

The effect of aerobic training and niacin supplementation on spatial memory and serum levels of microRNAs associated with Alzheimer's disease in Alzheimer's model rats

Mohammad Mohammadi shams hajian¹, Asghar Tofighi^{2*}, Zahra Niknam³, Leila Chodari⁴

1. M.Sc. in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran.
2. Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor in Applied Proteomics, Neurophysiology Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
4. Associate Professor at Department of Physiology, School of Medicine, Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

***Corresponding Author Address:** Exercise Physiology Department, University of Urmia, Email: a.tofighi@urmia.ac.ir

Aim and Background: Alzheimer's disease is one of the most common causes of cognitive decline, characterized by memory impairment and the accumulation of beta-amyloid and tau plaques (1). In recent years, blood and cerebrospinal fluid biomarkers have been used for early diagnosis (2). Among them, circulating microRNAs have been proposed as potential regulators of gene expression and markers (3) that play a role in the processes of inflammation, apoptosis, and autophagy (4). In Alzheimer's disease, miR-29a, miR-29c, miR-9a, and miR-146a are associated with the pathways of amyloidogenesis, oxidative stress, and neuroinflammation, such that miR-29a and miR-29c reduce amyloid-beta production by inhibiting BACE1 (7,8), and miR-146a is involved in the proinflammatory pathway of nuclear factor kappa light chain enhancer (NF- κ B) (9,10). Aerobic exercise and niacin, as non-pharmacological interventions, can also exert neuroprotective effects through regulation of microRNAs and increased nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (11–14,18–20). However, the simultaneous interaction of these two interventions has been less studied, so the aim of the present study was to investigate the effect of exercise and niacin on spatial memory and serum microRNAs in an Alzheimer's model. **Materials and Methods:** Thirty male Wistar rats (250–300 g) were obtained from the Laboratory Animal Center of Urmia University of Medical Sciences and maintained according to ethical principles (IR.UMSU.AEC.1402.032). The animals were placed under standard temperature conditions of $23\pm1^{\circ}\text{C}$, 12:12 h light cycle, and standard diet and were divided into five groups including sham, Alzheimer, niacin, exercise, and combination. The Alzheimer model was induced by intraventricular injection of streptozotocin (3 mg/kg body weight) under ketamine and xylazine anesthesia and with stereotaxic guidance based on the Paxinus atlas. The injection was performed in the lateral ventricles. Aerobic exercise on a treadmill at a speed of 17 m/min was performed six days a week for 30 days, and the exercise time was gradually increased from 10 to 60 minutes (22). Niacin was administered at a dose of 100 mg/kg body weight daily for 30 days (23). Spatial memory was assessed with the Morris Blue Test during the familiarization, learning, and probe phases. Spatial memory variables including time to reach the hidden platform, time spent in the target quadrant, and number of crossings were recorded (24). 48 hours after the intervention, blood sampling was performed under deep anesthesia and serum was separated. RNA extraction was performed with Trizol and cel-miR-39 was used as an internal control. The expression of miR-29a, miR-29c, miR-9a, and miR-146a was measured by Real-Time PCR. Statistical analysis of data was performed with one-way ANOVA and Tukey tests at a significance level of $p \leq 0.05$ (25, 26). The results were analyzed to investigate the effect of training and niacin on memory and microRNAs. **Findings:** The results of one-way analysis of variance in the time to reach the hidden platform showed that there was a significant difference between the groups ($p=0.001$). Tukey's post hoc test showed that the Alzheimer's group had more time than the control group on all days (days 1 to 4: $p=0.003$, $p=0.011$, $p=0.03$, $p=0.008$). In contrast, the niacin (days 1 and 4: $p=0.01$, $p=0.008$), exercise (days 2 to 4: $p=0.03$, $p=0.04$, $p=0.01$) and the combination of exercise and niacin (days 1 to 4: $p=0.03$,

$p=0.008$, $p=0.02$, $p=0.01$) groups showed a significant decrease in this index. A significant difference was also observed between the groups in the time spent in the target quadrant ($p=0.002$). The Alzheimer's group had a significant decrease compared to the control ($p=0.03$), while niacin did not differ significantly from Alzheimer's ($p=0.75$), but exercise ($p=0.001$) and the combination of exercise and niacin ($p=0.010$) caused a significant increase in this index. A significant difference was also observed in the number of crossings of the hidden platform ($p=0.002$). The Alzheimer's group showed a significant decrease compared to the control ($p=0.002$), in contrast to niacin ($p=0.03$), exercise ($p=0.009$) and the combination ($p=0.02$) had a significant increase, without any difference between the treatment groups ($p>0.05$). A significant difference was also observed between the groups in the latency of the first crossing of the platform ($p=0.001$), and the Alzheimer's group had the greatest delay ($p=0.001$). All niacin, exercise, and combination groups significantly decreased this index (all $p=0.001$) without any difference between the treatment groups ($p>0.05$). In the molecular part, analysis of variance showed that the expression of miR-29a, miR-9a, miR-29c, and miR-146a was significantly different between the groups ($p=0.001$). In miR-29a, all three niacin ($p=0.001$), exercise ($p=0.04$), and combination ($p=0.03$) groups had a significant increase compared to Alzheimer's, and niacin was higher than exercise ($p=0.002$) and combination ($p=0.001$). In miR-9a, only the combination group showed a significant increase ($p=0.001$) and was also higher than exercise ($p=0.01$) and niacin ($p=0.006$). In miR-29c, all three interventions showed a significant increase (niacin $p=0.01$, exercise $p=0.001$, combination $p=0.001$) and the combination was higher than the other groups. In miR-146a, all three interventions showed a significant decrease (niacin $p=0.001$, exercise $p=0.01$, combination $p=0.001$) and niacin and combination had a greater decrease than exercise ($p=0.01$, $p=0.03$).

Conclusion: In this study, the alone and combined effects of aerobic treadmill training and niacin supplementation on spatial memory and serum expression of Alzheimer's-related microRNAs in Alzheimer's rats were investigated. All three interventions significantly improved spatial memory variables compared to the Alzheimer's group, but no significant difference was observed between the intervention groups. At the molecular level, all three interventions significantly increased the expression of miR-29a, miR-29c, miR-9a and significantly decreased miR-146a compared to the Alzheimer's group. However, the combined group showed significant superiority over the individual interventions in most microRNAs, especially miR-9a and miR-29c and decreased miR-146a. It seems that the combination of aerobic training and niacin can have systemic neuroprotective effects through simultaneous modulation of molecular pathways; However, since measurements were made at serum levels and direct brain tissue markers were not measured in this study, further studies are needed.

Keywords: Alzheimer's disease, aerobic training, niacin, spatial memory, microRNA

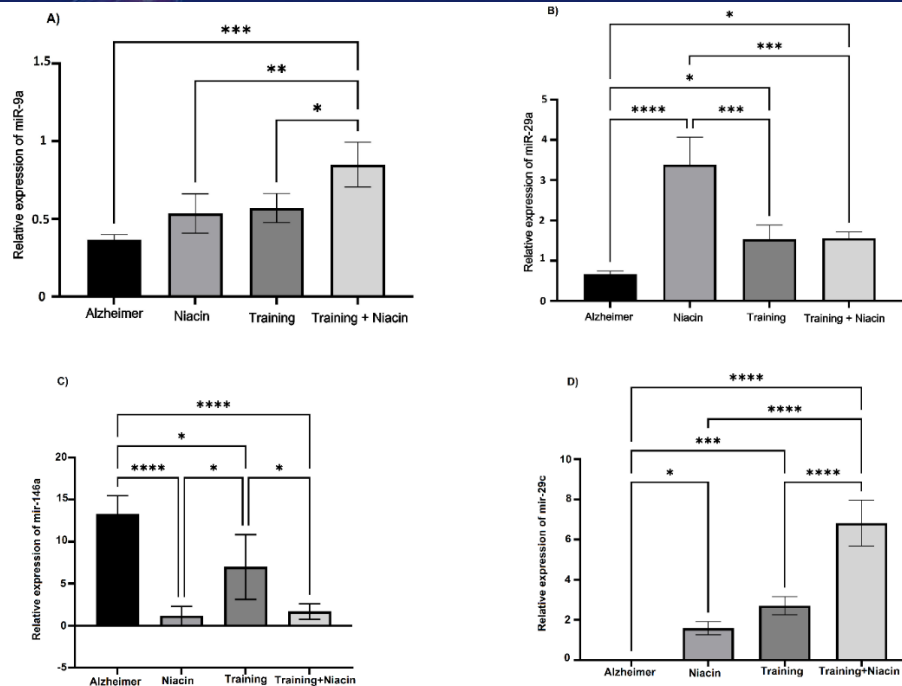


Figure 1. Results of microRNA expression between study groups. A) miR-29a expression.* Indicates significant difference compared to Alzheimer's group *** Indicates significant difference compared to niacin group B) miR-9a expression.* Indicates significant difference compared to exercise group ** Indicates significant difference compared to niacin *** Indicates significant difference compared to Alzheimer's group C) miR-29c expression.* Indicates significant difference compared to niacin group *** Indicates significant difference compared to exercise **** Indicates significant difference compared to combined exercise and niacin group D) miR-146a expression.* Indicates significant difference compared to exercise group, **** Indicates significant difference compared to Alzheimer's group. Significance level $p < 0.05$. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Ethical Considerations: This study was approved by the Ethics Committee of Urmia University of Medical Sciences under the code IR.UMSU.AEC.1402.032. The research was conducted using the minimum required number of rats and under optimized laboratory animal conditions, including a 12:12 h light–dark cycle, relative humidity of $50\% \pm 3\%$, and temperature maintained at 23°C with a variation of $\pm 1^\circ\text{C}$. Non-invasive and low-pain procedures were used for animal stimulation to minimize discomfort. All researchers had completed mandatory training courses on animal handling and ethical principles.

