت بین تکرارها، بالا می‌رفتند، در ادامه وزنه معادل ۷۵ درصد، ۹۰ و ۱۰۰ درصد وزنه در نظر گرفته شده برای آن هفته با دو تکرار بالا می‌رفتند (جدول ۱). در آخرین جلسه هر هفته تمرین، پس از انجام برنامه تمرینی آن جلسه و استراحت موش‌ها حداکثر وزنه‌ای که موش‌ها قادر به بالا بردن آن بودند مشخص می‌شد. به این صورت که به وزنه آخرین تکرار انجام شده آنان وزنه اضافه می‌شد و تا زمانی که موش‌ها قادر به بالا بردن وزنه نبودند ادامه می‌یافت (۱۵).

جدول ۱. طراحی تمرین در هشت هفته و جلسات تمرینی

هفته	شدت تمرین (درصد وزن بدن)	گرم کردن	فاصله استراحت بین تکرارها (ثانیه)	ست	فاصله استراحت بین ست‌ها (دقیقه)	سرد کردن
اول	۳۰	۴ تکرار بدون وزنه	۲۵	۴ ست دو تکراری	۱	۴ تکرار بدون وزنه
دوم	۴۰	۴ تکرار بدون وزنه	۲۵	۴ ست دو تکراری	۱	۴ تکرار بدون وزنه
سوم	۵۰	۴ تکرار بدون وزنه	۳۰	۴ ست دو تکراری	۱	۴ تکرار بدون وزنه
چهارم	۶۰	۴ تکرار بدون وزنه	۳۰	۴ ست دو تکراری	۱/۵	۴ تکرار بدون وزنه
پنجم	۷۰	۴ تکرار بدون وزنه	۳۵	۴ ست دو تکراری	۱/۵	۴ تکرار بدون وزنه
ششم	۸۰	۴ تکرار بدون وزنه	۳۵	۴ ست دو تکراری	۲	۴ تکرار بدون وزنه
هفتم	۹۰	۴ تکرار بدون وزنه	۴۰	۴ ست دو تکراری	۲	۴ تکرار بدون وزنه
هشتم	۱۰۰	۴ تکرار بدون وزنه	۴۰	۴ ست دو تکراری	۲	۴ تکرار بدون وزنه

جدول ۲. توالی پرایمرهای رونویسی

Genes /Primer Sequences	Sizes (bp)
Actin, Beta	
Forward: 5'-TCTATCCTGGCCTCACTGTC-3'	۱۲۲
Reverse: 5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	
Pro-NGF	
Forward: 5'- TTTGATCGGCGTACAGGCAG -3'	۸۴
Reverse: 5'- TGTACGGTTCTGCCTGTACG -3'	
NGF-R (P۷۵)	
Forward: 5'- CGACAACCTCATTCCTGTCTATT -3'	۱۱۷
Reverse: 5'- CTGTTGGCGCCTTGTTTATTT -3'	

بافت برداری و ارزیابی بیان ژن

به منظور جلوگیری از اثرات آخرین جلسه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و مصرف مکمل، تحت شرایط بیهوشی عمیق (تزریق صفاقی کتامین ۷۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن، زایلازین ۸ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) معدوم شدند. بعد از تشریح، مغز با سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و نهایتاً هیپوکامپ موش‌های صحرایی استخراج گردید. پس از شست و شو و توزین بافت مورد نظر به کرایوتیوب مخصوص نگهداری نمونه‌های بافتی منتقل و در دمای ۸۰- فریز شدند. پس از انکوبه کردن بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های مورد مطالعه آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید و پس از رقیق سازی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تخلیص RNA از نمونه‌های سلول و بافت، استخراج RNA انجام شد. این روش به واسطه حضور آنزیم‌های ریبونوکلئاز بسیار حساس و پیچیده است، به همین منظور قبل از شروع کار همه وسایل با محلول‌های خنثی کننده RNaseمانند محلول DEPC شستشو داده و تمامی مراحل با دستکش زیر هود انجام شد. در استخراج RNA از سلول و بافت از روش استخراج RNA فنل _ کلروفرم استفاده کردیم که در این روش، استخراج مایع-مایع بوده که برای خالص سازی اسیدهای نوکلئیک، حذف پروتئین‌ها و لیپیدها کاربرد دارد. بافت‌های هموژن، سلول‌های لیز شده و نمونه‌های محلول با حجم مساوی از فنل و کلروفرم ترکیب شده، پس از سانتریفیوژ دو فاز مجزای آبی و آلی شکل می‌گیرد. پروتئین و لیپیدهای هیدروفوب در فاز آلی پایینی قرار می‌گیرند و در فاز آبی (بالایی) اسیدهای نوکلئیک و سایر آلاینده‌ها مانند نمک، قند

