

Effect of Four Weeks Exercise Prior Preparation before Alzheimer's Induction on the Levels of Nerve Growth Factor and Beta Amyloid in the Hippocampus of Wistar Male Rats

Atabak Shahed¹, Ali Asghar Ravasi^{2*}, Sirous Choubineh³, Davar Khodadadi⁴

1. Ph.D Student in Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Physical Education, Tehran University, Tehran, Iran.
4. Ph.D Student in Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 25 Oct 2017, Accepted: 7 Jan 2018

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the effect of four weeks exercise prior preparation before Alzheimer's induction on the levels of nerve growth factor and beta amyloid in the hippocampus of Wistar male rats

Materials and Methods: 84 male Wistar rats (8 weeks old) with a weighing average of 20 ± 195 grams from Pasteur Institute of Iran were prepared, and rats were randomly divided to two exercise (4 weeks aerobic training on a treadmill with a gradient of 0 degrees, 5 days a week for 4 weeks) and rest groups. Then, the rats of each group were randomly assigned to 3 sub groups of 14 numbers, injection A β 1-42, control, and non-injected. 48 hours after the last exercise session, injections into the hippocampus amyloid beta or Dimethyl sulfoxide were performed. Seven days after surgery, the rats of each group were randomly sacrificed or subjected to behavioral testing. To determine the levels of nerve growth factor and beta amyloid Sampling was performed from the hippocampus and plasma of animals, a Morris water maze test was used for spatial memory test. Kolmogorov-Smirnov test (KS) and analysis of variance were used to analyze the data.

Results: The results of one-way analysis of variance showed that there was a significant difference between the levels of amyloid of hippocampus and NGF in different groups. Also, the results of the probe test for spatial memory showed that the time spent on the target circle in the A β 1-42 injection group was significantly lower than the other groups ($p \leq 0.01$). Also, the exercise and exercise + sham groups had a significantly better performance than control group.

Conclusion: It seems that performing physical activity before induction of Alzheimer's in rats is a kind of countermeasures and preclampsia with physiological disorders and progression of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Amyloid beta, Exercise activity, Neural growth factor

*Corresponding Author:

Address: Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education, University of Tehran, Tehran, Iran.
Email: aaravasi@ut.ir

اثر ۴ هفته پیش آماده‌سازی ورزشی قبل از القای آلزایمر بر سطوح فاکتور رشد عصبی و آمیلوئید بتا در هیپوکمپ رت‌های نر نژاد ویستار

اتابک شاهد^۱، علی اصغر رواسی^{۲*}، سیروس چوبینه^۳، داور خدادادی^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲. استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۳، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ۴ هفته پیش آماده سازی ورزشی قبل از القای آلزایمر بر سطوح فاکتور رشد عصبی و آمیلوئید بتا در هیپوکمپ رت‌های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۸۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 20 ± 195 گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از انجام مراحل آشناسازی، رت‌ها به روش تصادفی ساده به دو گروه ورزش (۴ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان با شیب صفر درجه، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته) و استراحت تقسیم شدند. سپس، رت‌های هر گروه به سه زیرگروه ۱۴ تایی (تزریق $A\beta 1-42$ ، شم و بدون تزریق) تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، تزریق درون هیپوکمپ آمیلوئید بتا یا دی متیل سولفوکسید صورت پذیرفت. ۷ روز بعد از جراحی، رت‌های هر گروه به طور تصادفی یا قربانی شده، یا تحت آزمون رفتاری قرار گرفتند. برای تعیین سطوح آمیلوئید بتای ۱-۴۲ محلول و فاکتور رشد عصبی از هیپوکمپ و پلاسمای حیوانات نمونه برداری و برای آزمون حافظه فضایی از آزمون مازابی موریس استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (KS) و تحلیل واریانس استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین سطوح آمیلوئید بتای هیپوکمپ و فاکتور رشد عصبی در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت. هم‌چنین نتایج آزمون پروب برای بررسی حافظه فضایی نشان داد که زمان صرف در ربع دایره هدف در گروه تزریق $A\beta 1-42$ به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های دیگر بود ($P \leq 0.01$). به علاوه، گروه‌های ورزش و ورزش + شم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار عملکرد بهتری داشتند.

نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که انجام فعالیت بدنی قبل از القای آلزایمر در رت‌ها باعث نوعی فرآیند مقابله و پیش‌جبرانی با اختلالات فیزیولوژیکی و روند پیشرفت ناشی از این بیماری می‌شود.

واژگان کلیدی: آلزایمر، آمیلوئید بتا، فاکتور رشد عصبی، فعالیت ورزشی

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده تربیت بدنی، گروه فیزیولوژی ورزش

Email: aaravasi@ut.ir

مقدمه

امروزه در کشورهای صنعتی بیماری آلزایمر با سرعت هشدار دهنده در حال افزایش است (۱). شاخصه‌های اصلی این بیماری شامل تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی متشکل از رسوب آمورف پروتئین آمیلوئیدی بتا (A β) در خارج سلول و رشته‌های در هم تنیده داخل نورونی متشکل از رشته‌های حاوی فرم فسفریله پروتئین میکروتوبولی تائو (Tau) می‌باشد (۲). آمیلوئید بتا به وسیله جدا شدن از پروتئین پیش سازش توسط آنزیم‌های بتا و گاما سکریتاز تولید می‌شود. مقادیر زیادی از انواع ایزوفرم‌های ترکیبی آمیلوئید بتا مسئول پلاک‌های پیری موجود در بیماران دارای آلزایمر می‌باشد که عمده‌ترین بیماری تخریب کننده نورونی در افراد سالمند است (۳).

