

The Effect of 4 Weeks of Aerobic Training on Cognitive Function and Expression Level of PGC1 α and VEGF Genes in the Hippocampus of Rats with Alzheimer's Disease

Ahmadpour E, Peeri M*, Azarbaijani MA

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

* *Corresponding author.* Tel: +982122481621, Fax: +982122481621, E-mail: m.peeri@iauctb.ac.ir

Received: Apr 19, 2022

Accepted: Jun 14, 2022

ABSTRACT

Background & objective: Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia among the elderly, threatening their quality of life. On the other hand, regular exercise is associated with improved brain health and cognitive function. However, the mechanisms of these benefits have not yet been fully elucidated. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of 4 weeks of moderate intensity interval aerobic training on cognitive function and expression level of PGC1 α and VEGF genes in the hippocampus of old rats with AD.

Methods: For this purpose, 20-month-old male Wistar rats were divided into three groups of AD (n=8), AD+exercise training (n=8) and control (n=8). Intra-hippocampal injection of A β ₄₂ was used to induce AD. The animals in the exercise group performed moderate-intensity interval aerobic exercise for 4 weeks, 5 days a week. To assess spatial learning and memory, the animals underwent the Morris water maze test 48 hours following the last training session. Then, the animals were killed and hippocampal tissue was extracted. Real time-PCR method was used to measure gene expression. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance and Pearson correlation coefficient at the significance level of $p \leq 0.05$.

Results: The results showed that A β ₄₂ injection impaired spatial learning and memory function and reduced the expression level of PGC1 α and VEGF genes in hippocampal tissue ($p \leq 0.05$). Aerobic exercise improved spatial learning and memory function and increased PGC1 α and VEGF genes expression ($p \leq 0.01$). Also, a significant positive relationship was observed between the PGC1 α and VEGF gene expression levels in the hippocampus ($r = 0.859$, $p \leq 0.01$). In addition, there was a significant inverse relationship between PGC1 α and VEGF genes expression and the mean time spent to find the platform ($r = -0.9$, $p \leq 0.01$ and $r = -0.750$, $p \leq 0.01$, respectively), and a significant positive relationship with the time spent in the target quadrant ($r = -0.794$, $p \leq 0.01$ and $r = -0.632$, $p \leq 0.01$, respectively).

Conclusion: In general, aerobic training improves spatial learning and memory performance in old animals with AD; up-regulation of the exercise-induced PGC1 α /VEGF pathway in the brain, at least in part, appears to be involved in this adaptation.

Keywords: Alzheimer's Disease; Spatial Learning and Memory; Aerobic Exercise; PGC1 α ; VEGF

تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر یادگیری و حافظه فضایی و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در هیپوکمپ رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر

انسبه احمدپور، مقصود پیری*، محمدعلی آذربایجانی

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۲۲۴۸۱۶۲۱ فاکس: ۰۲۱۲۲۴۸۱۶۲۱ پست الکترونیک: m.peeri@iauctb.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر شایع‌ترین علت زوال عقل در میان افراد مسن است که کیفیت زندگی آنان را تهدید می‌کند. از سوی دیگر، تمرینات ورزشی منظم با سلامت مغز و بهبود عملکردهای شناختی همراه است. با این حال، سازوکارهای این مزایا هنوز به طور کامل تبیین نشده است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر عملکرد شناختی و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در هیپوکمپ رت‌های پیر مبتلا به بیماری آلزایمر انجام شد.

روش کار: رت‌های نر نژاد ویستار ۲۰ ماهه به ۳ گروه بیماری آلزایمر (تعداد = ۸ سر)، بیماری آلزایمر + تمرین ورزشی (تعداد = ۸ سر) و کنترل (تعداد = ۸ سر) تقسیم شدند. جهت القای بیماری آلزایمر از تزریق داخل هیپوکمپی A β ₄₂ استفاده شد. حیوانات گروه ورزشی، تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط را به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته انجام دادند. جهت بررسی یادگیری و حافظه فضایی، حیوانات ۸ ساعت بدنبال آخرین جلسه تمرینی تحت آزمون مازآبی موریس قرار گرفتند. سپس، حیوانات کشته شدند و بافت هیپوکمپ استخراج شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن از روش Real time-PCR استفاده شد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و ضریب همبستگی پیرسون در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ صورت پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق A β ₄₂ باعث اختلال در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی شده و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در بافت هیپوکمپ را کاهش می‌دهد ($p \leq 0/05$). تمرین هوازی باعث بهبود در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی شد و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF را افزایش داد ($p \leq 0/01$). همچنین، ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان ژن PGC1 α با بیان ژن VEGF در هیپوکمپ مشاهده شد ($r = 0/859$, $p \leq 0/01$). به علاوه، بین بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF با میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو ارتباط معکوس معنی‌دار (به ترتیب، $r = -0/900$, $p \leq 0/01$ و $r = -0/750$, $p \leq 0/01$)، و با مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف ارتباط مثبت معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب $r = 0/794$ و $r = 0/632$, $p \leq 0/01$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی، تمرین هوازی موجب بهبود عملکرد یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات پیر مبتلا به بیماری آلزایمر می‌شود؛ به نظر می‌رسد که تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی PGC1 α /VEGF ناشی از ورزش در مغز، حداقل تا بخشی، در این سازگاری نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری آلزایمر، یادگیری و حافظه فضایی، ورزش هوازی، PGC1 α , VEGF