Compliance with ethical guideline: Alternative methods to animal experimentation were considered whenever feasible, and laboratory procedures were designed to minimize pain and suffering.

Funding: The costs of purchasing the animals (rats) and the supplement were provided by Urmia University of Medical Sciences, while the costs of the experimental analyses were covered by the authors.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest pertaining to this research.



تأثیر تمرین هوازی و مکمل دهی نیاسین بر حافظه فضایی و میزان سرمی میکروRNAهای مرتبط با بیماری آلزایمر در رت‌های مدل آلزایمری

محمد محمدی شمس حاجیان^۱، اصغر توفیقی^{۲*}، زهرا نیکنام^۳، لیلا چوداری^۴

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳. استادیار پروتئومیکس کاربردی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۴. دانشیار گروه فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و حیوانات آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: دکتر اصغر توفیقی، استاد فیزیولوژی ورزشی دانشگاه ارومیه. ایمیل: a.tofiqhi@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آلزایمر یکی از شایع‌ترین اختلالات تخریب عصبی با افت عملکرد شناختی و حافظه است. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و مکمل نیاسین بر حافظه فضایی و میزان سرمی میکروRNAهای مرتبط با آلزایمر در رت‌های مدل آلزایمری بود. **روش تحقیق:** ۳۰ سر رت نر به‌طور تصادفی در پنج گروه شم، آلزایمری، نیاسین، تمرین و ترکیبی تقسیم شدند. القای آلزایمر از طریق تزریق درون‌بطنی استرپتوزوتوسین با دوز سه میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در هر بطن انجام شد. مداخلات به مدت چهار هفته شامل شش روز در هفته تمرین هوازی روی نوارگردان با سرعت ۱۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه و تجویز نیاسین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اجرا شد. حافظه فضایی با آزمون ماز آبی موریس و بیان miR-9a، miR-29c، miR-29a و miR-146a با روش Real-Time PCR سنجیده شد. تحلیل داده‌ها با آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌راهه و توکی در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ انجام گرفت. **یافته‌ها:** هر سه گروه مداخله کاهش معنی‌داری در زمان رسیدن به سکو نسبت به گروه آلزایمری در روزهای اول تا چهارم داشتند ($p \leq 0.05$). گروه‌های تمرین ($p = 0.001$) و ترکیبی ($p = 0.010$) افزایش معنی‌داری در زمان حضور در ربع هدف و گروه‌های نیاسین ($p = 0.038$)، تمرین ($p = 0.009$) و ترکیبی ($p = 0.024$) افزایش معنی‌داری در تعداد عبور و هر سه گروه مداخله کاهش معنی‌داری در تأخیر اولین عبور نسبت به گروه آلزایمری داشتند ($p = 0.001$). در حالی‌که بین گروه‌های مداخله تفاوت معنی‌داری در متغیرهای حافظه فضایی مشاهده نشد ($p > 0.05$). هر سه گروه مداخله افزایش معنی‌داری در بیان miR-29c و miR-9a و کاهش معنی‌داری در miR-146a نسبت به گروه آلزایمری داشتند ($p < 0.05$). گروه ترکیبی افزایش معنی‌داری در miR-29c و miR-9a نسبت به دو گروه تمرین (مقادیر p به ترتیب ۰/۰۱۴ و ۰/۰۰۱) و نیاسین (مقادیر p به ترتیب ۰/۰۰۶ و ۰/۰۰۱) داشت. گروه نیاسین و ترکیبی کاهش معنی‌داری در miR-146 نسبت به گروه تمرین داشتند (مقادیر p به ترتیب ۰/۰۱۹ و ۰/۰۳۴). گروه نیاسین افزایش معنی‌داری در miR-29a نسبت به گروه تمرین و ترکیبی داشت (مقادیر p به ترتیب ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی، مکمل‌دهی نیاسین و ترکیبی می‌تواند اثربخشی برابری در بهبود حافظه فضایی در رت‌های آلزایمری داشته باشد. با این حال، به نظر می‌رسد نتایج مداخله ترکیبی در تعدیل میکروRNAها پررنگ‌تر از مداخلات به تنهایی باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری آلزایمر، تمرین هوازی، نیاسین، حافظه فضایی، میکروRNA

مقدمه

بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین علل زوال شناختی در سالمندی محسوب می‌شود که با اختلال پیشرونده در حافظه، یادگیری و عملکردهای شناختی همراه است. از نظر پاتولوژیک، این بیماری با تجمع پلاک‌های خارج سلولی حاوی بتا-آمیلوئید و تشکیل گره‌های نوروفیبریلی درون سلولی متشکل از پروتئین تاو^۱ مشخص می‌شود (۱). در سال‌های اخیر، برخی پژوهش‌ها تمرکز خود را از دیدگاه بررسی در سطح بافتی به سمت نشانگرهای زیستی تغییر داده‌اند، به گونه‌ای که شناسایی نشانگرهای خونی و مایع مغزی نخاعی می‌تواند در تشخیص زودهنگام، پیش‌بینی روند بیماری و ارزیابی مداخلات درمانی نقش کلیدی ایفا کند (۲). در این میان، میکروRNAها^۲ در گردش خون به عنوان تنظیم‌کننده‌های پس‌سنتزی بیان ژن، به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه در تشخیص و پیش‌بینی بیماری آلزایمر مطرح شده‌اند (۳). میکروRNAها گروهی از RNAهای تک‌ رشته‌ای غیرکدکننده نوکلئوتید هستند که از طریق اتصال به ناحیه غیرقابل ترجمه در RNAهای پیام‌رسان (mRNA)^۳ هدف، بیان ژن را از طریق مهار ترجمه یا تخریب mRNA تنظیم می‌کنند و در فرآیندهای حیاتی سلولی مانند التهاب، تکثیر، آپوپتوز، مهاجرت و اتوفاجی^۴ نقش دارند (۴). اختلال در الگوهای بیان میکروRNAها در بسیاری از بیماری‌های تخریب عصبی از جمله بیماری آلزایمر مشاهده شده است که نشان‌دهنده نقش تنظیمی آن‌ها در پاتولوژی عصبی است. میکروRNAها در انواع مایعات زیستی از جمله سرم، پلاسما و مایع مغزی نخاعی حضور دارند و به دلیل پایداری بالا، به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه در بیماری‌های مختلف مطرح شده‌اند (۵). در بیماری آلزایمر، مجموعه‌ای از میکروRNAها شامل miR-29a، miR-29c، miR-9a و miR-146a در ارتباط با فرآیندهای پاتولوژیک بیماری گزارش شده‌اند و با مراحل مختلف پیشرفت بیماری در ارتباط هستند (۶). دلیل انتخاب miR-29a، miR-29c، miR-9a و miR-146a در این مطالعه نقش محوری آنها در تنظیم مسیرهای آمیلوئید-بتا از طریق بیان آنزیم برش‌دهنده پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید جایگاه بتا ۱ (BACE1)^۵، استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی است. دو عامل miR-29a و miR-29c از طریق هدف قرار دادن آنزیم بتا-سکرتاز^۶ موجب کاهش تولید آمیلوئید-بتا می‌شوند

1. Tau

2. MicroRNAs

3. Messenger RNA

4. Autophagy

5. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme

6. Beta-secretase enzyme



(۷،۸). miR-9a در تنظیم استرس اکسیداتیو میتوکندریایی نقش دارد و miR-146a عامل تنظیم مسیر پیش التهابی فاکتور هسته‌ای تقویت کننده زنجیره سبک کاپا (NF-KB)^۱ است و افزایش آن با تشدید التهاب عصبی و پیشرفت پاتولوژی آلزایمر مرتبط است (۹،۱۰).

اخیراً روش‌های دارویی و غیر دارویی مختلفی برای کاهش علائم آلزایمری مورد مطالعه قرار گرفته است. تمرینات هوازی مداوم با شدت متوسط به عنوان یک مداخله غیردارویی مؤثر در بهبود عملکرد شناختی و کاهش روند تخریب عصبی مورد توجه قرار گرفته است. شواهد نشان می‌دهد که فعالیت بدنی منظم می‌تواند موجب بهبود عملکرد شناختی، افزایش ذخیره شناختی و کاهش آتروفی مغزی مرتبط با سن و بیماری شود (۱۱،۱۲). همچنین، ورزش از طریق کاهش سطوح سایتوکین‌های التهابی نظیر اینترلوکین ۱ بتا (IL-1β)، اینترلوکین-۶ (IL-6)^۳ و فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا (TNF-α)^۴ می‌تواند التهاب عصبی را در بیماران مبتلا به آلزایمر کاهش دهد (۱۳). علاوه بر اثرات عملکردی، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ورزش می‌تواند بیان میکروRNAهای در گردش را نیز تغییر دهد و از این طریق در تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با بیماری نقش داشته باشد (۱۴). این یافته‌ها نشان می‌دهند که اثرات محافظتی ورزش ممکن است از طریق مکانیسم‌های اپیژنتیکی و تنظیم میکروRNAها نیز اعمال شود. مطالعات قبلی تاثیر تمرینات هوازی را بر برخی میکروRNAها نشان دادند به طوری که تمرینات ورزشی هوازی از طریق تعدیل بیان میکروRNAهای کلیدی، نقش محافظتی مهمی در برابر پاتولوژی آلزایمر ایفا می‌کنند. دانگن و دیگران نشان دادند تمرین ورزشی در موش‌های تراریخته سه‌گانه آلزایمری (3xTg-AD)^۵ از طریق افزایش بیان ژن دایسر^۶ در هیپوکامپ، سطح miR-29 را افزایش داده و در نتیجه BACE1 و سطح آمیلوئید-بتای محلول را به طور معنی داری کاهش می‌دهد (۱۵). لی^۷ و دیگران گزارش کردند که تمرین ورزش در مدل موشی و بیماران آلزایمر موجب افزایش معنی دار بیان miR-129-5p می‌شود که این تغییر با بهبود عملکرد شناختی و کاهش سطح سایتوکین‌های پیش التهابی همراه بود و حذف این میکروRNA اثرات محافظتی ورزش را از بین برد (۱۶). در یک مقاله مروری، وانگ^۸ و دیگران نتیجه گرفتند که تمرینات ورزشی از طریق تعدیل همزمان میکروRNAهای در گردش و محور روده-مغز، موجب کاهش بار آمیلوئید-بتا، مهار هایپرفسفریلاسیون تاو و تقویت عصبزایی می‌شود و این فرآیند یک چارچوب جامع برای محافظت عصبی غیردارویی در آلزایمر فراهم می‌کند (۱۷).