شکل و اتصال نورون‌ها در مغز بزرگسالان به شدت تحت تاثیر ارتباطات سلول به سلول و یا عوامل رشدی نورونی می‌باشد. بر همین اساس، نشان داده شده است که اعضای از خانواده‌های نوروتروفین‌ها در مورفولوژی دندریتی سیستم عصبی مرکزی تأثیرگذار هستند (۴). قبلاً مشخص شده است که فاکتور رشد عصبی (NGF)، ریخت شناسی دندریتی را از طریق اثر متقابل با مسیر سیگنالینگ ناچ (Notch) کنترل می‌کند. فعالیت Notch 1 و NGF متصل به P75 (عمده‌ترین گیرنده نوروتروفین) باعث بیش تنظیمی بیان ژن HES-1 (Homologs of the Enhancer-of-split) می‌شود. به هر حال، بیان سطوح بالای HES-1 با تعداد بالای پایانه‌های گابارژیک در نورون پس سیناپسی همبستگی دارد (۵).

آمیلوئید بتا و NGF در اتصال به گیرنده P75 با هم رقابت دارند که در نتیجه اتصال آمیلوئید بتا نورون دچار آپوپتوز می‌شود (۶). سایر رخدادهای سلولی مانند کاهش پیام‌های تحریکی و اختلال در تقویت طولانی مدت عصب (۷) نیز توسط آمیلوئید بتا افزایش پیدا می‌کند، اما چگونگی بروز این اتفاقات هنوز به طور کامل مشخص نشده است.

مطالعات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت جسمانی به طور بالقوه از طریق آثار آن بر نشانگر زیستی A β در مغز با کاهش خطر اختلال ادراکی و شیوع زوال عقلی همراه است (۸). شواهد گوناگون و نتایج متناقضی در مورد مقادیر NGF در بخش‌های مختلف سیستم عصبی وجود دارد. به گونه‌ای که فاریا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای مقادیر NGF بالاتری را در شکنج دنداندار بیماران آلزایمری مشاهده کردند و از طرفی هیچ تفاوتی بین سطوح NGF پلاسمایی بیماران آلزایمری با گروه کنترل یافت نشد (۹). اما در مطالعه‌ای دیگر، بلاسکو و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که سطوح NGF در مایع مغزی نخاعی افراد آلزایمری افزایش یافته بود (۱۰). با این وجود، جی سی و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که تزریق بین‌بطنی آمیلوئید بتا به مدت ۱۴ روز باعث کاهش بیان پروتئین NGF شد که ممکن است دلیل اختلالات عصبی در این مدل از موش‌های آلزایمری باشد (۱۱). اما در مطالعه‌ای دیگر، فریرا و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که در بیماران آلزایمری پس از ۱۲ ماه درمان توسط NGF اختلالات شناختی و سطوح آمیلوئید بتا در مایع مغزی نخاعی بیماران کاهش معناداری یافت (۱۲). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر، کواچس زاج و همکاران (۲۰۰۹) شش بیمار آلزایمری را به مدت ۱۲ ماه توسط NGF مورد درمان قرار دادند که نتایج کاهش آمیلوئید بتا را در مایع مغزی نخاعی نشان داد، در حالی که بعضی از بیماران شواهدی از آتروفی بخش‌هایی از مغز را نشان دادند و همچنین شواهدی از پروتئین‌های تاو فسفوریل شده (از عوامل پیش برنده آلزایمر) نیز مشاهده شد (۱۳). از طرفی دیگر، در مطالعات ورزشی نیز افزایش بیان NGF و همچنین کاهش آمیلوئید بتا مشخص شده است. بوخو و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای به بررسی نقش فعالیت بدنی ارادی بر روی NGF و فاکتور رشد نورونی مترشحه از مغز در هیپوکمپ موش‌های نر پرداختند که نتایج آن‌ها نشان داد هشت هفته تمرین اختیاری موجب افزایش بیان ژن این دو فاکتور در بخش هیپوکمپ موش‌ها شده است (۱۴) هم-چنین، در مطالعه‌ای دیگر فرانزونی و همکاران (۲۰۱۷) به

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، ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته به تمرین می‌پرداختند. 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 اجرا شد. در هفته سوم و چهارم به ترتیب سرعت و تعداد نوبت‌ها به سه و چهار نوبت افزایش یافت که با ۳ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آن‌ها به فعالیت پرداختند (۱۶). رت‌های گروه تمرین در تمام جلسات تمرینی پیش می‌شدند. سپس، رت‌های هر گروه به روش تصادفی ساده به سه زیرگروه ۱۴ تایی تقسیم شدند: تزریق $A\beta 1-42$ (AD)، کنترل و بدون تزریق.