دریافت: ۱۴۰۱/۱/۳۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۴

مقدمه

پیری عامل خطر مهمی برای بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت و زوال عقل محسوب می‌شود که یکپارچگی بدن و مغز را به مخاطره می‌اندازد. بیماری آلزایمر^۱ شایع‌ترین علت زوال عقل در میان افراد مسن است که به وسیله آتروفی پیشرونده در نواحی مختلف مغز، کاهش ادراک و از دست دادن حافظه و ناتوانی در انجام کارهای روزمره تظاهر می‌یابد [۱]. بر اساس آخرین گزارش سازمان ملل متحد، جمعیت بالای ۶۰ سال جهان در سال ۲۰۱۷ نزدیک به یک میلیارد نفر بوده است. با افزایش امید به زندگی، پیری جمعیت برای هر کشور یک مسئله مهم محسوب خواهد شد. در این میان، بیماری‌های عصبی ناشی از افزایش سن به طور جدی کیفیت زندگی سالمندان را تهدید می‌کنند. تعداد افراد آسیب دیده ممکن است تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۱۰۰ میلیون نفر افزایش یابد [۲]. درمان‌های کنونی به دلیل سازوکارهای مولکولی نامشخص در پاتوژنز بیماری آلزایمر نمی‌توانند مانع پیشرفت این بیماری شده یا آن را کند نمایند. بنابراین، توسعه یک استراتژی موثر برای به تأخیر انداختن روند پیری و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با آن یک مشکل فوری بشمار می‌رود.

اختلال در عملکرد عروقی نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر و سایر اشکال زوال عقل دارد. بسیاری از شرایطی که باعث تغییر ساختار عروقی و اختلال در عملکرد عروقی می‌شوند، از جمله فشار خون بالا، چاقی، دیابت نوع ۲ و آترواسکلروز، عوامل خطر اولیه برای بیماری آلزایمر و سایر دمانس‌ها بشمار می‌روند [۳]. علاوه بر این، هم بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر و هم مدل‌های موش این بیماری کاهش جریان خون مغز (CBF) را به میزان ۱۰-۳۰ درصد نشان می‌دهند که از مراحل اولیه پاتوژنز بیماری شروع شده و در طول پیشرفت بیماری ادامه می‌یابد [۴، ۵]. همچنین

شواهدی وجود دارد که در میان جمعیت AD، اختلال شدیدتر CBF با عملکرد شناختی ضعیف‌تر همراه است [۶].

آنژیوژنز^۲ به معنی افزایش چگالی مویرگ‌های عضله اسکلتی، قلبی و مغز است. ایجاد مویرگ جدید نیازمند تکثیر و مهاجرت سلول‌های آندوتلیال مویرگی می‌باشد [۷]. فاکتورهای رشد زیادی در فرایند آنژیوژنز درگیر هستند، اما اکثر مطالعات از فاکتور رشد آندوتلیال عروقی^۳ (VEGF) به عنوان مهمترین فاکتور درگیر در این فرآیند نام برده‌اند [۸]. با توجه به اثرگذاری VEGF در خونرسانی و مشاهده نقص خونرسانی مغز در پیری [۹] و بیماری آلزایمر [۱۰]، به نظر می‌رسد که VEGF یکی از عوامل اصلی درگیر در این شرایط باشد. نشان داده شده است که کاهش وابسته به سن در ظرفیت آنژیوژنز مغزی با کاهش بیان VEGF مرتبط است [۱۱]. همچنین، نتایج مطالعات حاکی از اثرات تحریکی VEGF بر آکسون‌زایی، تحریک رشد و بقای سلول‌های شوان در شرایط هایپوکسی، افزایش و تکثیر مهاجرت آستروسیت‌ها و میکروگلیاها و همچنین تقویت نورون‌زایی و اثرات تروفیک بر نورون‌ها و گلیاها در CNS و PNS می‌باشد که به نظر می‌رسد VEGF علاوه بر اثرات آنژیوژنزی و سلامت عروق، به عنوان یک فاکتور مهم دارای اثرات محافظتی و تروفیکی برای نورون‌ها بشمار می‌رود [۱۲].

از سوی دیگر، مداخلات دارویی و غیردارویی که بتوانند اختلال در عملکرد قلب و عروق مرتبط با سن را کاهش دهند، ممکن است فراهمی CBF را بهبود بخشیده و در نتیجه خطر نقص شناختی را کاهش دهند. در همین راستا، مطالعات قبلی مزایای بالقوه تمرینات هوازی بر عملکرد شناختی را نشان داده‌اند [۱۳]. فعالیت ورزشی اثرات مفیدی بر سلامت مغز و عملکرد شناختی دارد و اثرات مخرب بیماری‌های

^۲ Angiogenesis^۳ Vascular Endothelial Growth Factor^۱ Alzheimer's Disease

غذای استاندارد، محدودیتی نداشتند. بدنبال 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، حیوانات به روش تصادفی ساده به ۳ گروه بیماری آلزایمر (تعداد= ۸ سر)، بیماری آلزایمر + تمرین ورزشی (تعداد= ۸ سر) و کنترل (تعداد= ۸ سر) تقسیم شدند. لازم به توضیح است که برآورد حجم نمونه و گروه‌بندی رت‌ها به صورت تجربی و با توجه به مطالعات پیشین انجام شد. همه مراحل مربوط به کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.CTB.REC.1400.013 انجام شد.