و... قرار دارند. هنگام پیپت کردن و جداسازی فاز آبی باید نهایت دقت صورت گیرد تا از فاز آلی. کلروفرم در استخراجRNA به تنهایی می‌تواند ۱۰ تا ۱۵ درصد آب را حفظ کند و به دنبال آن RNA کاهش می‌یابد، اضافه کردن کلروفرم باعث اتصال متراکم آن با فنل شده و منجر به رهاسازی آب می‌شود. ترکیب کلروفرم با فنل روند تخریب پروتئین‌ها را شدت می‌بخشد و لیپید را حل می‌کند. برای تفکیک بهتر فاز آبی از آلی و جلوگیری از آلودگی آن با پروتئین وDNA ، بعد از اضافه کردن کلروفرم میکروتیوب را به مدت ۲۰ ثانیه به شدت تکان داده‌ایم. تا خصوصاً قسمت فوقانی آن که حاوی پروتئین است وارد فاز آبی نشود. در نهایت پس از بدست آمدن CT ها داده با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ محاسبه شدند. توالی پرایمرها جهت رونویسی از ژن‌ها در جدول۲ ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

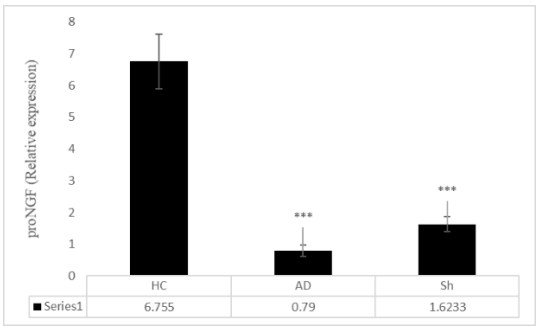
برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نسخه ۱۶ بسته آماری برای علوم اجتماعی (انستیتو SPSS، شیکاگو، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. در ابتدا، از آزمون شاپیرو ـ ویلک برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. جهت بررسی اثرات القای آلزایمر بر متغیرهای تحقیق و بررسی اثر تزریق و همچنین حلال ژل رویال بر متغیرهای تحقیق از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین جهت بررسی اثر تمرین و مصرف ژل رویال و اثر تعاملی آنها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد؛ جهت بررسی تفاوت بین دوزهای ژل رویال از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. درکلیه ارزیابی‌ها سطح معنی داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

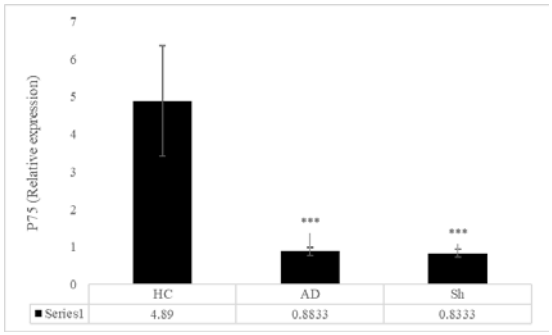
ابتدا جهت بررسی اثرات القا آلزایمر و همچنین حلال ژل رویال بر متغیرهای تحقیق نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی دار در گروه‌های تحقیق در سطوح بیان ژنی proNGF در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی وجود دارد (P=۰/۰۰۱). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد سطوح proNGF در گروه AD (P=۰/۰۰۱) و Sh (P=۰/۰۰۱) به طور معنی داری کمتر از گروه HC می‌باشد، همچنین در گروه AD به طور معنی داری پایین‌تر از گروه Sh بود (شکل ۱).