به منظور آماده‌سازی پپتید $A\beta 1-42$ ، ابتدا $A\beta 1-42$ (Abcam, USA) در محلول بافر DMSO ۳ درصد (Sigma Aldrich, USA) با غلظت ۵ میکروگرم بر میکرولیتر حل شد و سپس در مقادیر ۳۰ میکرولیتر به ازای هر ویال تقسیم و در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محلول آمیلوئیدتا به مدت ۷ روز در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا بتا‌آمیلوئید به شکل فیبریل درآید (۱۷). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس، سر حیوانات در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی جمجمه، براساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۸)، حفره‌هایی در موقعیت $3/8$ عقب برگما (AP)، $2/2$ میلی‌متر در طرفین شکاف طولی و $2/7$ میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه ایجاد شد و تزریق درون هیپوکمپ آمیلوئیدتا (هر طرف ۱ میکرولیتر) توسط سرنگ همیلتون صورت پذیرفت. گروه کنترل نیز تمام مراحل آزمایشگاهی را همانند گروه تزریق $A\beta 1-42$ تجربه نمودند، با این تفاوت که در گروه ششم میزان ۱ میکرولیتر بافر DMSO در هر یک از هیپوکمپ‌ها تزریق شد. ۷ روز بعد از جراحی رت‌های هر گروه به طور تصادفی یا قربانی شده (۷ سر رت) یا تحت آزمون رفتاری (۷ سر

بررسی اثر فعالیت بدنی بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و بیان برخی ژن‌ها در بافت هیپوکمپ رت‌ها پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که ۶ هفته فعالیت بدنی بر روی تردمیل حیوانات باعث بهبود تعادل ردوکس و هم‌چنین افزایش بیان ژن NGF در بافت هیپوکمپ رت‌ها شد (۱۵). با توجه به تناقضات موجود در مورد میزان NGF در بافت هیپوکمپ و کمبود مطالعات در مورد عوامل ایجاد و پیش‌برنده بیماری آلزایمر که در انتها منجر شده است که تاکنون هیچ نوع درمان قطعی برای این بیماری یافت نشود و با توجه به این که تحقیقات گذشته در مورد نقش‌های فعالیت بدنی و به خصوص فعالیت بدنی هوازی یک عامل مفید در تنظیم بیان NGF می‌باشد، هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر تمرین هوازی قبل از القای آلزایمر بر NGF و سطوح آمیلوئید بتا در هیپوکمپ و عملکرد شناختی رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. آزمودنی‌های تحقیق حاضر را تعداد ۸۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 195 ± 20 گرم تشکیل می‌دادند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رت‌ها در دمای محیطی 3 ± 22 سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲-۱۲ ساعت نگهداری می‌شدند و در دسترسی به آب و غذای استاندارد محدودیتی نداشتند. تمام موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی این مطالعه بر اساس دستورالعمل مصوب کمیته اخلاق دانشکده صورت پذیرفت. 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 در ابتدا به دو گروه تقسیم شدند: گروه ورزش و گروه استراحت؛ گروه ورزش ۴ هفته تمرین هوازی را اجرا کردند و گروه استراحت همزمان با گروه تمرین و با مدت مشابه با

ترتیب که 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 داشته باشد. 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، بادیست به طرف آن هدایت می‌شد. مدت زمان پیدا کردن سکو (تاخیر در رسیدن به سکو) در هر بار آموزش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد (۲۰).

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 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 (۲۰).

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 کار آزمایی 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 سکودر هر بار آزمون اندازه‌گیری می‌شد. در صورتی که حیوان در این چهار کار آزمایی قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نبود، از گروه خود حذف می‌شد (۲۰). برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. هم‌چنین، آزمون لوین برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها به کار رفت. به منظور تحلیل داده‌های به دست آمده از شاخص یادگیری فضایی در مرحله اکتساب از تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (گروه * روزهای یادگیری) و به منظور تحلیل داده‌های یادگیری فضایی هر روز به صورت جداگانه، حافظه فضایی در آزمون پروب و هم‌چنین، سطوح آمیلوئیدبتا و NGF از تحلیل واریانس یک طرفه و در

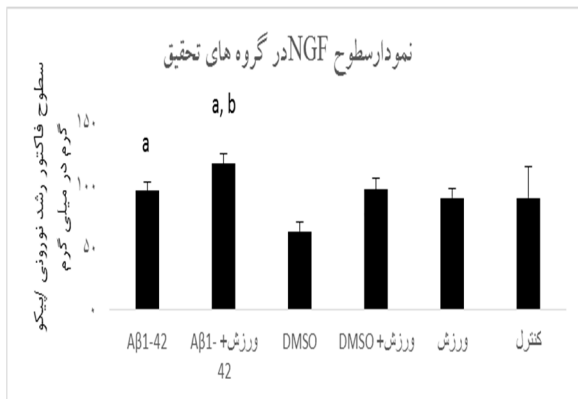
رت) قرار گرفتند. آزمودنی‌های گروه کشتار توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس به مقدار ۱۰ میلی لیتر خون مستقیماً از قلب حیوانات اخذ و بعد از جدا کردن سر حیوان، با احتیاط هیپوکمپ از بقیه بافت مغز جدا شد و توسط نیتروژن مایع منجمد گردید. ۱۰۰ میلی گرم از بافت هیپوکمپ با استفاده از ۱ میلی لیتر محلول PBS هموژنایز شد و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از اعمال ۲ سیکل انجماد-ذوب شدن جهت شکستن غشاهای سلولی، بافت هموژن شده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریوفیوژ شد و سپس مایع رویی توسط سمپلر استخراج گردید (۱۹). پس از آن، نمونه‌های پلازما و هیپوکمپ برای تعیین سطوح β -A1-42 محلول (CSB-E10786r; Cusabio Biotech, China) به روش الایزا و بر اساس پروتکل شرکت سازنده آن به کار گرفته شدند. هم‌چنین، سطوح NGF به وسیله کیت الایزا (AB193736; Abcam) اندازه‌گیری شد. برای آزمون حافظه فضایی از آزمون مازآبی موریس استفاده شد. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم افزار Etho نسخه ۷ 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 مازآبی 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 شش گروه به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کار آزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم (جنوب شرقی) قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. بدین

