

## The Effect of 4 Weeks of Aerobic Training on Spatial Learning, Memory Performance and Mitochondrial Dynamics in the Hippocampal Tissue of Old Rats

Fazeli Sani A<sup>1</sup>, Matin homaee H\*<sup>1</sup>, Banaeifar A<sup>2</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran

2. Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran

\* *Corresponding author.* Tel:+982173681317, Fax: +982122481623, E-mail: hasanmatinhomaee@gmail.com

Received: Sep 6, 2020

Accepted: Dec 20, 2020

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Mitochondrial dysfunction is one of the main risk factors for neurological diseases which are associated with aging. On the other hand, aerobic exercise has beneficial effects on the brain health and cognitive function, and also improves mitochondrial dynamics. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of 4 weeks of aerobic exercise on spatial learning, memory performance and mitochondrial dynamics in the hippocampal tissue of old rats.

**Methods:** For this purpose, 14 male Wistar rats at 20 months of age were randomly divided into 2 groups: aerobic exercise (n=7) and control group (n=7). The exercise group performed 4 weeks of treadmill training (5 days per week at a speed of 10 to 15 m/min). Forty-eight hours after the last training session, the animals underwent behavioral tests. Twenty-four hours after the behavioral test, all rats were killed and hippocampal tissue was extracted. The mRNA expression of OPA1, Mfn2 and Drp1 genes were assayed using Real Time-PCR. The Independent t test was used for statistical analysis.

**Conclusion:** Aerobic exercise in old animals improved spatial learning and memory performance, increased hippocampal OPA1 gene expression, and decreased Drp1 gene expression compared to the control group ( $p \leq 0.01$ ).

**Conclusion:** It seems that aerobic exercise can improve the function of brain mitochondria by modulating fusion and fission processes and it can be considered as an effective non-pharmacological method to deal with aging-related learning and memory perturbations.

**Keywords:** Aging; Spatial Learning and Memory; Aerobic Exercise; OPA1; Mfn2; Drp1

# تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر عملکرد یادگیری و حافظه فضایی و پویایی میتوکندریایی در بافت هیپوکمپ رت‌های پیر

احمد فاضلی ثانی<sup>۱</sup>، حسن متین همائی<sup>۱\*</sup>، عبدالعلی بنائی فر<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران- ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران- ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۷۳۶۸۱۳۱۷. فاکس: ۰۲۱۲۲۴۸۱۶۲۳. ایمیل: hasanmatinhomae@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** اختلالات میتوکندریایی از عوامل اصلی خطرزا در ایجاد بیماری‌های عصبی مرتبط با پیری بشمار می‌روند. از سوی دیگر، ورزش هوازی اثرات مفیدی بر سلامت مغز و عملکرد شناختی دارد و پویایی میتوکندریایی را بهبود می‌بخشد. از این رو، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی بر عملکرد یادگیری و حافظه فضایی و پویایی میتوکندریایی در بافت هیپوکمپ رت‌های پیر بود.

**روش کار:** بدین منظور، تعداد ۱۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۲۰ ماهه به روش تصادفی ساده به ۲ گروه ورزش هوازی (تعداد = ۷ سر) و گروه کنترل (تعداد = ۷ سر) تقسیم شدند. گروه ورزش ۸ هفته تمرین دویدن روی نوارگردان (۵ روز در هفته با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر بر دقیقه) را اجرا نمودند. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی حیوانات تحت آزمون رفتاری قرار گرفتند. بیست و چهار ساعت بعد از آزمون رفتاری تمامی رت‌ها کشته شدند و بافت هیپوکمپ استخراج شد. بیان mRNA ژن‌های OPA1، Mfn2 و Drp1 با استفاده از روش RealTime-PCR مورد سنجش قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون t مستقل استفاده شد.

**نتایج:** تمرین هوازی در حیوانات پیر عملکرد یادگیری و حافظه فضایی را بهبود بخشید و میزان بیان ژن OPA1 هیپوکمپ را افزایش و میزان بیان ژن Drp1 را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $p \leq 0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که تمرین هوازی می‌تواند عملکرد میتوکندری‌های مغز را از طریق تعدیل فرایندهای همجوشی و شکافت بهبود بخشد و به عنوان یک روش غیردارویی موثر برای مقابله با اختلالات یادگیری و حافظه در پیری در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** پیری؛ یادگیری و حافظه فضایی؛ تمرین هوازی؛ OPA1؛ Mfn2؛ Drp1

پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۳۰

دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۶

## مقدمه

در انسان‌ها، پیری یک عامل خطر برای بسیاری از شرایط، از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت و زوال عقل به‌شمار می‌رود که یکپارچگی بدن و مغز را

به خطر می‌اندازد [۱]. بیماری آلزایمر<sup>۱</sup> شایع‌ترین علت زوال عقل در میان افراد مسن است که به وسیله آتروفی نواحی مشخصی از مغز، کاهش ادراک

<sup>۱</sup> Alzheimer's Disease

پیشرونده و از دست دادن حافظه و ناتوانی در انجام کارهای روزمره مشخص می‌شود. به طور جالب، وقوع زوال عقل به تجمع عوامل خطرزا و محافظتی در طول عمر نسبت داده شود و فعالیت بدنی می‌تواند به حفظ یک مغز پیر سالم کمک کند. در واقع، فعالیت ورزشی منظم و تغذیه سالم سنگ بناهای شناخته شده پیری سالم هستند [۱]. اخیراً، استدلال‌های تحقیقات اپیدمیولوژیک و پایه تاکید کرده‌اند که عدم انجام فعالیت جسمانی، که یکی از عناصر شیوه زندگی قابل اصلاح می‌باشد، می‌تواند زوال ادراک مرتبط با سن و توسعه بیماری آلزایمر را تحت تأثیر قرار دهد [۲].