استفاده از مکمل‌های غذایی به عنوان راهکار دیگری در کنترل بیماری آلزایمر است که ویتامین B3 یا نیاسین^۹ یکی از مکمل‌هاست. این ویتامین شامل سه فرم اصلی اسید نیکوتینیک^{۱۰} (نیاسین)، نیکوتین آمید^{۱۱} و نیکوتین آمید ریبوزید^{۱۲} است که همگی پیش‌سازهای ضروری برای سنتز نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید^{۱۳} (NAD⁺) محسوب می‌شوند. انسان قادر به سنتز درون‌زاد این ویتامین نبوده و دریافت آن وابسته به منابع غذایی است (۱۸). نیاسین از طریق مسیرهای متابولیکی مختلف در بدن به NAD⁺ تبدیل شده و در فرآیندهای زیستی متعددی از جمله تنظیم ایمنی، متابولیسم لیپیدها و پاسخ‌های التهابی نقش دارد. نیاسین در تنظیم عملکرد

1. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B

2. Interleukin 1 beta

3. Interleukin-6

4. Tumor necrosis factor

5. Triple-transgenic mice Alzheimer's disease

6. Dicer

7. Li

8. Wang

9. Niacin

10. Nicotinic acid

11. Nicotinamide

12. Nicotinamide riboside

13. Nicotinamide adenine dinucleotide



ماکروفاژها و پاکسازی بقایای لیپیدی در سیستم عصبی مرکزی نقش دارد و از این طریق در کاهش پاتولوژی‌های تخریب عصبی مؤثر است (۱۹). در آلزایمر، کاهش سطح NAD^+ با افزایش سن و اختلال در مسیرهای متابولیکی همراه است. نورون‌ها به دلیل نیاز بالای انرژی وابستگی شدیدی به متابولیسم NAD^+ دارند و افزایش دسترسی به پیش‌سازهای آن می‌تواند از آسیب نورونی جلوگیری کند (۲۰). با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در شناخت نقش میکروRNAها به‌عنوان نشانگرهای زیستی و همچنین اثبات اثرات مفید مداخلات غیردارویی مانند ورزش و نیاسین در بهبود عملکرد شناختی، هنوز یک شکاف دانشی مهم در درک تعامل و هم‌افزایی این مداخلات در بیماری آلزایمر وجود دارد. به‌طور خاص، مطالعات محدودی به بررسی هم‌زمان اثرات ترکیبی تمرینات ورزشی هوازی و مکمل‌یاری نیاسین بر الگوی بیان میکروRNAهای کلیدی مرتبط با پاتوفیزیولوژی آلزایمر پرداخته‌اند. علاوه بر این، بیشتر تحقیقات پیشین یا بر بافت مغزی متمرکز بوده‌اند یا هر یک از این مداخلات را به‌صورت جداگانه بررسی کرده‌اند، در حالی که ارزیابی اثرات هم‌افزایی آن‌ها بر شاخص‌های رفتاری و مولکولی می‌تواند درک جامع‌تری از راهکارهای غیرتهاجمی در پیشگیری و کنترل پیشرفت بیماری فراهم سازد. از این‌رو هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و مکمل‌دهی نیاسین بر حافظه فضایی و میزان سرمی میکروRNAهای مرتبط با آلزایمر در رت‌های مدل آلزایمری بود.

روش تحقیق

مطالعه حاضر از نوع تجربی است. ۳۰ سر رت نر از نژاد ویستار با وزنی در حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تهیه شدند و طبق قوانین و مقررات مربوط به نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به کار گرفته شدند. این حیوانات در قفس‌های پلی کریستال شفاف ساخت شرکت رازی و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با نوسان مثبت منفی یک درجه نگهداری شدند. شرایط نوری به صورت چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به طور منظم تنظیم شد. تغذیه آن‌ها با استفاده از غذای فشرده تولید شده توسط کارخانه خوراک دام و طیور پارس تهران انجام گرفت و آب به مقدار کافی در اختیارشان قرار گرفت. تمام اصول اخلاقی مرتبط با کار با حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه رعایت شد. رت‌های نر ویستار با روش تصادفی ساده در پنج گروه شش‌تایی شامل کنترل سالم (شم)، آلزایمری، نیاسین آلزایمری، تمرین آلزایمری و ترکیب تمرین با نیاسین آلزایمری تقسیم شدند. پژوهش حاضر در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با کد IR.UMSU.AEC.1402.032 به تصویب رسید.

روش اجرای پژوهش: رت‌ها پس از وزن‌کشی، تحت بیهوشی با کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم) و زایلایزین (۲۰-۱۰ میلی‌گرم) به‌صورت داخل صفاقی قرار گرفتند و سپس در دستگاه استریوتاگس^۱ با استفاده از میله‌های تثبیت‌کننده سر در جراحی^۲ در وضعیت افقی تثبیت شدند. در ادامه، پس از تراشیدن موهای سر، ضدعفونی با بتادین و ایجاد برش پوستی برای نمایان شدن جمجمه، محل تزریق بر اساس اطلس پاکسینوس^۳ تعیین شد (قدامی-خلفی = ۰/۸- میلی‌متر، میانی-جانبی = ۱/۵± میلی‌متر، پشتی-شکمی = ۳/۶- میلی‌متر) و جمجمه در این نقاط سوراخ گردید. محلول استرپتوزوتوسین با دوز سه میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در نرمال سالین حل شده و با استفاده از میکروسرنج هامیلتون^۴، به‌صورت دوطرفه در بطن‌های جانبی مغز تزریق شد (سه میکرولیتر در هر بطن با سرعت یک میکرولیتر بر دقیقه طی حدود سه دقیقه) پس از اتمام تزریق، سرنج به‌مدت حدود دو دقیقه در محل باقی ماند تا از نشت جلوگیری شود، سپس به‌آرامی خارج شده و محل جراحی بخیه و ضدعفونی گردید (۲۱). در نهایت، حیوانات به قفس منتقل شده و تحت مراقبت‌های پس از عمل (شامل مصرف مسکن و آنتی بیوتیک‌ها) قرار گرفتند تا بهبودی کامل حاصل شود. گروه کنترل

1. Stereotax
2. Ear Bars
3. Paxinos
4. Hamilton



سالم یا شم تزریق داخل بطنی نرمال سالین (سه میکرولیتر در هر بطن) با همان روش جراحی استریوتاکسی دریافت کرد و به جای نیاسین گاوژ سالین خوراکی انجام شد. برای تایید موفقیت آمیز بودن القای آلزایمر از نتایج ماز آبی موریس استفاده گردید. تصویر شماتیک مراحل القای آلزایمر با استفاده از دستگاه استریوتاکسی در شکل یک ارائه گردیده است.

نحوه اجرای پروتکل ورزشی: یک هفته بعد از جراحی و ترمیم و بهبودی کامل، برای ورزش از نوارگردان پنج خطی مخصوص رت‌ها استفاده شد. موش‌ها شش روز در هفته با سرعت ثابت ۱۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه (شدت سبک تا متوسط) به مدت ۳۰ روز به صورت اجباری روی نوارگردان دویدند. تمرین در روز اول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه انجام شد و در روزهای بعدی روزانه پنج دقیقه به زمان ورزش اضافه شد تا اینکه در نهایت به ۶۰ دقیقه در روز برسند. نوار گردان‌ها همچنین مجهز به شبکه‌هایی بودند که شوک الکتریکی خفیف (میانگین با شدت صفر تا ۰/۵ میلی آمپر با فاصله بین پالس یک تا دو ثانیه) ایجاد می‌کنند تا موش‌ها را برای دویدن مداوم روی نوارگردان تحریک کنند. موش‌ها در حین ورزش تحت نظارت چشمی قرار گرفتند تا اطمینان حاصل شود که در طول جلسات تمرینی می‌دوند و علائم مخدوش‌کننده‌ای مانند درد یا خستگی ندارند. رت‌هایی که مداخله ورزشی نداشتند به اتاق ورزش برده شده و در درون نوارگردان خاموش گذاشته می‌شدند (۲۲). پروتکل تمرین به اختصار در جدول شماره یک ارائه شده است.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی روی نوارگردان در رت‌های آلزایمری

جلسه تمرینی	مدت (دقیقه)	سرعت دویدن (متر بر دقیقه)
اول	۱۰	۱۷
دوم	۱۵	۱۷
سوم	۲۰	۱۷
چهارم	۲۵	۱۷
پنجم	۳۰	۱۷
ششم	۳۵	۱۷
هفتم	۴۰	۱۷
هشتم	۴۵	۱۷
نهم	۵۰	۱۷
دهم	۵۵	۱۷
یازدهم	۶۰	۱۷
دوازدهم الی سی ام	۶۰	۱۷



شکل ۱. شماتیک مراحل القای آلزایمر با استفاده از دستگاه استریوتاکیسی

مکمل یاری نیاسین: یک هفته بعد از جراحی و ترمیم و بهبودی کامل، رت‌ها با فرمول خوراکی نیاسین مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FAD)^۱ مورد تیمار قرار گرفت. رت‌ها با نیاسین (شرکت سیگما آلدریج^۲) روزانه با دوز ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن و به مدت ۳۰ روز تحت گاواژ دهانی قرار گرفتند (۲۳). جهت اطمینان از عدم تغییر وزن موش‌ها، وزن‌کشی در روزهای اول، هفتم و چهاردهم انجام شد.