شکل ۲، نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه را برای سطوح NGF در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد ($F=86/662, p \leq 0/001$). سطوح NGF هیپوکمپ در گروه تزریق $A\beta 1-42$ در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($p \leq 0/001$). گروه ورزش + تزریق $A\beta 1-42$ در مقایسه با گروه تزریق $A\beta 1-42$ افزایش بیشتری نشان داد ($p \leq 0/001$). گروه‌های ورزش و ورزش + شام در مقایسه با گروه کنترل افزایش سطوح NGF را نشان دادند ($p \leq 0/001$) (شکل ۲).



شکل ۲. سطوح NGF هیپوکمپ در گروه‌های مختلف مطالعه.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p \leq 0/001$)
b: تفاوت معنی‌دار با گروه تزریق $A\beta 1-42$ ($p \leq 0/001$)

بین گروه‌های مورد مطالعه در اجرای آزمون سکوی آشکار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های تکراری نشان دهنده معنی‌دار بودن روز ($F=828/470, p \leq 0/001$), گروه ($F=76/730, p \leq 0/001$) و هم‌چنین تعامل دو متغیر مستقل روز و گروه ($F=8/265, p \leq 0/001$) بر زمان سپری شده برای یافتن سکو بود.

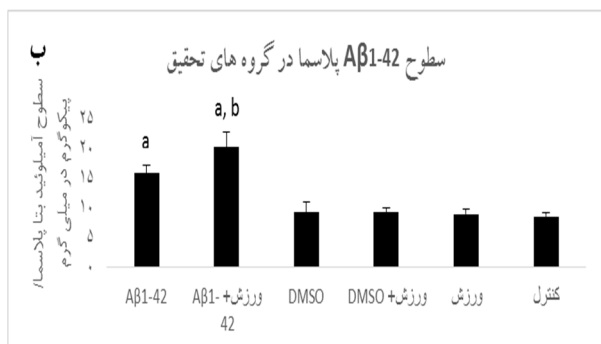
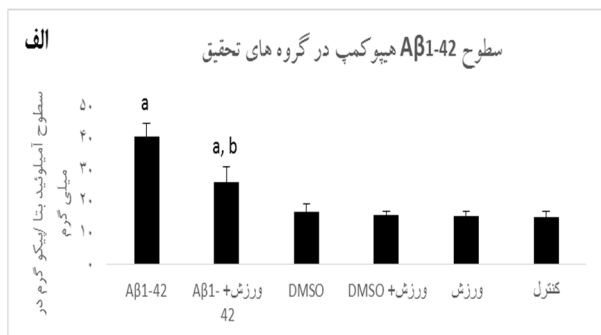
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف در روزهای دوم ($F=30/47, p \leq 0/001$), سوم ($F=96/196, p \leq 0/001$) و چهارم ($F=39/924, p \leq 0/001$) تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد.

مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های تزریق $A\beta 1-42$ و ورزش + تزریق $A\beta 1-42$

صورت نیاز از آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ($p \leq 0/05$) استفاده شد.

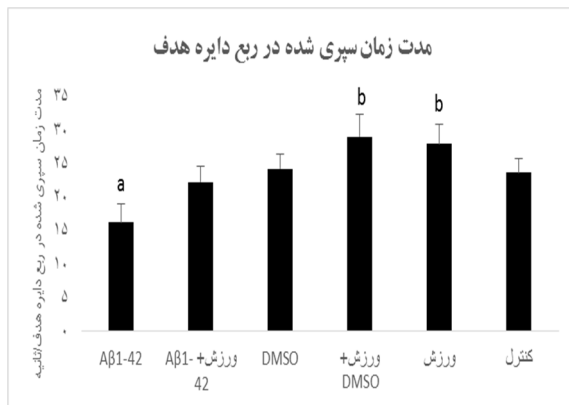
یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین سطوح آمیلوئید بتای هیپوکمپ در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($F=77/026, p \leq 0/001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین سطوح آمیلوئید بتای هیپوکمپ در گروه تزریق $A\beta 1-42$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$) و هم‌چنین گروه ورزش + تزریق $A\beta 1-42$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۱-الف). بین سطوح آمیلوئید بتای پلاسما در گروه‌های مختلف نیز تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($F=77/064, p \leq 0/001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین سطوح آمیلوئید بتای پلاسما در گروه تزریق $A\beta 1-42$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$) و هم‌چنین، گروه ورزش + تزریق $A\beta 1-42$ با دیگر گروه‌ها ($p \leq 0/001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۱-ب).