میتوکندری‌ها برای چندین دهه نقش مرکزی در فرضیه‌های مختلف پیری داشته‌اند. نشان داده شده است که انباشته شدن آسیب‌های اکسیداتیو می‌تواند به عنوان علت اصلی پیری در نظر گرفته شود و تجمع میتوکندری‌های غیرطبیعی در روند پیری نقش اساسی دارند [۳]. مغز ارگانی با متابولیک بسیار بالا است و میتوکندری‌ها در نورون‌های هیپوکمپ بشدت مورد نیاز هستند. اختلالات میتوکندریایی و پیری عوامل اصلی خطرزا در ایجاد بیماری‌های عصبی مرتبط با پیری بشمار می‌روند. اگرچه اختلال در تعادل پویایی میتوکندریایی با فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف پیری و بیماری‌های عصبی مرتبط است، سازوکارهای تنظیمی درگیر در پویایی میتوکندریایی هنوز به طور کامل شناخته نشده است [۴]. همجوشی میتوکندریایی<sup>۱</sup> به بهم پیوستن دو میتوکندری اشاره دارد، در حالی که شکافت میتوکندریایی<sup>۲</sup> به تقسیم یک میتوکندری به دو میتوکندری جداگانه تعریف می‌شود، فرایندهای اصلی پویایی میتوکندریایی بشمار می‌روند که عملکرد طبیعی میتوکندری‌ها را موجب می‌شوند [۵]. شکافت و همجوشی میتوکندریایی عمدتاً به عملکرد صحیح

پروتئین مرتبط با داینامین GTPآز سیتوپلاسمی<sup>۳</sup> (Drp1)، پروتئین‌های تخصص‌یافته میتوفوزین‌های GTPآز مرتبط با داینامین<sup>۴</sup> (MFN) و پروتئین آتروفی بصری<sup>۵</sup> (OPA-1) بستگی دارد [۶]. همچنین، این پروتئین‌ها مونتاژ و ثبات مجموعه‌های زنجیره تنفسی از جمله بازسازی کریستای میتوکندریایی را تنظیم می‌کنند و در نهایت به مورفولوژی میتوکندریایی در پاسخ به نیازهای انرژی سلول شکل می‌دهند که این امر به طور مستقیم تکامل و حفظ سیناپس‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۷]. شواهد زیادی نشان می‌دهند که اختلال در تعادل بین شکافت و همجوشی میتوکندریایی در پیری و بیماری‌های عصبی مرتبط با پیری دخیل است [۸]. با این حال، اطلاعات مرتبط با نقش تمرین ورزشی در پویایی میتوکندریایی و پیری مغز محدود است.

نشان داده شده است که فعالیت ورزشی به ویژه فعالیت ورزشی هوازی اثرات مفیدی بر سلامت مغز و عملکرد شناختی دارد و اثرات مخرب بیماری‌های نورولوژیک مانند آلزایمر، پارکینسون و افسردگی را کاهش می‌دهد. اثرات مفید فعالیت ورزشی بر مغز بیشتر در نواحی هیپوکمپ و شکنج دندانه‌ای<sup>۶</sup> مشاهده می‌شود و این اثرات مفید شامل افزایش جریان خون و اندازه هیپوکمپ در انسان‌ها، تغییرات مورفولوژیکی در دندریت و برآمدگی‌های دندریتی<sup>۷</sup>، افزایش پلاستیسیته سیناپسی و نورورنژ در حیوانات با شیوه‌های مختلف فعالیت ورزشی می‌باشد [۹]. تمرینات ورزشی باعث افزایش بیورنژ میتوکندری در عضلات اسکلتی شده و از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ بالادست مانند PGC-1 $\alpha$ <sup>۸</sup> و فاکتور

<sup>3</sup> Cytoplasmic GTPase Dynamin Related Protein 1

<sup>4</sup> Dynamin-related GTPases Mitofusins Specialized Proteins

<sup>5</sup> Optic Atrophy Protein 1

<sup>6</sup> Dentate Gyrus (DG)

<sup>7</sup> Dendritic Spines

<sup>8</sup> Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha

<sup>1</sup> Mitochondria Fusion

<sup>2</sup> Mitochondria Fission

ساعت نگهداری شدند به طوری که در دسترسی به آب و غذای استاندارد، محدودیتی نداشته باشند. همه مراحل مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.TMU.REC.1399.124 انجام شد. بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، تمامی رت‌ها به منظور آشناسازی با نوارگردان به مدت یک هفته (۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و پنج روز در هفته) در معرض آن قرار گرفتند. سپس، رت‌ها به روش تصادفی ساده به ۲ گروه تقسیم شدند: گروه ورزش هوازی و گروه کنترل.