پروتکل ماز آبی: آزمون ماز آبی موریس طی شش روز متوالی در چهار مرحله انجام شد. دمای آب استخر 23 ± 1 درجه سانتیگراد بود. ابتدا در مرحله عادت‌سازی (روز ۱۴ بعد از استریوتاکیسی)، حیوانات به مدت ۶۰ ثانیه بدون وجود سکو در استخر شنا کردند تا با محیط سازگار شوند. سپس در مرحله یادگیری (روزهای ۱۵ تا ۱۸)، هر حیوان روزانه در چهار نوبت از جهات مختلف وارد آب شده و ۶۰ ثانیه فرصت داشت سکو را بیابد؛ در صورت موفقیت، ۲۰ ثانیه روی سکو می‌ماند و در غیر این صورت به سکو هدایت می‌شد، فاصله بین هر نوبت ۱۰ دقیقه بود و شاخص زمان رسیدن به سکو به عنوان معیار یادگیری ثبت گردید. در مرحله پروب (روز ۱۹)، آزمون بدون سکو انجام شد و شاخص‌هایی مانند زمان حضور در ربع هدف، تعداد عبور از محل قبلی سکو و زمان اولین عبور به عنوان معیارهای حافظه فضایی اندازه‌گیری شدند (۲۴).

1. Food and drug administration

2. Sigma-Aldrich (Chemical sciences company)



روش های آزمایشگاهی: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و مکمل یاری نیاسین، خونگیری انجام شد. حیوانات تحت بیهوشی عمیق با کتامین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفته و سپس به روش خون گیری کامل از قلب (با سوزن گیج ۲۴ از سمت چپ قفسه سینه) نمونه گیری شدند. سپس، با رعایت اصول اخلاقی آسان کشی شدند و بافت برداری برای انجام دیگر مطالعات انجام شد. برای تهیه سرم، نمونه های خون در لوله های بدون ضد انعقاد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شدند تا لخته تشکیل شود، سپس سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد انجام شد و لایه سرمی فوقانی جدا و بلافاصله در منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد، رعایت این شرایط پیش تحلیلی^۱ تخریب RNA و آلودگی ناشی از لیز گلوبول های قرمز جلوگیری می کند. از نمونه های سرم برای اندازه گیری بیان میکروRNAهای miR-29a، miR-29c، miR-9a و miR-146a استفاده شد. استخراج RNA با کیت ترایزول ال اس^۲ (Invitrogen) مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد، این کیت به طور اختصاصی برای نمونه های مایع طراحی شده و بازیابی مولکول های RNA کوچک از جمله میکروRNAهای سرمی محاسبه شده با آن در مقایسه با روش های ستونی بیشتر است. به منظور کنترل تغییرات پیش تحلیلی ناشی از تفاوت در حجم سرم و کارایی استخراج، پیش از مرحله استخراج، یک میکروRNA خارجی (کنترل داخلی اسپایک-این)^۳ یعنی cel-miR-39 به هر نمونه اضافه شد. استفاده از این کنترل خارجی یک روش استاندارد طلایی در بیان میکروRNAهای سرمی شناخته شده است. سنجش بیان میکروRNAها با روش Real-Time PCR^۴ و تکنیک ساختار سنجاق سری^۵ انجام شد که به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا در تشخیص مولکول های RNA کوچک با طول ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید به طور گسترده در مطالعات میکروRNA مورد استفاده قرار می گیرد. میزان بیان نسبی ژن ها با روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد (۲۵،۲۶). تمامی مراحل آزمایشگاهی توسط شرکت آنالول طب (آنا سل^۶، تهران، ایران) انجام گرفت. توالی پرایمرها و مشخصات ژن ها در جدول شماره دو ارائه شده است.

جدول ۲. توالی پرایمرها در میکروRNAها

miRNA	توالی (5'→3')
rno-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
rno-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
rno-miR-9a-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAGA
rno-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUUCUAGGGUU
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

روش های تحلیل آماری: طبیعی بودن و همگنی واریانس ها به ترتیب با استفاده از روش های آماری شاپیرو-ویلک^۷ و لون^۸ بررسی شد. برای مقایسه بین گروهی از روش آنالیز واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی^۹ استفاده شد. تمامی تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و سطح معنی داری $p < 0.05$ انجام شد.

1. Preamalytic

2. TRIzol LS

3. Spike-in Internal Control

4. Real-time polymerase chain reaction

5. Stem-loop RT

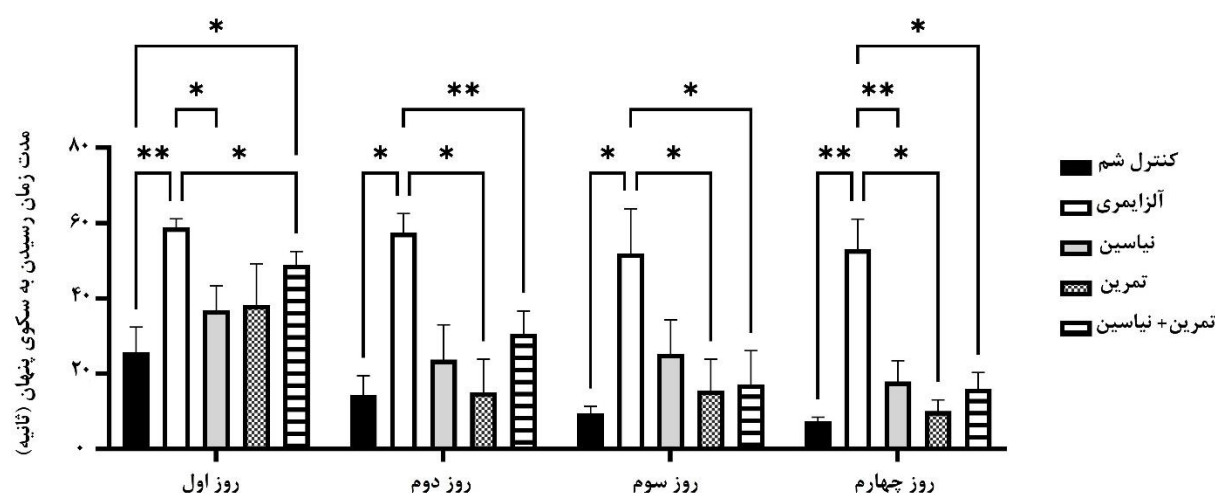
6. Anacell

7. Shapiro-wilk

8. Levens

9. Tukey

نتایج مربوط به حافظه فضایی: نتایج تحلیل واریانس یک راهه در مدت زمان طی شده جهت رسیدن به سکوی پنهان نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($p=0/001$). نتایج آزمون توکی در شکل دو نشان داد که مدت زمان طی شده جهت رسیدن به سکوی پنهان در گروه آلزایمری در تمامی روزها زمان بیشتری نسبت به گروه کنترل داشت (مقادیر p در روزهای اول تا چهارم به ترتیب $0/003$ ، $0/01$ ، $0/03$ ، $0/008$). در مقابل، گروه‌های نیاسین (مقادیر p در روزهای اول و چهارم به ترتیب $0/01$ ، $0/008$)، تمرین (مقادیر p در روزهای دوم تا چهارم به ترتیب $0/03$ ، $0/04$ ، $0/01$) و به‌ویژه ترکیب تمرین با نیاسین (مقادیر p در روزهای اول تا چهارم به ترتیب $0/03$ ، $0/008$ ، $0/02$ ، $0/01$) کاهش معنی داری در این متغیر نسبت به گروه آلزایمری نشان دادند.



شکل ۲. مقایسه مدت زمان طی شده جهت رسیدن به سکوی پنهان در طول چهار روز آموزش در آزمون ماز آبی. موریس در بین گروه‌های پژوهش * نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل، ** نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه آلزایمری. سطح معنی داری $p < 0/05$. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است.