شکل ۱. سطوح آمیلوئید بتای محلول هیپوکمپ (الف) و پلاسما (ب) در گروه‌های مختلف مطالعه.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($p \leq 0/001$)؛
b: تفاوت معنی‌دار با گروه تزریق $A\beta 1-42$ ($p \leq 0/001$).



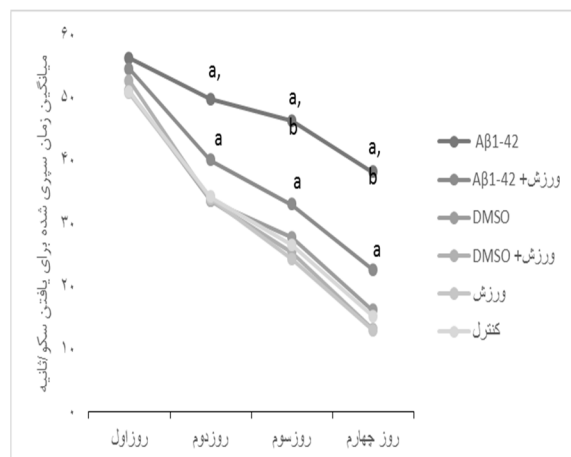
شکل ۴. زمان سپری شده در رت دایره هدف در گروه های مورد مطالعه در آزمون پروب.

a: تفاوت معنی دار با گروه های دیگر ($p \leq 0.01$)
b: تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($p \leq 0.05$)

بحث

سطوح Aβ1-42 هیپوکمپ در گروه های تزریق Aβ و تزریق Aβ + ورزش بیشتر از گروه کنترل و شم بود، با این حال سطوح این ماده در پلاسمای گروه ورزش و تزریق نسبت به سایر گروه ها بالاتر بود. مطالعات اندک و البته متناقضی در رابطه با تأثیر ورزش و فعالیت های بدنی بر روی سطوح آمیلوئید بتای مغز انجام شده است. ادلارد و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که ۵ ماه دویدن اختیاری بر روی چرخ دوار منجر به کاهش معنی داری در پلاک های خارج سلولی Aβ در قشر قدامی (۳۸ درصد) و قشر واقع در سطح هیپوکمپ (۵۳ درصد) و هیپوکمپ (۴۰ درصد) شد (۲۱). چو و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ۱۶ هفته دویدن روی نوارگردان، سطوح Aβ1-42 را در موش های ۱۳ ماهه آلزایمری کاهش داد (۲۲). تزوی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که ۱۰ هفته تمرین تردمیل در موش های ترنسژنیک APPswe/PS1dE9، سطوح Aβ محلول را در هیپوکمپ و آمیگدال کاهش می دهد (۲۳). فلاح محمدی و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد که ۶ هفته تمرین دویدن اختیاری روی چرخ دوار موجب کاهش سطوح آمیلوئید بتای قشر مغز در موش های صحرائی دیابتی تحریک شده با آلوکسان می شود که این نتایج با نتایج تحقیق ما همسو می باشد (۲۴). با این حال، یانکوفسکی و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که موش های ترنسژنیک

در روزهای دوم تا چهارم به طور معنی داری بیشتر از گروه های دیگر بود ($p \leq 0.05$). همچنین، در روزهای دوم تا چهارم گروه ورزش + تزریق Aβ1-42 در مقایسه با گروه Aβ1-42 در مدت زمان کمتری سکو را یافتند ($p \leq 0.01$). بین گروه های شم، ورزش + شم، ورزش و کنترل تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه های مورد آزمایش در مدت چهار روز آموزش مازابی موریس.

a: تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($p \leq 0.05$)
b: تفاوت معنی دار با گروه تزریق Aβ1-42 ($p \leq 0.01$)

نتایج آزمون پروب برای بررسی حافظه فضایی رت ها نشان داد که زمان صرف شده در رت دایره هدف برای گروه های مختلف به طور معنی داری متفاوت است ($F=20.958, p \leq 0.01$). زمان سپری شده در رت دایره هدف در گروه تزریق Aβ1-42 به طور معنی داری کمتر از گروه های دیگر بود ($p \leq 0.01$).

همچنین، گروه های ورزش و ورزش + شم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار عملکرد بهتری داشتند ($p \leq 0.05$) (شکل ۴).

است مدت زمان تولید و افزایش آمیلوئید بتا در مغز و خروج آن به پلاسما این حیوانات طولانی تر از حیوانات تزریقی باشد که این امر ممکن است باعث ایجاد نوعی سازگاری و بهبود وضعیت پاک سازی این ماده در پلاسما این حیوانات شده باشد. به هر حال، تفسیر تغییرات میانگین سطوح $A\beta_{1-42}$ پلاسمایی دشوار است و تاکنون اجماع کاملی در مورد آن وجود ندارد. بیماری آلزایمر با کاهش سطوح NGF بالغ و افزایش سطوح NGF نابالغ همراه است که NGF نابالغ با اتصال به گیرنده P75 باعث مرگ نورونی می شود (۲۰). چنین به نظر می رسد که تجمع پپتیدهای آمیلوئید بتا به نوعی باعث ایجاد محدودیت هایی در بلوغ NGF می شوند (۲۱). نتایج تحقیق حاضر چنین نشان داد که در گروه ورزش و تزریق بتا آمیلوئید میزان NGF افزایش بیشتری نسبت به گروه تزریق به تنهایی و ورزش داشته است و در گروه تزریق بتا آمیلوئید نیز نسبت به گروه کنترل و شم افزایش بیشتری داشته است