همچنین نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری در سطوح گیرنده p75 (P=۰/۰۰۱ و F=۳۲۹/۸۸) در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی وجود دارد سطوح p75 در گروه AD (P=۰/۰۰۱) و Sh (P=۰/۰۰۱) به طور معنی داری کمتر از گروه HC بود. همچنین تفاوت معنی داری در گروه AD و Sh وجود نداشت (P=۰/۷۵). سطوح P۷۵ در گروه AD (P =۰/۰۰۱) و گروه Sh (P=۰/۰۰۱) به طور معنی داری کمتر از گروه HC می‌باشد، همچنین تفاوت معنی داری در گروه‌های AD و Sh مشاهده نشد (P=۰/۹۹) (شکل ۲).

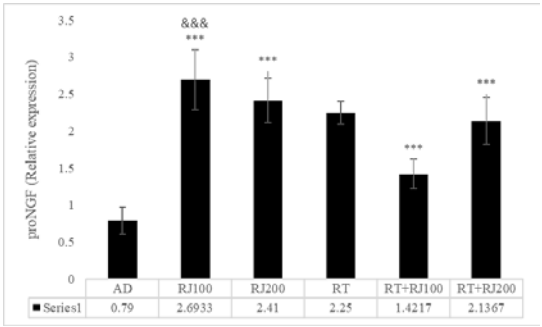
نتایج آزمون آنالیز واریانس دوطرفه بر سطوح proNGF در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD نشان داد RT (P=۰/۷۵، F=۰/۰۹۷ و اندازه اثر ۰/۰۰۳) اثر معنی داری بر تغییرات سطوح بیان ژنی proNGF در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD دارد؛ با این وجود مصرف ژل رویال (P=۰/۰۰۱، F=۲۴/۲۹ و اندازه اثر ۰/۶۱) اثر معنی داری بر سطوح proNGF در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی AD دارد؛ همچنین تعامل RT و RJ بر افزایش بیان proNGF معنی دار می‌باشد (P=۰/۰۰۱، F=۷۷/۱۰ و اندازه اثر ۰/۸۳).



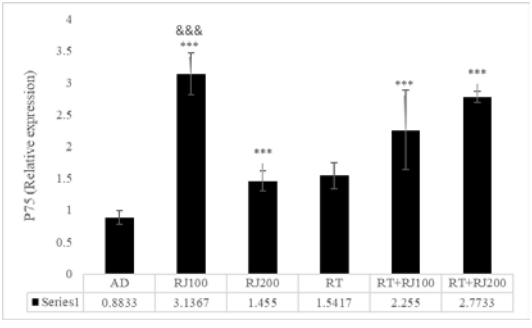
شکل ۱. سطوح بیان ژنی proNGF در گروه‌های HC، AD و Sh
*** (P=۰/۰۰۱) کاهش نسبت به گروه کنترل



شکل ۲. سطوح بیان ژنی گیرنده P۷۵ در گروه‌های HC، AD و Sh
*** (P=۰/۰۰۱) کاهش نسبت به گروه کنترل



شکل ۳. سطوح بیان ژنی pro NGF در موش‌های صحرایی مبتلا به AD
*** (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل مبتلا به AD
&&& (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی دار نسبت به گروه RT+RJ200



شکل ۴. سطوح بیان ژنی گیرنده P75 در موش‌های صحرایی مبتلا به AD
*** (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل مبتلا به AD
&&& (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی دار نسبت به گروه RJ200mg/kg

در ادامه نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد سطوح proNGF در گروه‌های RJ100 (P=۰/۰۰۱) و RJ200 (P=۰/۰۰۱) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین سطوح proNGF در گروه‌های RT+RJ100 (P=۰/۰۰۱) و RT+RJ200 (P=۰/۰۰۱) تفاوت معنی داری با هم دارند (P=۰/۰۶۲). همچنین سطوح proNGF در گروه 100 mg/kg با بیشترین اندازه (۲/۶۹) و پس از آن گروه 200 mg/kg دارای بیشترین اثر (۲/۴۱) بود. همچنین RT (۲/۲۵) نیز نسبت به RT+RJ200 (P=۰/۰۰۱) (۲/۱۳) و RT+RJ100 (P=۰/۰۰۱) (۱/۴۲) اثر بیشتری بر افزایش سطوح proNGF دارد (شکل ۳).