جهت القای بیماری آلزایمر از تزریق داخل هیپوکمپی $A\beta_{42}$ استفاده شد. برای آماده‌سازی $A\beta$ ابتدا پپتید $A\beta_{42}$ (Abcam, USA) در محلول بافر DMSO ۳ درصد (Sigma Aldrich, USA) با غلظت ۵ میکروگرم/میکرولیتر حل و سپس در مقادیر ۳۰ میکرولیتر به ازای هر ویال تقسیم و در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. محلول آمیلوئیدتا به مدت ۷ روز در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد تا بتا آمیلوئید به شکل فیبریل درآید [۱۷]. رت‌ها به دنبال استراحت شبانه توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس، سر حیوانات در دستگاه استریوتاکس ثابت و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی جمجمه، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون [۱۸]. حفره‌هایی در موقعیت ۳/۸ عقب برگما (AP)، ۲/۲ میلی‌متر در طرفین شکاف طولی و ۲/۷ میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه ایجاد و تزریق درون هیپوکمپی $A\beta_{42}$ (هر طرف ۱ میکرولیتر) در ناحیه دنتال‌جایروس^۳ توسط سرنگ همیلتون صورت پذیرفت [۱۹]. به منظور بررسی القای مدل بیماری آلزایمر، تعداد ۱۴ سر رت

عصبی مانند بیماری آلزایمر، پارکینسون و افسردگی را کاهش می‌دهد [۱۴]. آثار مثبت فعالیت ورزشی بر مغز بیشتر در نواحی هیپوکمپ و شکنج دندانه‌ای^۱ مشاهده می‌شود و شامل افزایش جریان خون و اندازه هیپوکمپ در انسان‌ها، تغییرات مورفولوژیکی در دندریت و برآمدگی‌های دندریتی^۲، افزایش پلاستیسیته سیناپسی و نورونز در حیوانات با شیوه‌های مختلف تمرینات ورزشی می‌باشد [۱۵]. با این که مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند VEGF به دنبال تمرینات هوازی افزایش می‌یابد، با این حال سازوکار دقیق این امر به طور کامل شناخته نشده است. نشان داده شده است که ورزش از طریق افزایش $PGC1\alpha$ بیان VEGF و آنژیونز را در عضله اسکلتی به صورت مثبت تنظیم می‌کند [۱۶]. با این حال، تغییرات احتمالی ناشی از ورزش هوازی در $PGC1\alpha$ و VEGF در مغز حیوانات پیر مبتلا به بیماری آلزایمر هنوز مطالعه نشده است. همچنین، اینکه آیا تنظیم مثبت ناشی از ورزش در این عوامل می‌تواند موجب عملکرد شناختی بهتر در شرایط بیماری آلزایمر شود، به طور کامل تبیین نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر یادگیری و حافظه فضایی و میزان بیان ژن‌های $PGC1\alpha$ و VEGF در هیپوکمپ رت‌های نر ویستار مبتلا به بیماری آلزایمر انجام شد.

روش کار

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل می‌باشد. به این منظور، تعداد ۲۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۲۰ ماهه از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رت‌ها در دمای محیطی 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند، به گونه‌ای که در دسترسی به آب و

^۱ Dentate Gyrus (DG)

^۲ Dendritic Spines

^۳ Dental Gyrus

جدای از حیوانات مطالعه اصلی (۷ سر رت با تزریق داخل هیپوکمپی $A\beta_{42}$ و ۷ سر رت به عنوان کنترل سالم)، ۱۰ روز به دنبال تزریق تحت آزمون رفتاری قرار گرفتند.

۷ روز بدنال جراحی، حیوانات گروه تمرین ورزشی، تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط را به مدت ۴ هفته انجام دادند. پروتکل تمرین هوازی به این صورت بود که رت‌ها روی نوارگردان با شیب صفر درجه، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته تمرین کردند. 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) انجام 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 شد. در هفته چهارم، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۳ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها تمرین کردند. رت‌های گروه تمرین در تمام جلسات تمرینی پیش 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 [۱۹،۲۰]. همچنین، حیوانات گروه کنترل همزمان با گروه تمرین و با مدت مشابه با آنها در معرض نوارگردان خاموش قرار گرفتند تا حفظ شرایط محیطی یکسان برای همه رت‌ها رعایت گردد.

برای بررسی عملکرد رفتاری رت‌ها شامل یادگیری و حافظه فضایی، از آزمون مازآبی موریس استفاده شد که ۴۸ ساعت بدنال آخرین جلسه تمرینی اجرا شد. دستگاه رفتاری از یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی تشکیل شده بود که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن پر از آب با دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم افزار Etho-7 و دوربینی که در بالای آن قرار می‌گرفت، ردیابی و ثبت می‌شد. روش آموزش ماز آبی به اینصورت بود:

الف) مرحله 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 ۳ گروه به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کارآزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم (جنوب‌شرقی) قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. در شروع هر کارآزمایی ابتدا به هر رت مدت ۱۵-۲۰ ثانیه اجازه استقرار روی سکو داده می‌شد. سپس، حیوان به طور تصادفی از یکی از چهار جهت اصلی داخل آب رها می‌شد. در این حالت، حیوان شنا می‌کرد تا سکوی پنهان زیر آب را پیدا کند و روی آن قرار گیرد. پس از پیدا کردن سکو، به حیوان اجازه داده می‌شد که به مدت ۲۰ ثانیه روی آن باقی بماند. مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان سکو را پیدا کند، در هر بار آموزش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد (تأخیر در رسیدن به سکو).

آزمون پروب (انتقال): یک‌روز بعد از آخرین روز اکتساب، حافظه فضایی رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، حیوانات در یک آزمون ۱ دقیقه‌ای 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 سفیدرنگ، مرئی شد و همسطح با آب قرار گرفت تا به صورت واضح دیده شود. سپس، حیوان شنا کرده تا سکوی سفید رنگ همسطح 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 [۱۷].

ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. سنتز cDNA به وسیله High-Capacity (Applied Biosystems) cDNA Reverse Transcription Kit و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free انجام شد.