گروه ورزش ۴ هفته تمرین هوازی را اجرا نمودند و گروه کنترل همزمان با گروه تمرین و با مدت مشابه با آنها در معرض نوارگردان خاموش قرار گرفتند تا شرایط محیطی برای همه رت‌ها یکسان باشد. پروتکل تمرین هوازی به این صورت بود که رت‌ها روی نوارگردان با شیب صفر درجه ۵ روز در هفته به تمرین پرداختند. سرعت نوارگردان در هفته‌های اول و دوم تمرین، ۱۰ متر بر دقیقه بود که در دو نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آن (به منظور جلوگیری از خستگی عضلانی در رت‌ها) اجرا شد. در هفته سوم، سرعت به ۱۵ متر بر دقیقه افزایش یافت که در سه نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۲ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها انجام گردید. در هفته چهارم، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۳ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها به فعالیت پرداختند [۱۵، ۱۴]. رت‌های گروه تمرین در تمام جلسات تمرینی پایش می‌شدند و با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف با شدت ۰/۵ میلی‌آمپر که در حیوان استرس زیادی را ایجاد نمی‌کند و یا دستکاری با یک اسفنج به ادامه دویدن تشویق شدند.

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی حیوانات تحت آزمون رفتاری قرار گرفتند. آزمون ماز آبی موریس برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی حیوانات

رونویسی میتوکندری<sup>۱</sup> (TFAM) A، اکسیداسیون لیپیدها را بهبود می‌بخشد [۱۰]. با این حال، بتااکسیداسیون در مغز زیاد مورد توجه قرار نمی‌گیرد، زیرا سلول‌های عصبی وابستگی بیشتری به متابولیسم هوازی گلوکز نسبت به سلول‌های محیطی نشان می‌دهند [۱۱]. بنابراین، اثرات ورزش بر عملکرد میتوکندری‌های مغز ممکن است با اثرات آن در عضلات و سایر بافت‌های محیطی متفاوت باشد.

بر اساس جستجوهای ما تاکنون مطالعات اندکی نقش ورزش بر پویایی میتوکندریایی در مغز را مورد بررسی قرار داده‌اند و نتایج متناقضی نیز گزارش شده است. گاسدون<sup>۲</sup> و همکاران گزارش کردند که ۳ هفته تمرین هوازی موجب افزایش سطوح Drp1 بدون تغییر در سطوح Mfn2 در کورتکس مغز موش‌های پیر می‌شود [۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر، کو<sup>۳</sup> و همکاران نشان دادند که ۶ هفته تمرین شنا در رت‌های پیر ناشی از تزریق D-گالاکتوز، سطوح افزایش یافته Drp1 و Mfn2 در هیپوکمپ را کاهش داده و موجب بهبود عملکرد شناخت فضایی حیوانات می‌شود [۱۳]. با توجه به نقش مهم میتوکندری‌ها در عملکرد مغز، و همچنین کمبود اطلاعات در مورد اثر تمرین هوازی بر پویایی میتوکندریایی در شرایط پیری، این مطالعه به بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی بر عملکرد شناخت فضایی و پویایی میتوکندریایی در بافت هیپوکمپ رت‌های پیر می‌پردازد.

## روش کار

آزمودنی‌های مطالعه حاضر تعداد ۱۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۲۰ ماهه با میانگین وزنی  $641 \pm 26$  گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رت‌ها در دمای محیطی  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲:۱۲

<sup>1</sup> Mitochondrial Transcription Factor A

<sup>2</sup> Gusdon

<sup>3</sup> Kou

استفاده شد. دستگاه رفتاری شامل یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی (به قطر ۱/۵ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) بود که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن از آب  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد پر شده بود. یک سکوی مدور به قطر ۱۰ و ارتفاع ۲۸ سانتی‌متر، حدود ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از ربع دایره‌های از پیش تعیین شده، قرار داده شد. آزمایش‌کننده، رایانه و شکل‌های راهنمای خارج از ماز در سراسر آزمایش ثابت بودند. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم افزار Etho Vision 7 و یک دوربین که در بالای مخزن قرار می‌گرفت، ردیابی و ثبت می‌شد. بدین ترتیب مسیر شنای موش در هر بار آموزش ثبت و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان سکوی پلکسی گلاس (سکوی پنهان) را پیدا کند و مدت زمانی که حیوان در ربع دایره هدف می‌گذراند، اندازه‌گیری شدند. روش آموزش ماز آبی موریس برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی بدین صورت بود: الف) سازش یافتن: به منظور عادت کردن به ماز، ۲۴ ساعت قبل از آموزش، رت‌ها به مدت ۲ دقیقه در مخزن فاقد صفحه پلکسی گلاس شنا کردند. ب) مرحله یادگیری: در این مرحله رت‌های هر دو گروه به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کارآزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم (جنوب شرقی) قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. در شروع هر کارآزمایی ابتدا به هر رت مدت ۲۰-۱۵ ثانیه اجازه استقرار روی سکو داده می‌شد تا حیوان فرصت داشته باشد با رؤیت علایمی از قبیل پنجره، میز و قفسه، توصیفی فضایی از محیط اطراف ماز به دست آورد. سپس، حیوان به طور تصادفی از یکی از چهار جهت اصلی (شمال، جنوب، شرق، غرب) به نحوی داخل آب رها می‌شد که سر حیوان به سمت دیواره حوضچه قرار گیرد. در این حالت، حیوان شنا می‌کرد تا سکوی پنهان زیر آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. در صورتی که رت قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰

ثانیه نبود با دست به طرف آن هدایت می‌شد. پس از پیدا کردن سکو، به حیوان اجازه داده می‌شد که به مدت ۲۰ ثانیه روی آن باقی بماند. مدت زمان پیدا کردن سکو (تأخیر در رسیدن به سکو) در هر بار آموزش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. پس از آخرین کارآزمایی آموزش در هر روز، حیوان از حوضچه خارج و با حوله خشک گشته و به قفس خود باز گردانده می‌شد. آزمون پروب (انتقال): یک روز بعد از آخرین روز آموزش، حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله، رت‌ها در یک آزمون ۶۰ ثانیه‌ای که در طی آن سکو از داخل آب برداشته می‌شد، مورد ارزیابی قرار گرفتند و مدت زمان صرف شده در ربع دایره هدف که قبلاً سکو در آن قرار داشت، اندازه‌گیری شد. آزمون سکوی آشکار: به منظور بررسی هماهنگی حسی- حرکتی و انگیزه حیوان، پس از انجام آزمون پروب، سکو توسط یک صفحه سفید رنگ، مرئی شد و هم سطح با آب قرار گرفت تا به صورت واضح دیده شود. این سکو در وسط ربع دوم (منطقه شمال شرقی) قرار داشت و هر رت در چهار کارآزمایی به طور تصادفی از چهار جهت اصلی به داخل آب رها شد. سپس، حیوان شنا کرده تا سکوی سفید رنگ هم سطح آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. مدت زمان پیدا کردن سکو در هر بار آزمون اندازه‌گیری می‌شد. در صورتی که حیوان در این چهار کارآزمایی قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نبود، از گروه خود حذف می‌شد [۱۵]. ۲۴ ساعت بعد از آزمون رفتاری، رت‌ها از طریق قرار گرفتن در ظرف حاوی اتر بی‌هوش شدند. سر حیوان توسط دستگاه گیوتین جدا و مغز کامل خارج شد. سپس، با احتیاط هیپو کمپ روی یخ از بقیه بافت مغز جدا و در نیتروژن مایع قرار داده شد و تا انجام آزمایشات بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور استخراج RNA تام از بافت هیپو کمپ هموژن شده، ۱ میلی‌لیتر تریزول (Invitrogen, CN

روی یخ قرار گرفت. پس از آن Enzyme mix و Reaction buffer به محلول اضافه شدند. محلول در ۳ مرحله متوالی انکوبه شد: مرحله اول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله سوم، به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸ درجه سانتی-گراد انجام گردید و در نهایت cDNA سنتز شد و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free انجام شد.

برای اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA از روش کمی Real time-PCR استفاده شد. در ابتدای کار میزان غلظت بینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص گردید به طوری که کمترین میزان دایمر و بهترین  $C_t$  مشاهده شود. Real time-PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه بر اساس اطلاعات این ژن‌ها در بانک ژنی NCBI توسط شرکت پیشگام (ایران) طراحی شد (جدول ۱). برنامه Real time-PCR شامل: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت در هر سیکل PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و با توجه به دمای اتصال پرایمرها هر سیکل به مدت ۳۰ ثانیه (۴۰ سیکل) در نظر گرفته شد. نمودار دمای ذوب جهت بررسی صحت واکنش‌های انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژن گلیسر آلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز<sup>۱</sup> (GAPDH)

<sup>۱</sup> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(15596018, USA) به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت اضافه و پس از مخلوط کردن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد (Merck, CAS 67-66-3 102445, Germany) به نمونه اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شدند. محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع حاوی RNA به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد، سپس ۵۰۰ میکرولیتر اتانول (Merck, CAS 107017, Germany 64-17-5) به محلول RNA اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت، این محلول نیز به مدت ۱۵ دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. مایع رویی با دقت خارج گردید و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به رسوب RNA اضافه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه (در دمای ۴ درجه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. در ادامه مایع رویی به دقت خارج شد و رسوب RNA با ۱۰۰ میکرولیتر ایلوشن بافر (Sigma Aldrich, H5413, Germany) رقیق گردید. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت. در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Germany) ارزیابی شد و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸-۱/۶ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید [۱۶]. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA، تعدادی از RNAs تخلیص شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا، مراحل سنتز cDNA مطابق پروتکل شرکت سازنده (High-capacity cDNA reverse transcription kit) انجام شد. ابتدا RNA، پرایمر و آب با هم ترکیب شدند و محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس محلول به مدت ۲ دقیقه

به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد [۱۷].