در مقایسه با گروه کنترل RT (P=۰/۰۰۱، F=۱۲/۵۲ و اندازه اثر ۰/۲۹) و RJ (P=۰/۰۰۱، F=۷۰/۰۲ و اندازه اثر ۰/۸۲) اثر معنی داری بر تغییرات سطوح بیان ژنی P75 دارد؛ همچنین تعامل RT و RJ در افزایش بیان هیپوکامپی P75 در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD معنی دار بود (P=۰/۰۰۱، F=۳۹/۹۴ و اندازه اثر ۰/۷۲). همچنین سطوح P75 در گروه‌های RJ100 (P=۰/۰۰۱) با بیشترین اندازه (۳/۱۳) و RT+RJ200 (P=۰/۰۰۱) (۲/۷۷) و RT+RJ100 (P=۰/۰۰۱) (۲/۲۵) به طور سینرژیستی موجب افزایش بیان ژنی P75 می‌گردند. همچنین سطوح P75 در گروه‌های RT به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۰۱). (شکل ۴).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد RT موجب افزایش بیان ژنی proNGF و گیرنده p75 در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD گردید. محققین بر این عقیده‌اند که تمرینات ورزشی به ویژه RT وابسته به شدت، مدت و نوع تمرین موجب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی نوروژنز، پلاستیسیته نورونی، تمایز نورونی، بهبود عملکرد سیناپس‌ها، دندریت‌ها تعدیل نوروترانسمیترها در سیستم عصبی کولینرژیک، دوپامینرژیک و گابائرژیک می‌گردند (۱۱). همچنین RT ترکیبی موجب فعال‌سازی پروتئین‌کینازها، افزایش رونویسی و سنتز پروتئین‌های متابولیکی و ساختاری مانند فاکتور تنفسی هسته‌ای (NRFs)، ترمیم اختصاصی کولینرژیک، افزایش بیان پیش‌ساز NGF (Pro-NGF) و گیرنده آن (p75) و همزمان افزایش TrkA می‌گردند (۱۲). همچنین RT با افزایش کاتکولامین‌ها، افزایش رگ‌زایی، افزایش جریان خون مغز، باعث فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK)، فسفوریلاسیون NRF-1/2 شده که منجر به افزایش رونویسی از نوروتروفین‌ها مانند BDNF، NGF و گیرنده‌های آنها می گردد (۱۳). در ارتباط با معنی‌دار بودن بیان گیرنده p75 همانگونه که اشاره گردید به نظر می‌رسد طول دوره تمرین در افزایش بیان این عوامل اثر گذار است، در مطالعات پیشین افزایش میزان بیان ژنی برخی از نوروتروفین ها در تمرینات بالای سه ماه اتفاق افتاده بود (۱۱). در ارتباط با اثر تمرینات ورزشی بر نوروتروفین‌ها مطالعاتی انجام شده است، همسو با مطالعه حاضر تمرینات استقامتی با شدت متوسط و بالا موجب افزایش سطوح سرمی (BDNF) موش‌های صحرایی دیابتی گردید (۱)؛ هشت هفته تمرینات استقامتی موجب افزایش NGF و کاهش Aβ (۵) در موش‌های صحرایی AD گردید؛ هشت هفته تمرین RT اثر معنی‌داری بر افزایش سطوح سرمی NGF، BDNF، NT3 و NT4 داشت (۸)، از سویی چهار هفته تمرینات ورزشی اثر معنی داری بر NGF موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت و سالم نداشت (۹). این مطالعه با مطالعه حاضر ناهمسو بود، به نظر می‌رسد تفاوت در طول دوره تمرین در ایجاد سازگاری مطلوب ناشی از تمرین از دلایل احتمالی تناقض در نتایج می‌باشد. همچنین تمرینات ترکیبی موجب کاهش غلظت NGF قشر مغز موش‌های صحرایی AD گردید (۱۰). به نظر می‌رسد تفاوت در نوع تمرین، تفاوت در شیوه اندازه‌گیری متغیرها از دلایل احتمالی تناقض در نتایج باشد همچنین ProNGF با اتصال به گیرنده P75 فعال شده و باعث تولید مکانیسمی جهت رشد عصبی می شود (۱۸). اما به نظر می‌رسد پروتکل تمرین حاضر با شدت مناسب و همچنین طول دوره مناسب موجب افزایش proNGF و گیرنده p75 در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی AD شده است.