واکنش زنجیره پلیمرز زمان واقعی^۱

برای اندازه گیری بیان ژن با استفاده از روش کمی Real time-PCR در ابتدای کار میزان غلظت پپینه 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 شرکت Green AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA به صورت Duplicate انجام گرفت. توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه بر اساس اطلاعات این ژن‌ها در بانک ژنی NCBI توسط شرکت پیشگام، ایران طراحی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است. 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 انلینگ پرایمرها هر سیکل به مدت ۳۰ ثانیه (۴۰ سیکل) در نظر گرفته شد. از ژن گلیسر آلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز^۲ (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده شد و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد [۲۱].

۲۴ ساعت بعد از آزمون رفتاری، ۷ سر رت از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب شده و با تزریق مخلوط کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس، سر حیوان بوسیله دستگاه گیوتین جدا و مغز آن به صورت سالم بیرون آورده شد. پس از آن، بافت هیپوکمپ با دقت روی یخ استخراج شد و در نیتروژن ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکمپ جهت استخراج RNA تام در ۱ میلی‌لیتر TRIzol-Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول به مدت ۲-۳ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میکروتیوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس، در ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شست و شو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل گردید. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ سنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۲/۱-۱/۸ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA، تعدادی از RNAs تخلیص شده به طور تصادفی روی

^۱ Real Time-PCR

^۲ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر

Primer (5' → 3')	Gene	Forward/Reverse
TCAGCGGTCTTAGCACCTA TCTCTGTGGGTTTGGTGTGA	<i>PGC1α</i>	F R
ATGAACCTTTCTGCTCTCTGGGT AAGCTGCCTCGCCTTGCAACGCG	<i>VEGF</i>	F R
AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG CATACTCAGCACCAGCATCACC	<i>GAPDH</i>	F R

حیوانات گروه بیماری آلزایمر به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). همچنین، گروه بیماری آلزایمر + تمرین ورزشی در مقایسه با گروه بیماری آلزایمر به طور معنی‌داری عملکرد بهتری داشتند ($p < 0.01$) (نمودار ۱ ب).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه برای بررسی حافظه فضایی حیوانات نشان داد که زمان صرف شده در ربع دایره هدف برای گروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت است ($F=35/41$, $p < 0.01$). مدت‌زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه بیماری آلزایمر به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). همچنین، حیوانات مبتلا به بیماری آلزایمر که تمرین ورزشی را انجام داده بودند، در مقایسه با گروه بیمار به طور معنی‌دار عملکرد بهتری در آزمون حافظه داشتند ($p < 0.01$) (نمودار ۱ ج).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین میزان بیان *PGC1α* هیپوکمپ در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($F=20/94$, $p < 0.01$). میزان بیان *PGC1α* در گروه بیماری آلزایمر به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود ($p < 0.01$). همچنین، حیوانات بیماری که تمرین ورزشی انجام داده بودند در مقایسه با گروه بیماری آلزایمر میزان بیان *PGC1α* بالاتری را تجربه کردند ($p < 0.01$) (نمودار ۲).

بین میزان بیان *VEGF* هیپوکمپ در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد

طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. تحلیل داده‌های یادگیری و حافظه فضایی و همچنین متغیرهای بیان ژن با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و در صورت نیاز آزمون تعقیبی توکی انجام پذیرفت. همچنین، ارتباط بین متغیرها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون بررسی شد. معنی‌داری بین متغیرها در سطح $p \leq 0.05$ مورد توجه قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism-8 و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel-2016 استفاده شد.