شواهد گوناگون و نتایج متناقضی در مورد مقادیر NGF در بخش های مختلف سیستم عصبی وجود دارد. به گونه ای که فاریا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای مقادیر NGF بالاتری را در شکنج دنداندار بیماران آلزایمری مشاهده کردند که در تحقیق ما نیز چنین نتیجه ای مشاهده شد و از طرفی هیچ تفاوتی بین سطوح NGF پلاسمایی بیماران آلزایمری با گروه کنترل یافت نشد (۹). اما در مطالعه ای دیگر، بلاسکو و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که سطوح NGF در مایع مغزی نخاعی افراد آلزایمری افزایش یافته بود (۱۰). با این وجود، جی سی و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که تزریق بین بطنی آمیلوئید بتا به مدت ۱۴ روز باعث کاهش بیان پروتئین NGF شد که ممکن است دلیل اختلالات عصبی در این مدل از موش های آلزایمری باشد (۱۱). اما در مطالعه ای دیگر فریرا و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که در بیماران آلزایمری پس از ۱۲ ماه درمان توسط NGF اختلالات شناختی و سطوح آمیلوئید بتا در مایع مغزی نخاعی بیماران کاهش معناداری یافت (۱۲). به هر حال با توجه به مشکل بودن تفسیر نتایج به دست آمده در

APPsw/PS1dE9 که در معرض ۶/۵ ماه غنی سازی محیطی قرار گرفتند، بار آمیلوئیدی بالاتر همراه با افزایش در تجمع $A\beta$ و $A\beta$ تام را نشان می دهند (۲۵) که با نتایج تحقیق ما ناهمسو می باشد و احتمالاً دلیل این تفاوت در نتیجه نوع ایجاد بیماری آلزایمر و هم چنین نحوه و پروتکل فعالیت بدنی انجام شده و هم چنین مدت زمان طولانی انجام تحقیق در مطالعه یانکوفسکی باشد، چرا که به منظور دریافت بیشتر اثر ورزش باید شدت و مدت آن به طور منظم بررسی و تعدیل شود که در طرح های غنی سازی محیطی چنین شرایطی وجود ندارد. با این حال، محققان سازوکارهای مختلفی را برای نقش ورزش بر روی آمیلوئید بتا گزارش کرده اند. به عنوان مثال چو و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فعالیت ورزشی، احتمالاً از طریق تنظیم فرآیند پروتئین پیش ساز آمیلوئید یا افزایش تخریب و پاک سازی $A\beta$ می تواند مقادیر پلاک های $A\beta$ مغز را کاهش دهد (۲۲) یا ادلارد و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که تمرین اختیاری ممکن است متابولیسم پروتئین پیش ساز آمیلوئید و آبشار $A\beta$ را در راستای کاهش تولید $A\beta$ میانجی گری کند (۲۱). حال با توجه به کاهش میزان سطوح آمیلوئید بتای مغزی در گروه ورزش و تزریق در تحقیق حاضر، مشخص شده است که میزان آمیلوئید بتای محلول در پلاسما در گروه ورزش و تزریق نسبت به گروه تزریق آمیلوئید بتا بیشتر بوده است که این حالت با نتایج تحقیقات فلاح محمدی و همکاران (۱۳۹۳) همسو می باشد. آنان نشان دادند که سطوح $A\beta_{1-42}$ پلاسمایی موش های صحرایی دیابتی به دنبال تمرین اختیاری افزایش یافت (۲۴)؛ از طرفی دیگر، با نتایج کاوارابایاشی و همکاران (۲۰۰۱) ناهمسو می باشد. آن ها با استفاده از موش های آلزایمری نشان دادند هنگامی که سطوح تام $A\beta$ مغز افزایش می یابد (نشان دهنده افزایش تولید پلاک) سطوح $A\beta$ پلاسما و مایع مغزی نخاعی به طور همزمان کاهش می یابد (۲۶). احتمالاً دلیل تفاوت در این تحقیقات لوازم و ابزار اندازه گیری و هم چنین نوع آلزایمری شدن حیوانات می باشد، چرا که در تحقیق کاوارابایاشی حیوانات ترنس ژنیک استفاده شده و ممکن