نتایج نشان داد مصرف RJ با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ موجب افزایش بیان proNGF و p75 هیپوکامپی موش‌های صحرایی AD گردید. اثر دوز ۱۰۰ mg/kg بر افزایش proNGF مطلوب‌تر از ۲۰۰ mg/kg بود، اثر آنتی‌اکسیدانی RJ به خاطر پپتیدهای آنتی اکسیدانی، فنول‌های هیدروکسیل و ۱۰-هیدروکسی-۲-دسنوئیک - اسید ترانس (10-HDA) است که منجر به افزایش بیان ژنی Dnmt3، افزایش آنزیم‌های DNA متیل ترانسفراز، مهار استرس اکسیداتیو، کاهش رونویسی از ژن پرسینیلین-۱ و ۲، اینترلوکین-۱ بتا، عامل نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α)، کاهش مالون دی آلدئید (MDA)، افزایش سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، بهبود عملکرد بیولوژیکی سلول، نورون‌زایی، بهبود عملکرد شناختی و بهبود عملکرد بیولوژیکی نورون می‌شود (۱۳). اما اثرات مطلوب RJ بر سیستم عصبی مرکزی به دوز مصرفی و طول دوره مصرف وابسته است، به گونه‌ای که ۱۴ روز مصرف RJ با دوز ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ موجب کاهش Aβ و AMPK در مدل حیوانی مبتلا به AD گردید همچنین دوز بالاتر اثرات مطلوب‌تری داشت (۲). مصرف RJ با دوز ۲۰۰ mg/kg موجب کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود حافظه و یادگیری و فعال‌شدن عوامل نوروژنز در موش‌های صحرایی AD گردید (۳)؛ همچنین مصرف RJ با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت هشت هفته موجب کاهش سطوح بیان ژنی Aβ و گاماسکرتاز موش‌های صحرایی AD گردید (۱۹).

نتایج نشان داد RT همراه با RJ اثر تعاملی بر افزایش بیان ژنی proNGF و گیرنده p75 در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی AD داشت، این اثر وابسته به دوز بود و RT با مصرف ۲۰۰ mg/kg بر افزایش بیان ژنی NGF pro و P75 نسبت به RT و مصرف mg/kg ۱۰۰ مطلوب‌تر بود. تمرینات ورزشی منجر به افزایش نوروژنز، پلاستیسیته نورونی، تمایز نورونی، بهبود عملکرد سیناپس‌ها، دندریت‌ها و نوروتروفین‌ها (۱۱)، افزایش آنتی اکسیدان‌ها و فعال‌سازی پروتئین‌کینازها موجب افزایش رگ زایی و افزایش جریان خون مغز، افزایش AMPK، فسفوریلاسیون NRF-1/2 و افزایش رونویسی BDNF و NGF می‌شود (۱۳). RJ با اثرات آنتی اکسیدانی، مهار استرس اکسیداتیو، نورون‌زایی. افزایش آنزیم‌های DNA متیل‌ترانسفراز، کاهش التهاب، کاهش Aβ و گاماسکرتاز (۱۹) منجر به

افزایش نوروتروفین‌ها می‌گردد. با توجه به مطلوب بودن اثرات تعاملی RT و RJ به ویژه دوز بالاتر به نظر می‌رسد مکانیسم‌های مشابه این دو مداخله به طور سینرژیستی موجب افزایش بیان نوروتروفین‌ها و گیرنده‌های آن در سیستم عصبی مرکزی می‌گردند. در حمایت از یافته مطالعه حاضر تمرین استقامتی در شیب مثبت و شیب منفی همراه با RJ دارای اثرات تعاملی در کاهش Aβ و گاماسکرتاز (۱۹) و افزایش بیان دوپامین (۲۰) در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به AD بود. از سویی اثرات نوروتروفینی تمرین وابسته به نوع، شدت و طول دوره تمرین می‌باشد و ناهمسو با مطالعه حاضر تعامل تمرین اختیاری و اجباری همراه با RJ بر افزایش BDNF و NGF هیپوکامپی موش‌های صحرایی AD معنی‌دار نبود (۲۱). پیش از این به خوبی نقش فعالیت‌های ورزشی در عملکرد مغز همچون تقویت حافظه و بهبود یادگیری مشخص شده است؛ و مطالعات عنوان کرده‌اند اثرات مفید انجام فعالیت ورزشی بر عملکرد مغز تا حدی به واسطه تقویت عملکرد و افزایش سطح نوروتروفین ها به خصوص proNGF است (۲۲).