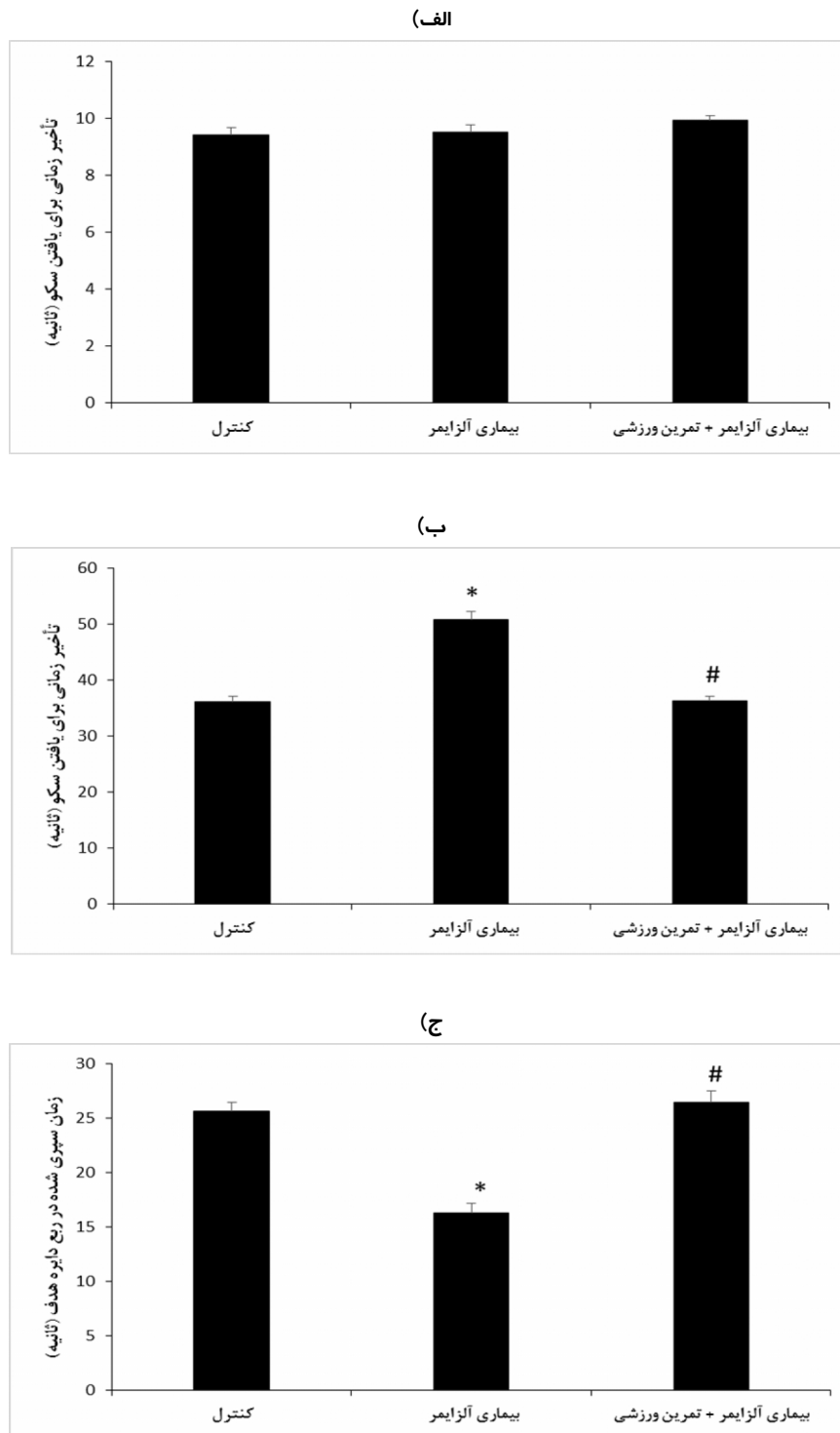
یافته‌ها

یافته‌های مطالعه پایلوت نشان داد که یادگیری و حافظه فضایی حیواناتی که تحت درمان با $A\beta_{42}$ قرار گرفته بودند، به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($p < 0.01$). این مشاهده تاییدکننده القای مدل بیماری آلزایمر در مطالعه حاضر بود (اطلاعات گزارش نشده).

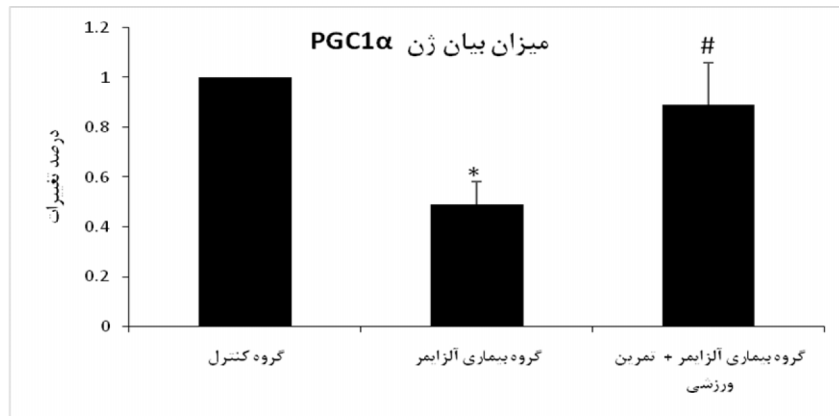
در اجرای آزمون سکوی آشکار تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت ($p = 0.237$) (نمودار ۱ الف). نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه نشان داد که میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در طی ۴ روز مرحله یادگیری برای گروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت است ($p < 0.01$), $F=61/09$). میانگین تأخیر زمانی برای یافتن سکو در

تمرین ورزشی انجام داده بودند در مقایسه با گروه بیماری آلزایمر میزان بیان VEGF بالاتری را نشان دادند ($p=0/002$) (نمودار ۳).

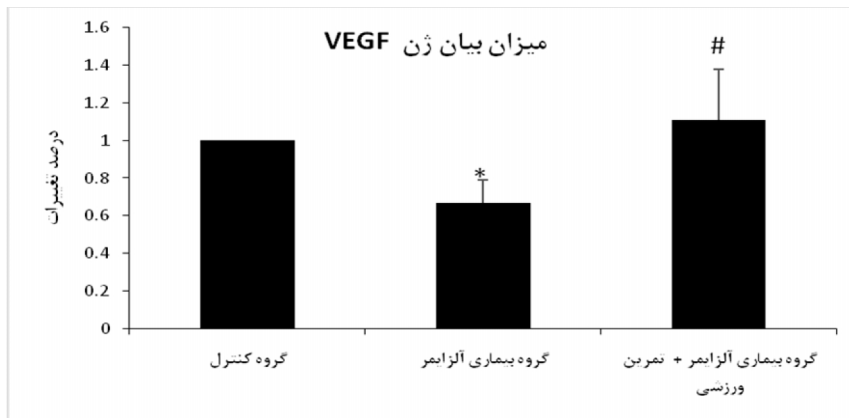
میزان بیان VEGF در گروه بیماری آلزایمر به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p=0/023$). همچنین، حیوانات بیماری که



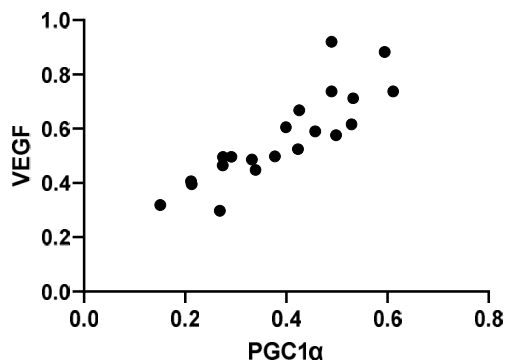
نمودار ۱. الف) میانگین تأخیر زمانی برای یافتن سکو در آزمون آشکار؛ ب) میانگین تأخیر زمانی برای یافتن سکو در مرحله یادگیری ج) مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف در آزمون پروب. * $p \leq 0/001$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل؛ # $p \leq 0/001$ تفاوت معنی‌دار با گروه بیماری آلزایمر