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد مطالعه

Gene	Forward/Reverse	Primer (5' → 3')	Tm	Product Length	Accession Number
<i>Mfn2</i>	F	CTTTACCCATCCCCAGTTGTC	61.14	95	XM_008764288.2
	R	AGCAGCGGTCAGACATGTTTC	61.21		
<i>Opa1</i>	F	TGTGGTTGGAGATCAGAGTGC	60.00	129	XM_017597866.1
	R	GGGCTTCACTGAGAGTCAC	60.04		
<i>Drp1</i>	F	AGCAACTACAGCACACAGGAAC	61.07	179	XM_017597844.1
	R	CCACAGGCATCAGCAAAGTC	59.48		
<i>GAPDH</i>	F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	61.58	121	XM_017593963.1
	R	CATACTCAGCACCAGCATCACC	61.32		

نتایج آزمون پروب برای بررسی حافظه فضایی رت‌ها نیز نشان داد که زمان صرف شده در ربع دایره هدف برای گروه ورزش هوازی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود ( $p=0/007$ ,  $t=-3/247$ ). (نمودار ۱ ج).

نتایج آزمون *t* مستقل نشان داد که میزان بیان *Drp1* mRNA هیپوکمپ در گروه ورزش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $t=-4/745$ ,  $p=0/005$ ). (نمودار ۲).

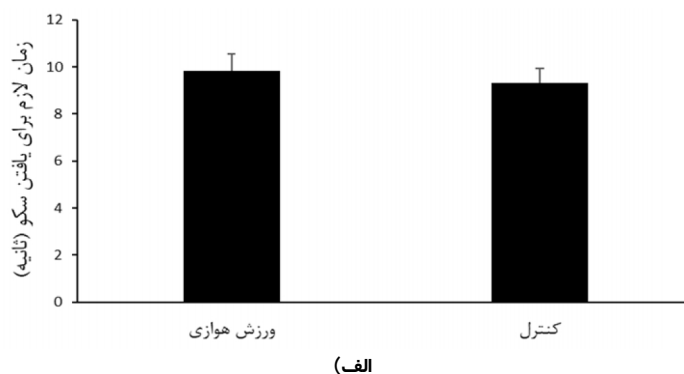
میزان بیان *Mfn2* mRNA هیپوکمپ در گروه ورزش در مقایسه با گروه کنترل به طور غیرمعنی‌داری افزایش یافت ( $t=-2/524$ ,  $p=0/053$ ). (نمودار ۳).

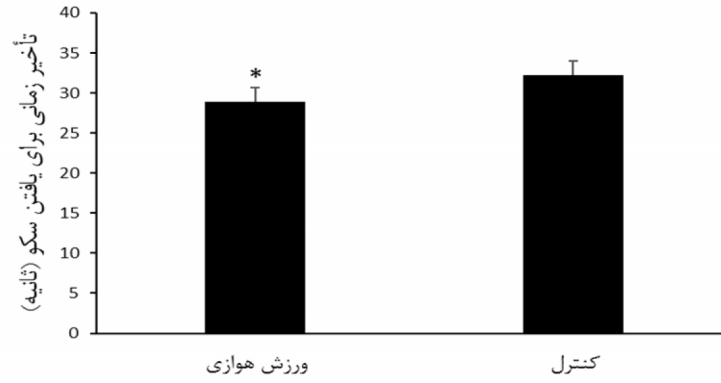
نتایج آزمون *t* مستقل نشان داد که میزان بیان *OPA1* mRNA هیپوکمپ در گروه ورزش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $t=4/918$ ,  $p=0/004$ ). (نمودار ۴).

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. به منظور تحلیل داده‌های بدست آمده از آزمون *t* مستقل استفاده شد. معنی‌داری بین متغیرها در سطح  $p \leq 0/05$  مورد توجه قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS-16 و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel-2016 استفاده شد.

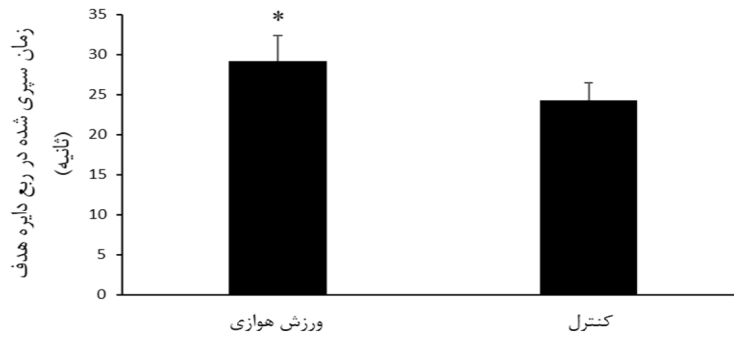
### یافته‌ها

بین گروه‌های مورد مطالعه در اجرای آزمون سکوی آشکار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $p=0/187$ ) (نمودار ۱ الف). نتایج آزمون *t* مستقل نشان داد که میانگین تأخیر زمانی برای یافتن سکو در طی ۴ روز مرحله یادگیری در گروه ورزش هوازی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود ( $t=3/375$ ,  $p=0/006$ ). (نمودار ۱ ب).