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد RT و RJ هم به تنهایی و هم به طور سینرژیستی موجب افزایش نوروتروفین‌های هیپوکامپ در موش‌های صحرایی مبتلا به AD می‌گردد، همچنین اثرات RJ در ترکیب با تمرین وابسته به دوز بوده و دوزهای بالاتر اثرات مطلوب‌تری بر بیان نوروتروفین‌ها و گیرنده آنها دارد.

با توجه به نقش آنتی اکسیدانی RJ و تمرین به نظر می‌رسد عدم اندازه‌گیری سطوح استرس‌اکسیداتیو در مطالعه حاضر از محدودیت‌های مطالعه حاضر باشد، از این‌رو پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی سطوح آنتی اکسیدان-استرس‌اکسیداتیو بافت هیپوکامپ نیز بررسی گردد. با توجه به نقش تمرینات ورزشی و مصرف RJ در نورون‌زایی به نظر می رسد عدم بررسی میکروسکوپی و نشانگرهای فیزیولوژیکی مانند نیتریک اکساید، BDNF، AMPK از محدودیت‌های این مطالعه باشد پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی ابعاد پاتولوژی و فیزیولوژی بیشتری مورد ارزیابی قرار گیرند.

References

1. Salehi OR, Hoseini A, Shefaye Khatam. The Effects of Endurance Trainings on Serum BDNF and Insulin Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Shefaye Khatam*. 2017;**5**(2):52-61. **DOI:** 10.18869/acadpub.shefa.5.2.52
2. Pan Y, Xu J, Chen C, Chen F, Jin P, Zhu K, et al. Royal Jelly Reduces Cholesterol Levels, Ameliorates Abeta Pathology and Enhances Neuronal Metabolic Activities in a Rabbit Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;**10**:50. **DOI:** 10.3389/fnagi.2018.00050 **PMID:** 29556189
3. Guardia de Souza EST, do Val de Paulo MEF, da Silva JRM, da Silva Alves A, Britto LRG, Xavier GF, et al. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon*. 2020;**6**(2):e03281. **DOI:** 10.1016/j.heliyon.2020.e03281 **PMID:** 32055729
4. Mufson EJ, Counts SE, Ginsberg SD, Mahady L, Perez SE, Massa SM, et al. Nerve Growth Factor Pathobiology During the Progression of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019;**13**:533. **DOI:** 10.3389/fnins.2019.00533 **PMID:** 31312116
5. 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 Univ Med Sci*. 2018;**20**(11):56-66.
6. Hosseini SA, Salehi OR, Farzanegi P, Farkhaie F, Darvishpour AR, Roozegar S. Interactive Effects of Endurance Training and Royal Jelly Consumption on Motor Balance and Pain Threshold in Animal Model of the Alzheimer Disease. *Arch Neurosci*. 2020;**7**(2):e91857. **DOI:** 10.5812/ans.91857
7. Negarandeh Z, Mohamadzadeh Salamat K, Hosseini SA, Etemad Z. The effect of endurance training with crocin consumption on IGF-1 and glycogen expression in rat hippocampus tissue of trimethyltin-treated model of Alzheimer's disease. *Asia J Sports Med*. 2019;**10**(3):e92246. **DOI:** 10.5812/asjsm.92246
8. Jafarzadeh G, Shakeryan S, Farbood Y, Ghanbarzadeh M. Effect of one session of resistance exercises on expression of bdnf gene and trkb receptor in alzheimer model male wistar rats. *J Fasa Univ Med Sci*. 2019;**8**(4):1167-1176.
9. Omidi M, Ghanbarzadeh M, Nikbakht M, Habibi A, Ranjbar R. Effect of continuous aerobic exercise on nerve growth factor in diabetic rats. *Health Scope*. 2018;**9**(1):e85567. **DOI:** 10.5812/jhealthscope.85567
10. Ozbeyli D, Sari G, Ozkan N, Karademir B, Yuksel M, Cilingir Kaya OT, et al. Protective effects of different exercise modalities in an Alzheimer's disease-like model. *Behav Brain Res*. 2017;**328**:159-177. **DOI:** 10.1016/j.bbr.2017.03.044 **PMID:** 28390878