نمودار ۲. میزان بیان ژن PGC1α در گروه‌های مطالعه. * $P \leq 0.01$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل؛ # $P \leq 0.01$ تفاوت معنی‌دار با گروه بیماری آلزایمر



نمودار ۳. میزان بیان ژن VEGF در گروه‌های مطالعه. * $p \leq 0.05$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل؛ # $p \leq 0.01$ تفاوت معنی‌دار با گروه بیماری آلزایمر



نمودار ۴. ارتباط بین میزان بیان ژن‌ها ($r=0.859, p<0.001$)

نتایج آزمون تحلیل آماری پیرسون نشان داد که ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان ژن PGC1α با بیان ژن VEGF در هیپوکمپ وجود دارد ($p < 0.001$). همچنین، بین بیان ژن PGC1α (نمودار ۴)، $r=0.859$ با میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو ارتباط معکوس معنی‌دار ($r=-0.09, p < 0.001$)، و با مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف ارتباط مثبت معنی‌داری وجود داشت ($r=0.794, p < 0.001$). علاوه، بین بیان ژن VEGF با میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو ارتباط معکوس معنی‌دار ($p < 0.001$)، و با مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف ارتباط مثبت معنی‌داری مشاهده شد ($r=0.632, p=0.002$) (جدول ۲).

جدول ۲. ارتباط بین میزان بیان ژن‌ها با یادگیری و حافظه فضایی

متغیر	میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو		مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف	
	ضریب همبستگی (r)	مقدار معنی‌داری (p)	ضریب همبستگی (r)	مقدار معنی‌داری (p)
PGC1 α	-۰/۹۰۰	*۰/۰۰۱	۰/۷۹۴	*۰/۰۰۱
VEGF	-۰/۷۵۰	*۰/۰۰۱	۰/۶۳۲	*۰/۰۰۲

* همبستگی معنی‌دار در سطح $p \leq 0/01$

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر عملکرد یادگیری و حافظه فضایی و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در هیپوکمپ رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که القای بیماری آلزایمر عملکرد یادگیری و حافظه فضایی حیوانات را مختل می‌کند و میزان بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در بافت هیپوکمپ را کاهش می‌دهد. تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط افت عملکرد شناختی ناشی از تزریق A β_{42} را بهبود بخشید و بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در هیپوکمپ را به صورت مثبت تنظیم می‌کند. همچنین، همبستگی مثبت قوی بین بیان ژن PGC1 α با بیان ژن VEGF در هیپوکمپ مشاهده شد. بعلاوه، بین بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF با یادگیری و حافظه فضایی همبستگی قوی وجود داشت. این یافته‌ها از این اندیشه که تمرین هوازی از طریق تعدیل مسیر پیام‌رسانی PGC1 α /VEGF در مغز حیوانات پیر مبتلا به بیماری آلزایمر موجب بهبود یادگیری و حافظه فضایی می‌شود، حمایت می‌کنند. با این حال، عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئینی این متغیرها که از محدودیت‌های مطالعه حاضر بشمار می‌رود، تفسیر آن را دشوار می‌سازد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که یادگیری حیواناتی که تمرین هوازی انجام داده بودند در طی روزهای آموزش ماز آبی، با کاهش زمان صرف شده برای رسیدن به سکو، افزایش یافت؛ همسو با این یافته،

بهبود یادگیری فضایی در اثر تمرین ورزشی در موش‌های مبتلا به بیماری آلزایمر گزارش شده است [۲۲،۲۳]. از سوی دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین هوازی حافظه فضایی را نیز در رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر بهبود می‌بخشد. اثرات سودمند تمرین ورزشی بر حافظه فضایی پیشتر گزارش شده است [۱۹،۲۴]. با این حال، سازوکارهای تنظیمی این سازگاری‌های ناشی از ورزش هوازی هنوز به طور کامل تبیین نشده است. نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که تمرینات هوازی مورفولوژی عروق را تغییر داده و موجب آنژیوژنز می‌شود که در نتیجه جریان خون ارگان بهبود می‌یابد [۲۵]. به نظر می‌رسد که یکی از این ساز و کارها تعدیل مسیر پیام‌رسانی PGC1 α /VEGF باشد که نقش مهمی در فرآیندهای آنژیوژنز و نوروژنز ایفا می‌کند. پیشتر نشان داده شده بود که ورزش از طریق افزایش PGC1 α بیان VEGF و آنژیوژنز در عضله اسکلتی را به صورت مثبت تنظیم می‌کند [۱۶]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط می‌تواند موجب افزایش بیان ژن‌های PGC1 α و VEGF در بافت هیپوکمپ رت‌های پیر در شرایط بیماری آلزایمر شود.