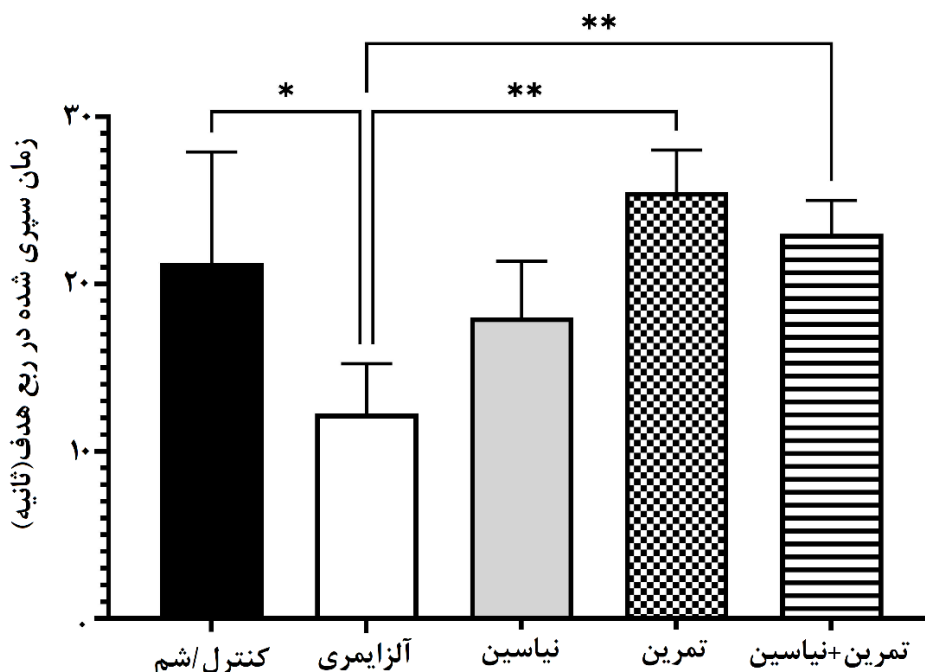
نتایج تحلیل واریانس یک راهه در مقایسه مدت زمان گذرانده شده در ربع هدف نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($p=0/002$). آزمون تعقیبی در شکل سه نشان داد که گروه آلزایمری زمان کمتری را در ربع هدف نسبت به گروه کنترل صرف کرد ($p=0/03$). گروه نیاسین تفاوت معنی داری در مدت زمان حضور در ربع هدف نسبت به گروه آلزایمری تفاوت معنی داری نداشت ($p=0/75$). همچنین گروه تمرین ($p=0/001$) و ترکیب تمرین و نیاسین ($p=0/010$) نیز موجب افزایش به معنی داری نسبت به گروه آلزایمری شدند. بین گروه‌های تیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$).

نتایج تحلیل واریانس یک راهه در تعداد عبور از محل سکوی پنهان نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($p=0/002$). نتایج آزمون تعقیبی در شکل چهار نشان داد تعداد عبور از محل سکوی پنهان در گروه آلزایمری به‌طور معنی داری

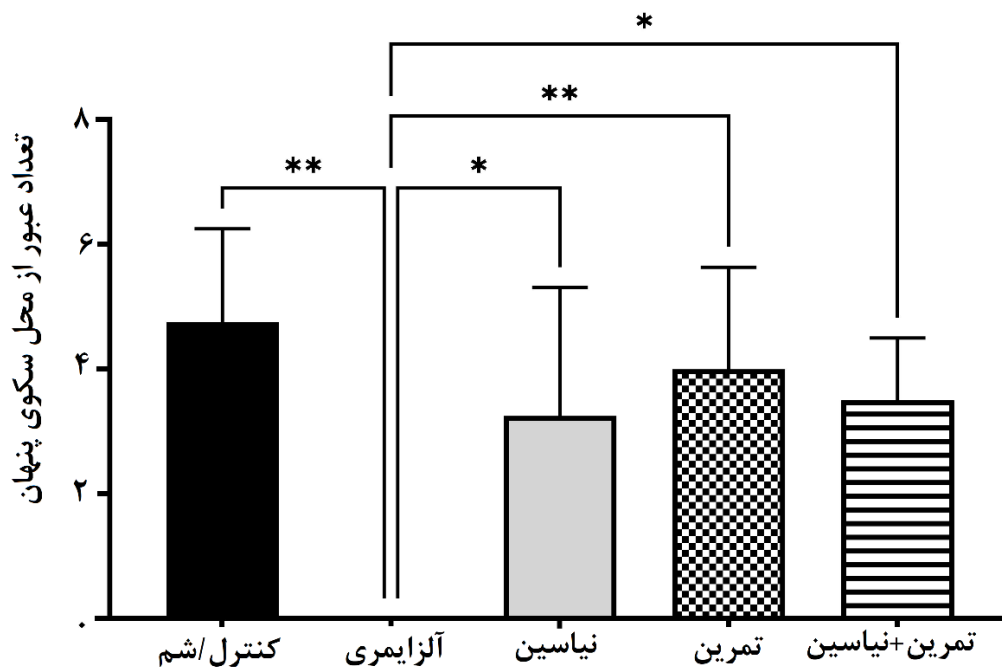


نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود ($p=0/002$). در مقابل، گروه‌های نیاسین ($p=0/003$)، تمرین ($p=0/009$) و ترکیبی ($p=0/002$) افزایش معنی‌داری در تعداد عبور نسبت به گروه آلزایمری نشان دادند. بین گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

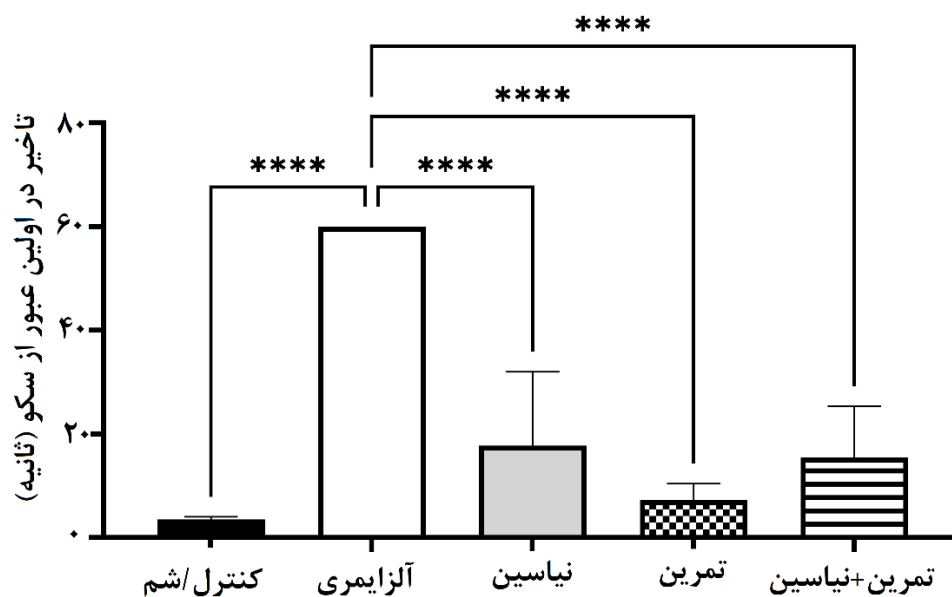
نتایج تحلیل واریانس یک راهه زمان تأخیر در اولین عبور از سکو در یافتن نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$). نتایج آزمون توکی در شکل پنج نشان داد گروه آلزایمری بیشترین زمان تأخیر نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($p=0/001$). گروه‌های نیاسین ($p=0/001$)، تمرین ($p=0/001$) و ترکیبی تمرین با نیاسین ($p=0/001$) باعث کاهش معنی‌داری در زمان تأخیر نسبت به گروه آلزایمری شدند. بین گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).



شکل ۳. مدت زمان طی شده در ربع هدف در بین گروه‌های پژوهش. * نشانه تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، ** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه آلزایمر. سطح معنی‌داری $p<0/05$. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است.