مقادیر NGF، نتایج حاکی از این است که به احتمال زیاد در هنگام بروز بیماری آلزایمر سیستم عصبی به منظور ایجاد حالت بیش جبرانی برای محافظت از سلول‌های آسیب دیده و همچنین جلوگیری از پیشرفت بیماری شروع به تولید نوروتروفیک‌ها و فاکتورهای رشدی می‌کند که با اضافه شدن فعالیت ورزشی در این حالت میزان افزایش فاکتورهایی مانند NGF بیشتر می‌شود. نتایج ماز آبی موریس نشان داد که رت‌ها در هر چهار روز آموزش در گروه ورزش، ورزش و تزریق آمیلوئید بتا، کنترل و تزریق دارونما نسبت به گروه تزریق آمیلوئید دارای عملکرد بهتری بوده‌اند. در تحقیقی که ژونسولاکتدی و همکاران (۲۰۱۷) انجام دادند به بررسی ارتباط بین ورزش ملایم اجباری و مصرف منیزیم بر روی عملکرد شناختی رت‌ها پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که فعالیت بدنی تاثیری بر عملکرد شناختی و همچنین عملکرد حرکتی نداشته، با این حال مصرف منیزیم باعث بهبود معنادار حافظه و همچنین یادگیری شد و امتیازات کسب شده در ماز آبی موریس را بهبود بخشید (۲۷) که این نتیجه با نتایج تحقیق ما ناهمسو می‌باشد. به نظر می‌رسد که دلیل ناهمسویی در این تحقیق به علت پروتکل ورزش انجام شده باشد، چرا که با توجه به این که رت‌های آن‌ها از نظر جسمانی سالم بوده و به نظر تمرین انجام شده به منظور تاثیرگذار بودن بر روی فاکتورهای مورد نظر از شدت کافی برخوردار نبوده، ولی در تحقیق ما با توجه به این که نمونه‌های ما آلزایمری بوده‌اند و شدت تمرین هم بالاتر بوده به همین دلیل اثر فعالیت بدنی مشهود تر دیده می‌شود. هم‌چنین در تحقیقی دیگر کاشانی و همکاران (۱۳۹۰) به بررسی اثر بهبود دهنده تمرین در ماز آبی بر حافظه فضایی موش‌های صحرائی آلزایمری پرداختند، نتایج آن‌ها نشان داد که آموزش یا تمرین ماز آبی موریس سبب بهبود یادگیری فضایی و عملکرد بهتر در مقایسه با گروه شم در موش‌های صحرائی آلزایمری می‌شود (۲۸) که این نتیجه با نتایج تحقیق ما هم‌سو می‌باشد. هم‌چنین در مورد حافظه فضایی نیز نتایج نشان دهنده عملکرد بهتر گروه ورزش در این آزمون بوده است. جنفیر و

همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی با ایجاد موش‌های ترانژنیک مدل آلزایمری مشخص کردند که انجام فعالیت ذهنی و فعالیت بدنی می‌تواند سبب توقف یا کاهش از دست رفتن حافظه در این گروه از حیوانات شود. در این تحقیق حیوانات تحت شرایط مختلف زندگی از جمله زندگی گروهی و داشتن فعالیت بدنی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که انجام فعالیت ذهنی همراه با فعالیت اجتماعی و بدنی می‌تواند سبب بهبود علائم شناختی شود (۲۹). به طور کلی، اثر فعالیت‌های مختلف اجتماعی و فیزیکی در کاهش ریسک ابتلا به انواع ناهنجاری‌های مغزی از جمله آلزایمر مشخص شده است، اما نوع فعالیت و هم‌چنین مکانیزم دقیق اثرگذاری آن‌ها هنوز به خوبی مشخص نشده است. در تحقیقی دیگر، کدالی و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی نقش فعالیت دویدن با شدت‌های مختلف بر روی نوروزنر و حافظه فضایی در موش‌ها پرداختند. نتایج آن‌ها چنین نشان داد که رت‌هایی که به صورت اجباری دویده بودند ۱/۵ تا ۲ برابر نوروزنر بیشتر را در هیپوکمپ نشان دادند، اما در آزمون پروب تفاوت عملکردی با گروه بی‌تمرین نداشتند. هم‌چنین گروه تمرین ملایم و تمرین اجباری هیچ نوع تداخلی در یادگیری و حافظه فضایی ایجاد نکرد (۳۰). چنین به نظر می‌رسد که دلیل تفاوت در نتایج این تحقیق با تحقیق ما شدت تمرین اعمال شده می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر نقش ورزش بر روی فعالیت مغز در شرایط بیماری، شدت ورزش انجام شده باشد. چرا که هر چه شدت بالاتر و در حد توان آزمودنی‌ها باشد، نتایج نشان‌گر بهبود وضعیت عملکردی مغز شامل نوروزنر و عملکرد در تست‌های رفتاری بوده است و با توجه به کمبود تحقیقات موجود بر روی شدت ورزش‌های انجام شده پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده بر روی شدت‌های مختلف فعالیت بدنی و هم‌چنین پروتکل‌های مختلف آن توجه شده و به نوعی نمودار دوز و پاسخ ورزشی برای بیماری‌های مختلف عصبی رسم شود.

6. Hashimoto Y., Kaneko Y., Tsukamoto E. et al. Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD. *J. Neurochem.* 2004; 90, 549-558.
7. Walsh D. M., Townsend M., Podlisny M. B., Shankar G. M., Fadeeva J. V., Agnaf O. E., Hartley D. M. and Selkoe D. J. Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* 2005; 25, 2455-2462.
8. Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., et al. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med.* 2006. 144:73-81.
9. Faria MC, Goncalves GS, Rocha NP, Moraes EN, Bicalho MA, Gualberto Cintra MT, et al. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 2014; 53, 166-72.
10. Blasko I, Lederer W, Oberbauer H, Walch T, Kemmler G, Hinterhuber H, et al. Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2006, 21(1):9-15.
11. Ji C, Song C, Zuo P. The mechanism of memory impairment induced by A β chronic administration involves imbalance between cytokines and neurotrophins in the rat hippocampus. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(4), 410-20.
12. Ferreira D, Westman E, Eyjolfsson H, Almqvist P, Lind G, Linderoth B, et al. Brain changes in Alzheimer's disease patients with implanted encapsulated cells releasing nerve growth factor. *J Alzheimers Dis* 2015; 43(3), 1059-72.
13. Covaceuszach S, Capsoni S, Ugolini G, Spirito F, Vignone D, Cattaneo A. Development of a non invasive NGF-based therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009; 6(2), 158-70
14. Xu B, Zhang X, Song C, Liang F, Zhang L. Voluntary Running Enhances Hippocampal Proliferation by Increasing Hippocampal NGF,