افزایش بیان ژن PGC1 α مشاهده شده در مغز و در شرایط بیماری آلزایمر با مطالعه عظیمی و همکاران [۲۳]. همخوانی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی هوازی با افزایش بیان PGC1 α منجر به تحریک بیوژنز میتوکندری در عضلات اسکلتی [۲۶] و نواحی مختلف مغز می‌شود [۲۷]. به نظر می‌رسد

که فعالیت ورزشی هوازی با افزایش عملکرد و فعالیت نوروهای هیپوکمپ، منجر به افزایش کلسیم درون سلولی در این نوروها شده و در نتیجه از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی مختلف، افزایش پلاستیسیته سیناپسی را موجب می‌شود [۲۸]. با این حال، این که فعالیت ورزشی دقیقاً با چه سازوکاری و با تحریک چه عناصری موجب افزایش بیان $PGC1\alpha$ در هیپوکمپ می‌شود، هنوز به طور کامل تبیین نشده است. نقش عوامل متابولیکی از جمله پروتئین متصل‌شونده به عنصر پاسخ به $cAMP$ (CREB) و پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات^۲ (AMPK) به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی بیان $PGC1\alpha$ [۲۹،۳۰] در افزایش ناشی از ورزش هوازی در بافت هیپوکمپ بسیار محتمل است و پیشنهاد می‌شود این موضوع در حیوانات طبیعی و شرایط بیماری آلزایمر در مطالعات آینده مورد بررسی قرار بگیرد.

همسو با نتایج این مطالعه، ویبولوراکول و پاتومراج^۳ [۱۱]، رضایی و همکاران [۳۱] و زارع‌زاده و همکاران [۳۲] افزایش بیان ژن VEGF در مغز را گزارش کرده‌اند. ویبولوراکول و همکاران نشان دادند که هشت هفته تمرین هوازی می‌تواند تغییرات میکروواسکولار و هیپوپرفیوژن ناشی از افزایش سن را بواسطه تنظیم مثبت در بیان VEGF و eNOS بهبود بخشد [۱۱]. رضایی و همکاران نشان دادند که هشت هفته تمرین تناوبی مداوم یا تمرین با شدت بالا می‌توانند میزان پروتئین‌های VEGF-A و VEGFR2 را افزایش دهند [۳۱]. زارع‌زاده و همکاران گزارش کردند که هشت هفته تمرین هوازی می‌تواند با تنظیم مثبت بیان $VEGF.HIF-1\alpha$ و VEGFR2 و کاهش سطح آنژیوستاتین، مسیر پیام‌رسانی VEGF در بافت هیپوکمپ را در شرایط بیماری آلزایمر فعال

نماید [۳۲]. دینگ^۴ و همکاران با بررسی اثر یک، سه و شش هفته تمرین هوازی روی ترمیم بر سطوح mRNA فاکتورهای آنژیوژنز از جمله VEGF، آنژیوپوپتین ۱ و ۲ و ارتباط آن با چگالی مویرگی و کاهش حجم آسیب ناشی از سکته گزارش کردند که چگالی مویرگی در هفته سوم در پی افزایش سطوح mRNA فاکتورهای VEGF و آنژیوپوپتین ۱ و ۲ افزایش می‌یابد و این تغییرات با کاهش حجم آسیب ناشی از سکته مغزی همراه است [۳۳]. اخیراً، کاراکیلیچ^۵ و همکاران نشان دادند که شش هفته ورزش هوازی منظم باعث افزایش سطح VEGF در عضلات نعلی و دوقلو می‌شود که با سطح VEGF هیپوکمپ و عملکرد یادگیری و حافظه مرتبط است [۳۴]. افزایش آنژیوژنز ناشی از ورزش هوازی در بیشتر مطالعات صورت گرفته در این زمینه گزارش شده است [۳۵،۳۶]. هنگامی که نیاز به اکسیژن در طول فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد، افزایش چگالی عروق خونی به بازگشت جریان خون کمک می‌کند تا اکسیژن بیشتری را به مغز تحویل دهد [۳۷]. افزایش مداوم در فعالیت عصبی همراه با تغییرات نوروشیمیایی به دنبال فعالیت ورزشی دلیل احتمالی تغییرات در عروق مغزی است. افزایش چگالی عروق خونی با کاهش مسافت انتشار، جریان خون کافی را در هنگام نیاز فراهم می‌سازد [۳۳]. VEGF نقش مرکزی در فرایندهای آنژیوژنز و واسکولوژنز ایفا می‌کند [۳۸]. همچنین VEGF می‌تواند به عنوان یک عامل رشد عصبی عمل کرده و در فرایند نوروژنز هیپوکمپ ناشی از ورزش درگیر شود [۳۹]. شواهدی وجود دارد که کمبود VEGF می‌تواند به بیماری‌های اختلال عملکرد عصبی از جمله بیماری آلزایمر منجر شود [۴۰]. نشان داده شده است که سطح VEGF و عملکرد شناختی به هم مرتبط هستند [۴۱،۴۲] و افزایش بیان VEGF در هیپوکمپ، عملکرد شناختی را

^۱ cAMP Response-Element-Binding Protein

^۲ Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase

^۳ Viboolvorakul

^۴ Ding

^۵ Karakilic

بهبود می‌بخشد [۴۲]. تزریق مسدودکننده گیرنده VEGF درون هیپوکمپ، عملکرد حافظه بلندمدت را کاهش داد [۴۳]. همراستا با یافته‌های مطالعات حاضر، این گزارشات پیشنهاد می‌کنند که سطوح بالاتر VEGF در مغز با بهبود در عملکرد شناختی همراه است.

به طور کلی، تمرین هوازی موجب بهبود عملکرد یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات پیر مبتلا به بیماری آلزایمر القاء شده با تزریق $A\beta_{42}$ می‌شود؛ به نظر می‌رسد که تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاری در اجرای این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را دارد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارضی در منافع اعلام نمی‌کنند.