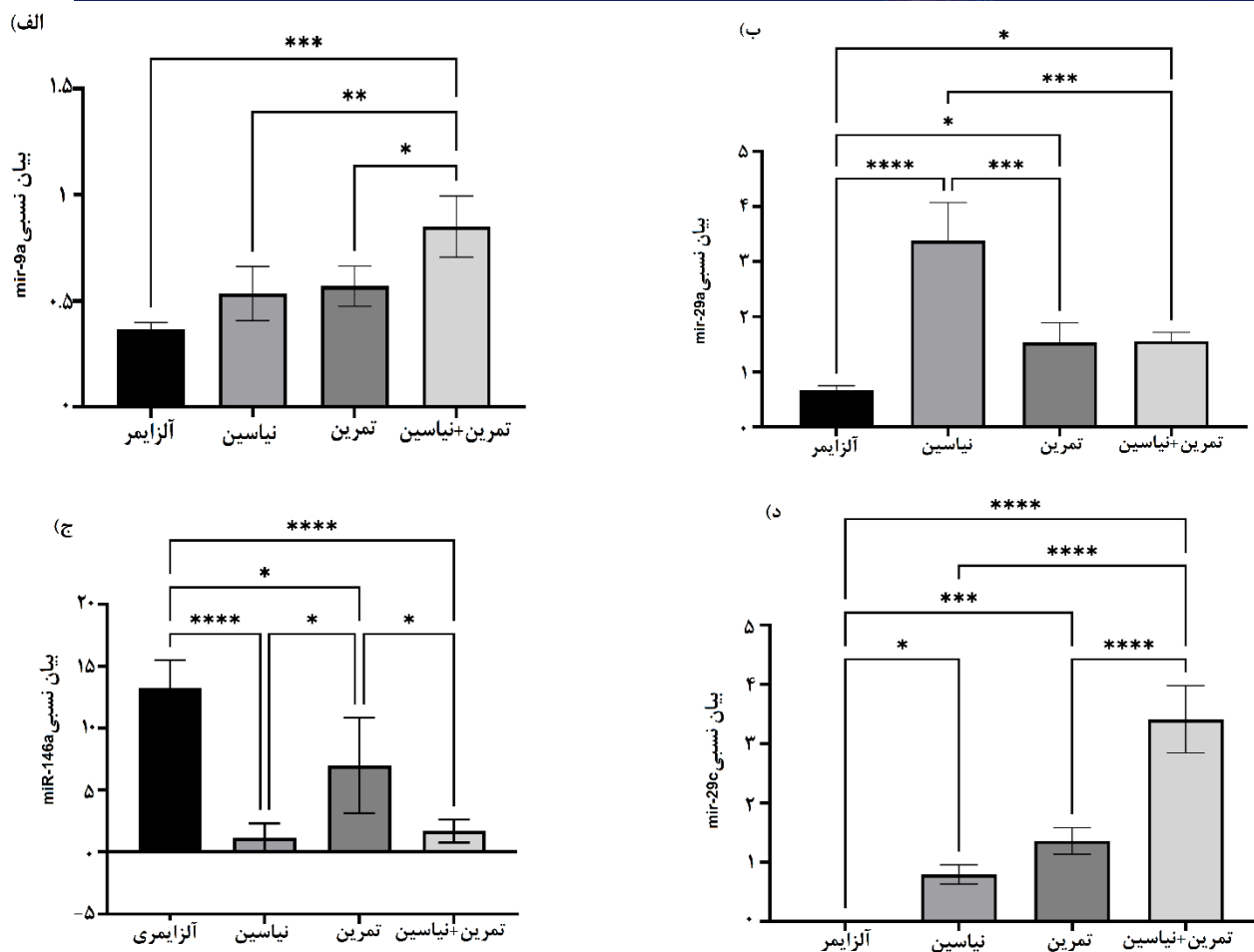
شکل ۴. تعداد عبور از محل سکوی پنهان در مرحله پروب آزمون ماز آبی موريس در بين گروه‌های پژوهش. * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه آلازمیری. سطح معنی‌داری $p < 0.05$. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است.





شکل ۵. تأخیر در اولین عبور از سکو بین گروه‌های پژوهش، *** نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها. سطح معنی‌داری $p < 0.05$. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است.

نتایج مربوط به بیان میکروRNAهای مرتبط با آلزایمر: نتایج تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های mir-29c ، mir-9a ، mir-29a و miR-146a وجود داشت ($p = 0.001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی در شکل شش-الف نشان داد که هر سه گروه نیاسین ($p = 0.001$)، تمرین ($p = 0.004$) و ترکیبی ($p = 0.003$) افزایش معنی‌داری در بیان ژن mir-29a نسبت به گروه آلزایمری داشتند. همچنین، گروه نیاسین افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه تمرین ($p = 0.002$) و ترکیب تمرین با نیاسین ($p = 0.001$) داشت. نتایج آزمون توکی در شکل شش-ب نشان داد که تنها گروه ترکیبی تمرین با نیاسین افزایش معنی‌داری در بیان ژن mir-9a نسبت به گروه آلزایمری داشت ($p = 0.001$). همچنین، گروه ترکیبی تمرین با نیاسین افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه تمرین ($p = 0.001$) و نیاسین ($p = 0.006$) داشت. نتایج آزمون تعقیبی در شکل شش-ج نشان داد که هر سه گروه نیاسین ($p = 0.001$)، تمرین ($p = 0.001$) و ترکیبی ($p = 0.001$) افزایش معنی‌داری در بیان ژن mir-29c نسبت به گروه آلزایمری داشتند. همچنین، گروه ترکیبی تمرین با نیاسین افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه تمرین ($p = 0.001$) و نیاسین ($p = 0.001$) داشت. نتایج آزمون تعقیبی در شکل شش-د نشان داد که هر سه گروه نیاسین ($p = 0.001$)، تمرین ($p = 0.001$) و ترکیبی ($p = 0.001$) کاهش معنی‌داری در بیان ژن miR-146a نسبت به گروه آلزایمری داشتند ($p < 0.05$). هر دو گروه نیاسین ($p = 0.001$) و ترکیب تمرین با نیاسین ($p = 0.003$) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه تمرین داشتند.



شکل ۶- نتایج مربوط به بیان میکروRNAها بین گروه‌های پژوهش. الف) بیان miR-29a. * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه آلزایمری *** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه نیاسین ب) بیان miR-9a. * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به نیاسین *** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه آلزایمری ج) بیان miR-29c. * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه نیاسین *** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به تمرین **** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به ترکیبی تمرین با نیاسین د) بیان miR-146a. * نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به تمرین، **** نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه آلزایمری. سطح معنی‌داری $p < 0.05$. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است.

بحث

نتایج نشان داد که القای آلزایمر منجر به اختلال معنی‌داری در شاخص‌های حافظه فضایی و تغییر در الگوی بیان میکروRNAها شد، در حالی که مداخلات تمرین ورزشی و مکمل نیاسین و ترکیب آنها توانستند این تغییرات را تا حد قابل توجهی تعدیل کنند. نتایج مطالعه حاضر در حافظه فضایی شامل افزایش زمان رسیدن به سکوی پنهان و کاهش زمان حضور در ربع هدف در گروه آلزایمر،



نشان‌دهنده اختلال در یادگیری و حافظه فضایی بود که با آسیب عملکرد هیپوکامپ همخوانی دارد. این یافته با مطالعات پیشین همسو است که نشان داده‌اند تزریق استرپتوزوتوسین از طریق ایجاد اختلال در متابولیسم گلوکز، استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی، منجر به نقص شناختی می‌شود (۲۷،۲۸). در مطالعات پیش‌بالینی گزارش شده است که تجویز نیاسین موجب بهبود عملکرد حافظه می‌شود (۲۹). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر که نشان‌دهنده بهبود معنادار شاخص‌های شناختی و رفتاری در گروه‌های دریافت‌کننده نیاسین است، هم‌خوانی و هم‌راستایی دارد. یافته‌های حافظه فضایی حاصل از آزمون ماز آبی موریس نشان داد که تمرین هوازی در مدل حیوانی آلزایمر به بهبود معنادار عملکرد شناختی منجر می‌شود یافته‌ها نشان داد که رت‌های گروه ورزش نسبت به گروه آلزایمر زمان کمتری برای یافتن سکوی پنهان صرف کردند و در آزمون نهایی نیز درصد بیشتری از زمان را در ربع هدف گذراندند. این نتایج نشان‌دهنده بهبود حافظه فضایی در اثر تمرین هوازی منظم است. مطالعات متعددی اثرات مفید تمرینات ورزشی بر بهبود عملکرد شناختی در مدل‌های حیوانی آلزایمر را گزارش کرده‌اند. در این راستا، کیم^۱ و دیگران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که تمرین هوازی موجب بهبود معنی‌دار حافظه فضایی در موش‌های مبتلا به آلزایمر در آزمون ماز آبی موریس می‌شود، به‌طوری‌که زمان رسیدن به سکوی پنهان کاهش یافته و عملکرد یادگیری تقویت گردید (۳۰). همچنین، کو^۲ و دیگران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که ورزش هوازی منظم با کاهش شاخص‌های التهابی و بهبود عملکرد هیپوکامپ، موجب بهبود شاخص‌های حافظه فضایی از جمله کاهش تاخیر و افزایش زمان حضور در ربع هدف می‌شود (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر، کیم و دیگران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که تمرین هوازی از طریق مهار مسیرهای التهابی نظیر NF-KB و کاهش آپوپتوز نورونی، موجب بهبود اختلالات شناختی در مدل آلزایمر گردید (۳۲). در مجموع، نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی، به‌ویژه تمرینات هوازی، نقش مؤثری در بهبود عملکرد حافظه فضایی و کاهش آسیب‌های تخریب عصبی ایفا می‌کند. عدم وجود تفاوت و عدم هم‌افزایی در بین گروه ترکیبی با گروه‌های منفرد تمرین و نیاسین ممکن است به این دلیل باشد که هر دو مداخله تقریباً از یک مسیر مشابه باعث تأثیرگذاری بر حافظه فضایی شده است و در هر دو گروه سازگاری‌ها به سقف خود رسیده است. بنابراین در گروه ترکیبی هم‌افزایی معنی‌داری مشاهده نشد. از طرفی عدم همخوانی نتایج میکروRNAها با حافظه فضایی ممکن است به این دلیل باشد که میکروRNAها در سرم اندازه‌گیری شده بودند و ناشی از تغییرات دیگر بافت‌های محیطی به جز مغز را هم شامل می‌شدند.