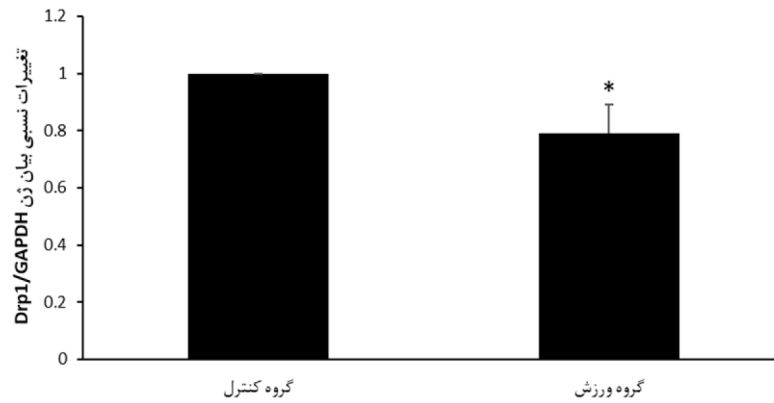


(ب)



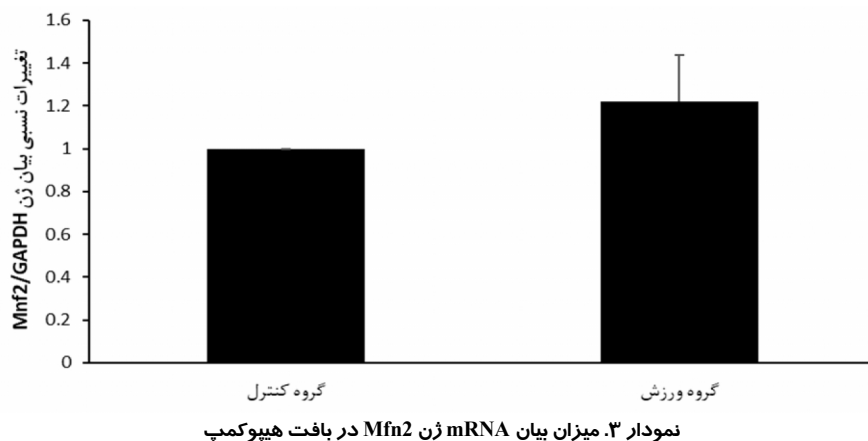
(ج)

نمودار ۱. الف) میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در آزمون سکوی آشکار ب) میانگین تأخیر زمانی برای یافتن سکو در مرحله یادگیری. ج) مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف در آزمون پروب. \*:  $p \leq 0.01$  تفاوت معنی دار با گروه کنترل

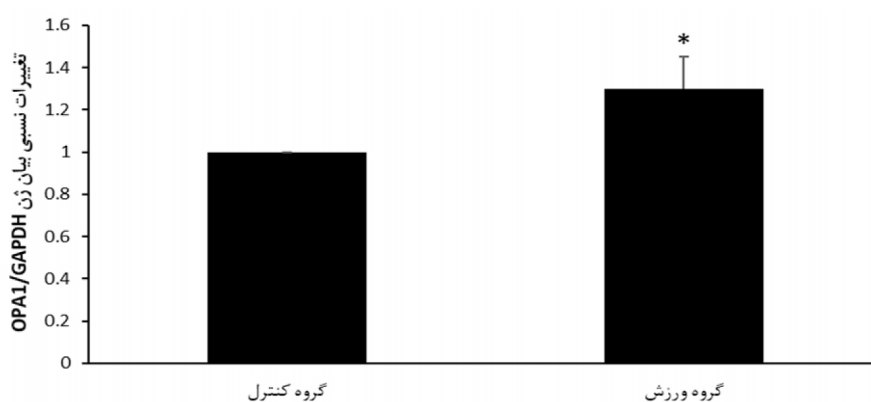


نمودار ۲. میزان بیان mRNA ژن Drp1 در بافت هیپوکمپ. \*:  $P \leq 0.01$  تفاوت معنی دار با گروه کنترل





نمودار ۳. میزان بیان mRNA ژن Mfn2 در بافت هیپوکمپ

نمودار ۴. میزان بیان mRNA ژن OPA1 در بافت هیپوکمپ. \*:  $p \leq 0.01$  تفاوت معنی دار با گروه کنترل

## بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر ۴ هفته تمرین هوازی بر عملکرد شناختی و پویایی میتوکندریایی در بافت هیپوکمپ رت‌های پیر بود. پیری منجر به کاهش شدید در سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی و نورونزایی با اختلالات همزمان در عملکردهای شناختی می‌شود که سلامت کلی فرد را به مخاطره انداخته و بار سنگینی بر جامعه تحمیل می‌کند [۱۸]. شواهد زیادی نشان می‌دهند که افزایش فعالیت جسمانی یا یک سبک زندگی فعال تأثیر مثبتی بر سلامت مغز در انسان‌ها دارد [۱۹]. ورزش می‌تواند به عنوان یک جایگزین مؤثر و بی‌خطر برای داروها جهت کند کردن زوال عقل در نظر گرفته شود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عملکرد یادگیری و حافظه فضایی حیواناتی که تمرین هوازی را تجربه کرده بودند، با