نتیجه گیری

چنین به نظر می رسد که انجام فعالیت بدنی قبل از القای آلزایمر در رت ها باعث نوعی فرآیند مقابله و پیش جبرانی با اختلالات فیزیولوژیکی و روند پیشرفت ناشی از این بیماری می شود و چنین به نظر می رسد که ممکن است مغز و کل بدن را در مقابل این بیماری مقاوم کند. با این حال هنوز درک مکانیزم های دقیق و نحوه اثرگذاری فعالیت بدنی و هم چنین میزان و شدت فعالیت بدنی موثر، نیازمند تحقیقات بیشتر می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله صمیمانه از تمامی افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند و هم چنین از پرسنل بخش فیزیولوژی انستیتو پاستور ایران که با ارائه خدمات و تجهیزات مورد نیاز، ما را در پیشبرد این تحقیق یاری نمودند سپاس گزاریم.

منابع

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010; 362, 329-44.
2. Resende R, Moreira PI, Proenca T. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. *Free Radical Bio Med* 2008; 44: 2051-7.
3. Selkoe D. J. Alzheimer disease: mechanistic understanding pre-dicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140, 627-638.
4. Singh B., Henneberger C., Betances D., Arevalo M. A., Rodriguez-Tebar A., Meier J. C. and Grantyn R. Altered balance of glutamatergic/GABAergic synaptic input and associated changes in dendrite morphology after BDNF expression in BDNF-deficient hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 2006; 26, 7189-7200.
5. Salama-Cohen P., Arevalo M. A., Grantyn R. and Rodriguez-Tebar A. Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurons through Neurogenin 3. *J. Neurochem.* 2006; 97, 1269-1278

- BDNF, and IGF-1. *Advances in Biochemistry*. 2017 ; 6,5(1):1
15. Franzoni F, Federighi G, Fusi J, Cerri E, Banducci R, Petrocchi A, Innocenti A, Pruneti C, Daniele S, Pellegrini S, Martini C. Physical Exercise Improves Total Antioxidant Capacity and Gene Expression in Rat Hippocampal Tissue. *Archives italiennes de biologie*. 2017; 155(1/2):1-0.
16. Zagaar, Munder, et al. "The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence." *Neurobiology of disease*, 2012;45, 1153-1162.
17. Doost Mohammadpour, J., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., et al.. Non-selective NSAIDs improve the amyloid- β -mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2015; 132, 33-41.
18. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1997.
19. Zhang ZH, Chen C, Wu QY, Zheng R, Liu Q, Ni JZ, Hoffmann PR, Song GL. Selenomethionine reduces the deposition of beta-amyloid plaques by modulating β -secretase and enhancing selenoenzymatic activity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Metallomics*. 2016;8(8),782-9.
20. Zeidabadi, R, Ara Ameri, E; Naghdi, N, Blurry, B.. [Effect of long and short-term and very low intensity physical activity on learning and spatial memory of rat mice]. *Motion behavior* 2014; 15, 172-155.
21. Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005; 25,4217-4221
22. Cho JY, Um HS, Kang EB, et al. The combination of exercise training and α -lipoic acid treatment has therapeutic effects on the pathogenic phenotypes of Alzheimer's disease in NSE/APPsw-transgenic mice. *Int J Mol Med* 2010; 25(3), 337-34.
23. Lin TW, Shih YH, Chen SJ, Lien CH, Chang CY, Huang TY, Chen SH, Jen CJ, Kuo YM. Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiology of learning and memory*. 2015; 28, 189-97.
24. Fallah Mohammadi, Z, Ebrahimzadeh, M H, Moghadam, A .. Effect of 6 weeks of optional running on amyloid levels of beta-1-42 in alloxan-stimulated diabetic rats. *Zahedan Journal of Research in Sciences*, 2014; 2012-23
25. Jankowsky JL, Xu G, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR. Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2003;62(12),1220-7.
26. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Agedependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001; 21,372-81.
27. Ghonsulakandi SH, Sheikh M, Shasaltaneh MD, Chopani S, Naghdi N. The Association between Effective Dose of Magnesium and Mild Compulsive Exercise on Spatial Learning, Memory, and Motor Activity of Adult Male Rats. *Biological trace element research*. 2017; 25:1-1.
28. Kashani M, Salami M. Rezaei-Tavirani, M Talaei Zavareh SA. [Maze training improves learning in an Alzheimer model of rat]. *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, Autumn, 2010; 3, 209-216
29. Jennifer R, Cracchiolo TM, Stanley J, Nazian JT, Huntington P, Gary WA. Enhanced cognitive activity—over and above social or physical activity—is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Ab deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88, 277-94.
30. Kodali M, Megahed T, Mishra V, Shuai B, Hattiangady B, Shetty AK. Voluntary running exercise-mediated enhanced neurogenesis does not obliterate retrograde spatial memory. *Journal of Neuroscience*. 2016; 36(31), 8112-22.