نتایج بیان میکروRNAها نشان داد که تمرین ورزشی منجر به افزایش بیان miR-29c و miR-29a و کاهش بیان miR-146a در سرم حیوانات شد. با توجه به نتایج مطالعات پیشین، افزایش miR-29a و miR-29c از طریق هدف قرار دادن آنزیم بتا-سکرتاز موجب کاهش تولید آمیلوئید-بتا^۳ می‌شوند (۷،۸) که می‌تواند بیانگر نقش محافظتی تمرین ورزشی در کاهش مسیرهای مرتبط با تولید آمیلوئید در آلزایمر باشد، در حالی که کاهش miR-146a احتمالاً به تنظیم پاسخ‌های التهابی سیستمیک مرتبط است. با توجه به اینکه این میکروRNAها در محیط خون اندازه‌گیری شده‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که تأثیرات از طریق مکانیسم‌های محیطی و سیستمیک (از جمله مسیرهای التهابی و متابولیکی) نیز نقش حفاظتی در برابر پاتولوژی آلزایمر ایفا می‌کند. یافته‌های این پژوهش با مطالعات پیشین در زمینه آلزایمر هم‌راستا بود. ژاو^۴ و دیگران (۲۰۱۹) نشان دادند که تمرین هوازی موجب افزایش miR-29a در مدل حیوانی آلزایمر شده و این افزایش با کاهش بار آمیلوئیدی در مغز همراه است، هرچند این تغییرات در سطح بافت مغزی بررسی شده بود (۳۳). در مقابل، نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده بروز این اثرات در سطح سیستمیک و سرمی است. همچنین، ایمپورتا کاریا^۵ و دیگران (۲۰۱۸) گزارش کردند که فعالیت بدنی می‌تواند الگوی بیان میکروRNAها را در مایعات بدن، بافت‌ها و اندام‌ها تعدیل کند که با یافته‌های این

1. Kim

2. Ko

3. Amyloid beta

4. Zhao

5. Improtia Caria



پژوهش هم‌خوانی دارد (۳۴). علاوه بر این، دلا روسا^۱ و دیگران (۲۰۲۰) نشان دادند که تمرین منظم در بیماران آلزایمر موجب بهبود عملکرد شناختی و تغییر در بیان میکرو RNAها می‌شود (۳۵). د سوزا^۲ و ایمپورتا کاریا^۳ نیز نقش تنظیمی ورزش بر miR-29a/b و اثرات ضدالتهابی آن را تأیید کردند (۳۴،۳۶). در سطح مکانیزمی، لین^۴ و دیگران (۲۰۲۴) نشان دادند که miR-29 از طریق کاهش بیان پرسنیلین-۱ و تجمع آمیلوئید می‌تواند اثرات محافظتی ایجاد کند (۳۷). در سال ۲۰۲۳ ژان-چیانگ^۵ و دیگران در یک مقاله مروری دریافتند که miR-146a در آلزایمر سطوح بالایی دارد و با کاهش سطح mir-146 به طور قابل توجهی پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP)^۶ و رسوب آمیلوئید بتا ($A\beta$) را در نواحی هیپوکامپ مغز کاهش می‌دهد، این افزایش همراه با افزایش استرس اکسیداتیو بود که گزارش دادند که miR-146a باعث پیشرفت آلزایمر و تشدید رسوب $A\beta$ می‌شود که به طور بالقوه توسط استرس اکسیداتیو از طریق فعال‌سازی سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن^۷ (MAPK) ایجاد می‌شود (۳۸). از طرفی، در مطالعه حاضر، مکمل‌یاری نیاسین نیز موجب افزایش بیان miR-29a و miR-9a و کاهش بیان miR-146 شد. شواهد حاصل از مطالعات پیش‌بالینی نشان می‌دهد که نیاسین و مشتقات آن دارای اثرات محافظت عصبی قابل توجهی در مدل‌های حیوانی آلزایمر هستند و این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر در یک راستا قرار داشت. بر اساس نتایج مطالعات پیشین، مکانیسم احتمالی اثربخشی نیاسین و مشتقات آن عمدتاً از طریق افزایش سطح NAD^+ ، بهبود عملکرد میتوکندری، کاهش استرس اکسیداتیو و مهار التهاب عصبی در تعدیل فرآیندهای تخریب عصبی نقش ایفا می‌کنند (۳۹). آلین^۸ و دیگران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای نشان دادند که نیاسین در دوزهای دارویی می‌تواند بیان میکرو RNAها را در عضله اسکلتی موش‌های چاق زوکر^۹ به‌طور معنی‌داری تغییر دهد. همچنین، نتایج آنها نشان داد که میکرو RNAهای تحت تأثیر نیاسین، طیف وسیعی از ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با تنظیم بیان ژن را هدف قرار می‌دهند (۴۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مداخله ترکیبی تمرین و نیاسین در اغلب میکرو RNAها تأثیر بیشتری نسبت به مداخلات منفرد تمرین هوازی و نیاسین داشت که نشان دهنده هم‌افزایی این دو مداخله در میکرو RNA می‌باشد.

از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری میکرو RNAها در بافت مغز تعداد نسبتاً کم نمونه، عدم اندازه‌گیری سطح NAD^+ و همچنین عدم اندازه‌گیری نشانگرهای التهابی و تخریب عصبی در بافت مغز برای بررسی ارتباط تغییرات میکرو RNAها و حافظه فضایی اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی دوزهای مختلف نیاسین و نیز میکرو RNAهای دیگر مرتبط با آلزایمر از جمله miR-124، miR-132 و miR-107 مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش، تأثیرات منفرد و ترکیبی تمرین هوازی با تردمیل و مکمل‌یاری نیاسین بر حافظه فضایی و بیان سرمی میکرو RNAهای کلیدی مرتبط با مسیرهای آمیلوئیدوژن (miR-29a و miR-29c)، استرس اکسیداتیو (miR-9a) و نوروالتهاب (miR-146a) رت‌های آلزایمری بررسی شد. یافته‌های رفتاری نشان داد که هر سه مداخله موجب بهبود معنی‌دار متغیرهای حافظه فضایی در آزمون ماز آبی موریس نسبت به گروه آلزایمر شدند، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار مشاهده نشد که احتمالاً به همسویی مکانیسم‌های اثر و رسیدن پاسخ‌های سازگاری به سقف بالینی مربوط است. در سطح مولکولی، هر سه مداخله موجب افزایش معنی‌دار بیان miR-29a، miR-29c، miR-9a و کاهش معنی‌دار miR-146a نسبت به گروه آلزایمر شدند. با این تفاوت که گروه ترکیبی در اغلب

1. De la Rosa

2. De Sousa

3. Improtia-Caria

4. Lin

5. Zhan-Qiang

6. Amyloid Precursor Protein

7. Mitogen-Activated Protein Kinase

8. Aline Couturier

9. Zucker



میکروRNAها، به ویژه در miR-9a و miR-29c و کاهش miR-146a، برتری معنی داری نسبت به مداخلات منفرد نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب تمرین هوازی و نیاسین می‌تواند از طریق تعدیل هم‌زمان مسیرهای مولکولی دارای اثرات محافظت عصبی سیستمیک باشد؛ با این حال، از آنجا که اندازه‌گیری‌ها در سطح سرمی انجام شده است و نشانگرهای مستقیم بافت مغزی در این مطالعه سنجیده نشده‌اند، تأیید قطعی ارتباط علی این تغییرات مولکولی با بهبود حافظه فضایی مستلزم مطالعات تکمیلی با اندازه‌گیری هم‌زمان شاخص‌های هیپوکامپی است.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

از تمام افرادی که در انجام این پروژه تحقیقی ما را یاری کردند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. Nature reviews Disease primers. 2021;7(1):33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>.
2. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G, Brum WS, Benedet AL, Montoliu-Gaya L, et al. Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. Nature Reviews Neurology. 2022;18(7):400-18. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00665-23>.
3. Liu S, Fan M, Zheng Q, Hao S, Yang L, Xia Q, et al. MicroRNAs in Alzheimer's disease: Potential diagnostic markers and therapeutic targets. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022;148:112681. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112681>.
4. Liu J, Zuo X, Han J, Dai Q, Xu H, Liu Y, et al. MiR-9-5p inhibits mitochondrial damage and oxidative stress in AD cell models by targeting GSK-3. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2020;84(11):2.273-80. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1797469>.
5. Souza VC, Morais Jr GS, Henriques AD, Machado-Silva W, Perez DIV, Brito CJ, et al. Whole-blood levels of MicroRNA-9 are decreased in patients with late-onset Alzheimer disease. American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias. 2020; 3:35:1533317520911573. <https://doi.org/10.1177/1533317520911573>.
6. Garza-Manero S, Arias C, Bermúdez-Rattoni F, Vaca L, Zepeda A. Identification of age-and disease-related alterations in circulating miRNAs in a mouse model of Alzheimer's disease. Frontiers in cellular neuroscience. 2015;9:53. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00053>.
7. Yang G, Song Y, Zhou X, Deng Y, Liu T, Weng G, et al. MicroRNA-29c targets β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role in vitro and in vivo. Mol Med Rep. 2015 Aug;12(2):3081-8. 10.3892/mmr.2015.3728. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3728>.
8. Jahangard Y, Monfared H, Moradi A, Zare M, Mirnajafi-Zadeh J, Mowla SJ. Therapeutic Effects of Transplanted Exosomes Containing miR-29b to a Rat Model of Alzheimer's Disease. Front Neurosci. 2020;14:564. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00564>.
9. Lukiw WJ. microRNA-146a Signaling in Alzheimer's Disease (AD) and Prion Disease (PrD). Front Neurol. 2020;11:462. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00462>.