کاهش میانگین زمان صرف شده برای رسیدن به سکو طی روزهای آموزش و افزایش زمان صرف شده در ربع دایره هدف ماز آبی به طور چشمگیری بهبود یافت. همسو با یافته‌های مطالعه حاضر، هی<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که تمرین دویدن اختیاری موجب بهبود یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های پیر ۱۴ الی ۱۶ ماهه شد [۲۰]. در مطالعه‌ای دیگر، وانگ<sup>۲</sup> و همکاران بهبود عملکرد یادگیری و حافظه فضایی را در رت‌های ماده و نر پیر به دنبال ۴ و ۱۴ ماه دویدن روی تردمیل گزارش کردند [۲۱]. با این حال، خورشید احمد و همکاران عدم تأثیر قابل توجه ورزش هوازی بر عملکرد یادگیری فضایی رت‌های سالم در ماز آبی موریس را گزارش کردند [۲۲]. یکی

<sup>1</sup> He

<sup>2</sup> Wang

از دلایل این اختلاف در نتایج را می‌توان در سن آزمودنی‌ها جستجو کرد. مطالعه مذکور از رت‌های ۸ هفته‌ای استفاده کرده بود در حالی که حیوانات ۲۰ ماهه آزمودنی‌های مطالعه حاضر را تشکیل می‌دادند. به نظر می‌رسد زمانی که تخریب یا اختلال قابل ملاحظه‌ای در یادگیری رخ داده باشد، اثرات مثبت ورزش برجسته‌تر می‌باشد.

القای رهایی عامل رشد عصبی مشتق شده از مغز<sup>۱</sup> (BDNF) و عامل رشد شبه انسولینی-۱ (IGF-1) از جمله سازوکارهای شناخته شده در بهبود عملکرد شناختی به دنبال تمرینات هوازی می‌باشد که به موجب آن تغییرات ساختاری و ارتباطی در مناطقی از مغز از جمله هیپوکمپ ایجاد می‌شود [۲۴،۲۳]. به‌طور جالب، تمامی فرایندهای رگ‌زایی، نورون‌زایی و سیناپس‌زایی که در بهبود یادگیری و حافظه به‌واسطه ورزش نقش دارند، نیازمند تأمین انرژی فراوان از سوی میتو‌کندری‌های سلول‌های عصبی می‌باشند. در واقع، اختلالات میتو‌کندریایی به عنوان یکی از فرضیه‌های رایج در فرایند پیری مطرح بوده [۳] و شواهد زیادی نشان می‌دهند که اختلال در پویایی میتو‌کندریایی و عدم تعادل بین شکافت و همجوشی میتو‌کندریایی در پیری و بیماری‌های عصبی مرتبط با پیری دخیل است [۸].

اخیراً نشان داده شده است که پویایی میتو‌کندریایی در طول پیری فیزیولوژیک تغییر می‌یابد، بدین‌صورت که قطعه‌قطعه شدن میتو‌کندری‌ها و بیان Drp1 افزایش می‌یابد و این حالت هموستاز سلول‌های بنیادی را متأثر می‌سازد. چنین اثراتی می‌تواند بشدت با تخریب بافت ناشی از پیری مرتبط باشد [۲۵]. همچنین، مطالعه‌ای دیگر بیان داشته است که افزایش همجوشی میتو‌کندریایی محرک اصلی بقا نیست، اما برای زنده ماندن حیوانات مسن در طول عمر طبیعی خود ضروری می‌باشد [۲۶]. به‌طور جالب، مداخله

تمرین هوازی ما توانست میزان بیان Drp1 در بافت هیپوکمپ حیوانات پیر را کاهش دهد. همچنین، میزان بیان OPA1 به شکل معنی‌دار و میزان بیان Mfn2 به شکل غیرمعنی‌دار در اثر اجرای تمرینات هوازی در هیپوکمپ افزایش یافت. با این حال، عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئینی این متغیرها که از محدودیت‌های مطالعه حاضر بشمار می‌رود، تفسیر آن را دشوار می‌سازد. در همین زمینه، کو و همکاران بهبود عملکرد شناخت فضایی را به دنبال ۶ هفته تمرین شنا در رت‌های پیر نشان دادند که با کاهش سطوح افزایش یافته Drp1 و Mfn2 در هیپوکمپ همراه بود [۱۳]. یکی از دلایل احتمالی اختلاف در مورد تغییرات بیان Mfn2 هیپوکمپ بدنال تمرینات ورزشی (افزایش بیان آن در مطالعه حاضر در برابر کاهش بیان آن در مطالعه کو و همکاران) را می‌توان در روش القای پیری و میزان پایه بیان این ژن جستجو کرد؛ در مطالعه مذکور از تزریق D-گالاکتوز به رت‌های ۸ هفته‌ای برای القای پیری استفاده شده بود که احتمالاً موجب تحریک همزمان شکافت و همجوشی میتو‌کندریایی در هیپوکمپ شده است، در حالی که در مطالعه حاضر از رت‌های پیر طبیعی استفاده گردید.

به‌طور کلی، به نظر می‌رسد که تمرین هوازی می‌تواند عملکرد میتو‌کندری‌های مغز را از طریق تعدیل فرایندهای همجوشی و شکافت بهبود بخشیده و به عنوان یک روش غیردارویی موثر برای مقابله با اختلالات یادگیری و حافظه در پیری در نظر گرفته شود.