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- β levels in normal aging and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*. 2012 Aug;28(1):137-46.
- 2- Bayod S, Felice P, Andrés P, Rosa P, Camins A, Pallàs M, et al. Downregulation of canonical Wnt signaling in hippocampus of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. 2015 Dec;36(2):720-9.
- 3- Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017 Feb;7:69-87..
- 4- Wiesmann M, Zerbi V, Jansen D, Lütjohann D, Veltien A, Heerschap A, et al. Hypertension, cerebrovascular impairment, and cognitive decline in aged $A\beta$ PP/PS1 mice. *Theranostics*. 2017 Mar;7(5):1277-1289
- 5- Dai W, Lopez OL, Carmichael OT, Becker JT, Kuller LH, Gach HM. Mild cognitive impairment and alzheimer disease: patterns of altered cerebral blood flow at MR imaging. *Radiology*. 2009 Mar;250(3):856-66
- 6- Nation DA, Wierenga CE, Clark LR, Dev SI, Stricker NH, Jak AJ, et al. Cortical and subcortical cerebrovascular resistance index in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):689-98.
- 7- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:464-78.
- 8- Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009 Apr;89(2):607-48.
- 9- Leeuwis AE, Smith LA, Melbourne A, Hughes AD, Richards M, Prins ND, et al. Cerebral blood flow and cognitive functioning in a community-based, multi-ethnic cohort: the SABRE study. *Front Aging Neurosci*. 2018 Sep;10:279.
- 10- Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis*. 2002;13(Suppl. 2):48-52.
- 11- Viboolvorakul S, Patumraj S. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed Res Int*. 2014;2014:230791.
- 12- Delezie J, Handschin C. Endocrin cross talk between skeletal muscle and the brain. *Front Neurol*. 2018;9:698.

- 13- Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, et al. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosom Med*. 2010 Apr;72(3):239-52.
- 14- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 2007 Sep;30(9):464-72.
- 15- Intlekofer KA, Cotman CW. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2013 Sep;57:47-55.
- 16- Arany Z, Foo S-Y, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature*. 2008 Feb;451(7181):1008-12.
- 17- 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 β 1-42 injection. *RJMS*. 2018 Winter;24(165):74-84. [Full text in Persian]
- 18- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: San Diego: Academic. 1998.
- 19- 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;43:1561-1574.
- 20- 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 Mar;45(3):1153-62.
- 21- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 Oct;29(9):e45.
- 22- Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis*. 2008 Apr;30(1):121-129.
- 23- Azimi M, Gharakhanlou R, Naghdi N, Khodadadi D, Heysieattalab S. Moderate Treadmill Exercise Ameliorates Amyloid- β -Induced Learning and Memory Impairment, Possibly via Increasing AMPK Activity and Up-regulation of the PGC-1 α /FNDC5/BDNF Pathway. *Peptides*. 2018 Apr;102:77-88.
- 24- He X-f, Liu D-x, Zhang Q, Liang F-y, Dai G-y, Zeng J-s, 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;10(144):1-14.
- 25- Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*. 2004 Sep;97(3):1119-28.
- 26- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Investig*. 2006 Mar;116(3):615-22.
- 27- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol*. 2011 Aug;111(4):1066-71.
- 28- Azimi SMA, Gharakhanlou R, Naghdi N, Khodadadi D, Zare zade Mehrizi AA. The effect of the forced treadmill running on genes expression of the PGC-1 α , FNDC5 and BDNF in hippocampus of male rats. *JPSBS*. 2019 Sep;7(14):91-101. [Full text in Persian]
- 29- Jodeiri Farshbaf M, Ghaedi K, Megraw TL, Curtiss J, Faradonbeh MS, Vaziri P, et al. Does PGC1 α /FNDC5/BDNF elicit the beneficial effects of exercise on neurodegenerative disorders? *Neuromolecular Med*. 2016 Mar;18(1):1-15.
- 30- Yu L, Yang SJ. AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α and nuclear respiratory factor 1 expression in rat visual cortical neurons. *Neuroscience*. 2010 Aug;169(1):23-38.
- 31- Rezaei R, Nourshahi M, Bigdeli M, Khodagholfi F, Haghparast A. Effect of eight weeks continues and HIIT exercises on VEGF-A and VEGFR-2 levels in stratum, hippocampus and cortex of wistar rat brain. *JOEPPA*. 2015 Autumn; 8(2): 1213-1221. [Full text in Persian]

- 32- Zarezadehmehrizi A, Hong J, Lee J, Rajabi H, Gharakhanlu R, Naghdi N, et al. Exercise training ameliorates cognitive dysfunction in amyloid beta-injected rat model: possible mechanisms of Angiostatin/VEGF signaling. *Metab Brain Dis.* 2021 Dec;36(8):2263-71.
- 33- Ding Y-H, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res.* 2006 Feb;3(1):15-23.
- 34- Karakilic A, Yuksel O, Kizildag S, Hosgorler F, Topcugil B, Ilgin R, et al. Regular aerobic exercise increased VEGF levels in both soleus and gastrocnemius muscles correlated with hippocampal learning and VEGF levels. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2021;81(1):1-9.
- 35- Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience.* 2003Jan;117(4):1037-46.
- 36- Kleim JA, Cooper NR, VandenBerg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res.* 2002 Apr;934(1):1-6.
- 37- Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Apr;376(2):248-51.
- 38- Liang D, Chang JR, Chin AJ, Smith A, Kelly C, Weinberg ES, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech Dev.* 2001 Oct;108(1-2):29-43.
- 39- Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2003 Nov;18(10):2803-12.
- 40- Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov-Dec;1762(11-12):1109-21.
- 41- Wang Y, Galvan V, Gorostiza O, Ataie M, Jin K, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 2006 Oct;1115(1):186-93.
- 42- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet.* 2004 Aug;36(8):827-35.
- 43- Pati S, Orsi SA, Moore AN, Dash PK. Intra-hippocampal administration of the VEGF receptor blocker PTK787/ZK222584 impairs long-term memory. *Brain Res.* 2009 Feb;1256:85-91.