10. Rezaee D, Saadatpour F, Akbari N, Zoghi A, Najafi S, Beyranvand P, et al. The role of microRNAs in the pathophysiology of human central nervous system: A focus on neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev*. 2023 Dec;92:102090. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102090>.
11. Erickson KI, Weinstein AM, Lopez OL. Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Archives of medical research*. 2012;43(8):615-21. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.09.008>.
12. Hartman YA, Karssemeijer EG, van Diepen LA, Olde Rikkert MG, Thijssen DH. Dementia patients are more sedentary and less physically active than age-and sex-matched cognitively healthy older adults. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2018;46(1-2):81-9. <https://doi.org/10.1159/000491995>.
13. Li Z, Chen Q, Liu J, Du Y. Physical exercise ameliorates the cognitive function and attenuates the neuroinflammation of Alzheimer's disease via miR-129-5p. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2020;49(2):163-9. <https://doi.org/10.1159/000507285>.
14. Chen J, Bai X, Wu Q, Chen L, Wang H, Zhang J. Exercise Protects Against Cognitive Injury and Inflammation in Alzheimer's Disease Through Elevating miR-148a-3p. *Neuroscience*. 2023;513:126-33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.01.008>.
15. Dungan CM, Valentino T, Vechetti IJ, Jr., Zdunek CJ, Murphy MP, Lin AL, et al. Exercise-mediated alteration of hippocampal Dicer mRNA and miRNAs is associated with lower BACE1 gene expression and A β (1-42) in female 3xTg-AD mice. *J Neurophysiol*. 2020 Dec 1;124(6):1571-7. <https://doi.org/10.1152/jn.00503.2020>.
16. Li Z, Chen Q, Liu J, Du Y. Physical Exercise Ameliorates the Cognitive Function and Attenuates the Neuroinflammation of Alzheimer's Disease via miR-129-5p. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2020;49(2):163-9. <https://doi.org/10.1159/000507285>.
17. Wang R, Li J, Li X, Guo Y, Chen P, Peng T. Exercise-induced modulation of miRNAs and gut microbiome: a holistic approach to neuroprotection in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2025 Oct 27;36(7):717-47. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2025-0013>.
18. Penberthy WT, Kirkland JB. Niacin. Present knowledge in nutrition: Elsevier; 2020. p. 209-24.
19. Wuerch E, Urgoiti GR, Yong VW. The promise of niacin in neurology. *Neurotherapeutics*. 2023;20(4):1037-54. <https://doi.org/10.1007/s13311-023-01376-2>.
20. Penberthy WT, Tsunoda I. The importance of NAD in multiple sclerosis. *Current pharmaceutical design*. 2009;15:64-99(1). <https://doi.org/10.2174/138161209787185751>.
21. Gerzson MFB, Bona NP, Soares MSP, Teixeira FC, Rahmeier FL, Carvalho FB, et al. Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. *Neurotox Res*. 2020 Apr;37(4):1009-17. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00167-3>.
22. Wang R, Tian H, Guo D, Tian Q, Yao T, Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci*. 2020 May;9(3):211-27. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.09.008>.
23. Moutinho M, Puntambekar SS, Tsai AP, Coronel I, Lin PB, Casali BT, et al. The niacin receptor HCAR2 modulates microglial response and limits disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science translational medicine*. 2022;14(637):eabl7634. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7634>.
24. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
25. Aquino R, de Concini V, Dhenain M, Lam S, Gosset D, Baquedano L, et al. Intrahippocampal Inoculation of A β (1-42) Peptide in Rat as a Model of Alzheimer's Disease Identified MicroRNA-146a-5p as Blood Marker with Anti-Inflammatory Function in Astrocyte Cells. *Cells*. 2023 Feb 22; 12(5):694. <https://doi.org/10.3390/cells12050694>.
26. Souza VC, Morais GS, Jr., Henriques AD, Machado-Silva W, Perez DIV, Brito CJ, et al. Whole-Blood Levels of MicroRNA-9 Are Decreased in Patients With Late-Onset Alzheimer Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. 2020 Jan-Dec;35:1533317520911573. <https://doi.org/10.1177/1533317520911573>

27. Halawany AME, Sayed NSE, Abdallah HM, Dine RSE. RETRACTED ARTICLE: protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta-secretases and A β 1a. *Scientific Reports*. 2017;7(1):2902. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02961-0>.
28. Tiwari V, Mishra A, Singh S, Mishra SK, Sahu KK, Kulkarni MJ, et al. Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NFKB-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Research*. 2021;1754:147261. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147261>
29. Moutinho M, Tsai AP, Puntambekar SS, Patel J, Lin PB, Jadhav V, et al. Therapeutic potential of niacin in Alzheimer's disease: Nonhuman/Target identification and validation studies: Other. *Alzheimer's & Dementia*. 2020;16:e040679. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147261>.
30. Kim B-K, Shin M-S, Kim C-J, Baek S-B, Ko Y-C, Kim Y-P. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2014;10(1):2. <https://doi.org/10.12965/jer.140086>.
31. Ko I-G, Kim S-E, Hwang L, Jin J-J, Kim C-J, Kim B-K, et al. Late starting treadmill exercise improves spatial learning ability through suppressing CREP/BDNF/TrkB signaling pathway following traumatic brain injury in rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2018;14(3):327. <https://doi.org/10.12965/jer.1836248.124>.
32. Kim S-H, Ko Y-J, Kim J-Y, Sim Y-J. Treadmill running improves spatial learning memory through inactivation of nuclear factor kappa B/mitogen-activated protein kinase signaling pathway in amyloid- β -induced Alzheimer disease rats. *International neurology journal*. 2021;25(Suppl 1):S35. <https://doi.org/10.5213/inf.2142164.082>.
33. Zhao Y, Wang Z, Zhang W, Zhang L. MicroRNAs play an essential role in autophagy regulation in various disease phenotypes. *Biofactors*. 2019;45(6):844-5. <https://doi.org/10.1092/biof.1555>.
34. Improta Caria AC, Nonaka CKV, Pereira CS, Soares MBP, Macambira SG, Souza BSdF. Exercise training-induced changes in microRNAs: beneficial regulatory effects in hypertension, type 2 diabetes, and obesity. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11):3608. <https://doi.org/10.3390/ijms19113608>.
35. De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, Millan F, Salvador-Pascual A, García-Lucerga C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of sport and health science*. 2020;9(5):394-404. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004>.
36. De Sousa RAL, Peixoto MFD, Leite HR, Oliveira LRSd, Freitas DA, Silva-Júnior FAd, et al. Neurological consequences of exercise during prenatal Zika virus exposure to mice pups. *International Journal of Neuroscience*. 2022;132(11):1091-101. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1860970>.
37. Lin E-Y, Hsu S-X, Wu B-H, Deng Y-C, Wuli W, Li Y-S, et al. Engineered exosomes containing microRNA-29b-2 and targeting the somatostatin receptor reduce presenilin 1 expression and decrease the β -amyloid accumulation in the brains of mice with Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*. 2024;4977-94. <https://doi.org/10.2147/IJN.S442876>.
38. Zhan-Qiang H, Hai-Hua Q, Chi Z, Miao W, Cui Z, Zi-Yin L, et al. miR-146a aggravates cognitive impairment and Alzheimer disease-like pathology by triggering oxidative stress through MAPK signaling. *Neurologia*. 2023;38(7):486-94. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2020.12.006>.
39. Hou Y, Wei Y, Lautrup S, Yang B, Wang Y, Cordonnier S, et al. NAD⁺ supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS-STING. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(37):e2011226118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011226118>.
40. Couturier A, Keller J, Most E, Ringseis R, Eder K. Niacin in pharmacological doses alters microRNA expression in skeletal muscle of obese Zucker rats. *PloS one*. 2014;9(5):e98313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098313>.

The effect of aerobic training and niacin supplementation on spatial memory and serum levels of microRNAs associated with Alzheimer's disease in Alzheimer's model rats

Abstract

Background and aim: Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative disorders with cognitive and memory impairment. The aim of the present study was to investigate the effects of aerobic training and niacin supplementation on spatial memory and serum levels of Alzheimer's-related microRNAs in Alzheimer's model rats. **Methods:** 30 male rats were randomly divided into five groups: sham, Alzheimer's, niacin, training, and combination. Alzheimer's induction was performed by intraventricular injection of streptozotocin at a dose of 3 mg/kg body weight per ventricle. Interventions were performed for four weeks, including six days a week of aerobic training on a treadmill at a speed of 17 m/min with zero incline and administration of niacin at a dose of 10 mg/kg body weight. Spatial memory was measured by the Morris water maze test and the expression of miR-29a, miR-29c, miR-9a, and miR-146a was measured by Real-Time PCR. Data analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey tests at a significance level of $p \leq 0.05$. **Results:** All three intervention groups showed a significant decrease in reaching time compared to the Alzheimer's group on the first to fourth days ($p \geq 0.05$). The training ($p=0.001$) and combination ($p=0.010$) groups showed a significant increase in the time spent in the target quadrant, and the niacin ($p=0.038$), training ($p=0.009$) and combination ($p=0.024$) groups showed a significant increase in the number of crossings and all three groups showed a significant decrease compared to the Alzheimer's group ($p=0.05$). While no significant difference was observed between the intervention groups in spatial memory processing ($p < 0.05$). All three intervention groups had a significant increase in the expression of miR-29a, miR-29c, and miR-9a and a significant decrease in miR-146a compared to the Alzheimer's group ($p < 0.05$). The combination group had a significant increase in miR-9a and miR-29c compared to the two training groups (p values of 0.014 and 0.001, respectively) and niacin (p values of 0.006 and 0.001, respectively). The niacin and combination groups had a significant decrease in miR-146 compared to the training group (p values of 0.019 and 0.034, respectively). The niacin group had a significant increase in miR-29a compared to the training and combination groups (p values of 0.002 and 0.001, respectively). **Conclusion:** Aerobic training, niacin supplementation, and combination can have equal effectiveness in improving spatial memory in Alzheimer's rats. However, the results of the combined intervention in micro-education appear to be superior to the interventions alone.

Keywords: Alzheimer's disease, aerobic training, niacin, spatial memory, microRNA