11. Lippi G, Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F. Updated overview on interplay between physical exercise, neurotrophins, and cognitive function in humans. *J Sport Health Sci*. 2020;**9**(1):74-81. **DOI:** 10.1016/j.jshs.2019.07.012 **PMID:** 31921482
12. Hall JM, Gomez-Pinilla F, Savage LM. Nerve Growth Factor Is Responsible for Exercise-Induced Recovery of Septohippocampal Cholinergic Structure and Function. *Front Neurosci*. 2018;**12**:773. **DOI:** 10.3389/fnins.2018.00773 **PMID:** 30443202
13. Ali AM, Kunugi H. Royal Jelly as an Intelligent Anti-Aging Agent-A Focus on Cognitive Aging and Alzheimer's Disease: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2020;**9**(10). **DOI:** 10.3390/antiox9100937 **PMID:** 33003559
14. Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian AA. Effect of Royal Jelly on spatial learning and memory in rat model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. *Adv Biomed Res*. 2012;**1**:26. **DOI:** 10.4103/2277-9175.98150 **PMID:** 23210085
15. Dehghan F, Hajiaghaalipour F, Yusof A, Muniandy S, Hosseini SA, Heydari S, et al. Saffron with resistance exercise improves diabetic parameters through the GLUT4/AMPK pathway in-vitro and in-vivo. *Sci Rep*. 2016;**6**:25139. **DOI:** 10.1038/srep25139 **PMID:** 27122001
16. Salehi OR, Hoseini A. The effects of endurance trainings on serum bdnf and insulin levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shefaye Khatam*. 2017;**5**(2):52-61. **DOI:** 10.18869/acadpub.shefa.5.2.52
17. Arzi A, Houshmand G, Goudarzi M, Khadem Haghighian H, Rashidi Nooshabadi M. Comparison of the analgesic effects of royal jelly with morphine and aspirin in rats using the formalin. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;**17**(2):50-56.
18. Jiang G, Wang C, Zhang J, Liu H. Mediation of insulin growth factor-1 in Alzheimer's disease and the mechanism of PRNP genetic expression and the PI3K/Akt signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017;**13**(6):2763-2766. **DOI:** 10.3892/etm.2017.4320 **PMID:** 28587338
19. Giti Z, Banaeifar A, Arshadi S, Azarbayjani MA. Effect of eight weeks of positive slope and negative slope training, along with royal jelly on the hippocampal expression of β-amyloid and γ-secretase in trimethyltin-induced alzheimer's disease rats. *J Nutrit Fast Health*. 2020;**9**(1):29-34.
20. Hassanlouei F, Hoseini SA, Tabrizi LB, Rasouli MH. The effect of endurance training with royal jelly consumption on dopamine

in the hippocampus tissue of rats with Alzheimer's disease. *Food Health*. 2020;**3**(1):6-10.

21. Dehbozorgi A, Behbudi Tabrizi L, Hosseini SA, Haj Rasoli M. Effects of swimming training and royal jelly on BDNF and NGF gene expression in hippocampus tissue of rats with Alzheimer's disease. *Zahedan J Res Med Sci*. 2020;**22**(2):e98310. **DOI:** 10.5812/zjrms.98310

22. Bozorgi AD, AliHosseini S, Rasoli MH. Effect of voluntary and forced training with royal jelly consumption on learning and spatial memory of rat model of alzheimer's disease. *Jundishapur J Chronic Disease Care*. 2020;**9**(1):e97261. **DOI:** 10.5812/jjcdc.97261