### ملاحظات اخلاقی

همه مراحل مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.TMU.REC.1399.124 انجام شد.

<sup>1</sup> Brain-derived Neurotrophic Factor

<sup>2</sup> Insulin-like Growth Factor-1

**تشکر و قدردانی**

می‌باشد. از پرسنل محترم بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاری در اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

این پژوهش با هزینه شخصی انجام شده است. مقاله حاضر نیز برگرفته از رساله آقای احمد فاضلی ثانی با عنوان «تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر پویایی میتوکندریایی در بافت هیپوکمپ رت‌های نر ویستار مبتلا به بیماری آلزایمر»، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

**تعارض منافع**

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

**References**

- 1- Baker LD, Bayer-Carter JL, Skinner J, Montine TJ, Cholerton BA, Callaghan M, et al. High-intensity physical activity modulates diet effects on cerebrospinal amyloid- $\beta$  levels in normal aging and mild cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.* 2012 Aug;28(1):137-46.
- 2- Rolland Y, van Kan GA, Vellas B. Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin Geriatr Med.* 2010 Nov;26(1):75-87.
- 3- Harman D. The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *J. Gerontol.* 1965; 20(2):151-3.
- 4- Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008 Mar;22(12):1577-90.
- 5- Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2020 Aug;186:1-13.
- 6- Youle RJ, Van Der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-5.
- 7- Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(1):11-24.
- 8- Reddy PH. Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxid Redox Signa.* 2007 Mar;9(10):1647-58.
- 9- Intlekofer KA, Cotman CW. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 2013 Nov;57:47-55.
- 10- Joseph AM, Adihetty PJ, Leeuwenburgh C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *J Physiol.* 2016 Aug;594(18):5105-23.
- 11- Schönfeld P, Reiser G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy?-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Jun;33(10):1493-9.
- 12- Gusdon AM, Callio J, Distefano G, O'Doherty RM, Goodpaster BH, Coen PM, et al. Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice. *Exp Gerontol.* 2017 Dec;90:1-13.
- 13- Kou X, Li J, Liu X, Chang J, Zhao Q, Jia S, et al. Swimming attenuates d-galactose-induced brain aging via suppressing miR-34a-mediated autophagy impairment and abnormal mitochondrial dynamics. *J Appl Physiol.* 2017 Mar;122(6):1462-9.
- 14- Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, et al. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiol Dis.* 2012 Dec;45(3):1153-62.
- 15- Khodadadi D, Gharakhanlou R, Naghdi N, Salimi M, Azimi SM, Shahed A. The effect of 4 weeks of exercise preconditioning on soluble amyloid beta level and memory impairment in rats with Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 1-42 injection. *Razi J Med Sci.* 2018 Jun;24(165):74-84.

- 16- Khodadadi D, Gharakhanlou R, Naghdi N, Salimi M, Azimi M, Shahed A, et al. Treadmill exercise ameliorates spatial learning and memory deficits through improving the clearance of peripheral and central amyloid-beta levels. *Neurochem Res.* 2018 Jun;43(8):1561-74.
- 17- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 Aug;29(9):e45-e.
- 18- Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *Jama.* 2008 Feb;300(9):1027-37.
- 19- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *Jama.* 2009 Feb;302(6):627-37.
- 20- He XF, Liu DX, Zhang Q, Liang FY, Dai GY, Zeng JS, et al. Voluntary exercise promotes glymphatic clearance of amyloid beta and reduces the activation of astrocytes and microglia in aged mice. *Front Mol Neurosci.* 2017 May 19;10:144.
- 21- Wang S, Chen L, Zhang L, Huang C, Xiu Y, Wang F, et al. Effects of long-term exercise on spatial learning, memory ability, and cortical capillaries in aged rats. *Med Sci Mon Int Med J Exp Clin Res.* 2015 Aug; 21:945.
- 22- Khorshidahmad T, Tabrizian K, Vakilzadeh G, Nikbin P, Moradi S, Hosseini-Sharifabad A, et al. Interactive effects of a protein kinase AII inhibitor and testosterone on spatial learning in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2012 Jun;228(2):432-9.
- 23- Enette L, Vogel T, Fanon JL, Lang PO. Effect of interval and continuous aerobic training on basal serum and plasma brain-derived neurotrophic factor values in seniors: a systematic review of intervention studies. *Rejuvenation Res.* 2017 Nov;20(6):473-83.
- 24- Maass A, Düzel S, Brigadski T, Goerke M, Becke A, Sobieray U, et al. Relationships of peripheral IGF-1, VEGF and BDNF levels to exercise-related changes in memory, hippocampal perfusion and volumes in older adults. *Neuroimage.* 2016 Aug;131:142-54.
- 25- Amartuvshin O, Lin CH, Hsu SC, Kao SH, Chen A, Tang WC, et al. Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. *Aging Cell.* 2020 Oct:e13191.
- 26- Chaudhari SN, Kipreos ET. Increased mitochondrial fusion allows the survival of older animals in diverse *C. elegans* longevity pathways. *Nat Commun.* 2017 Jun;8(1):1-16.