اثر تمرین استقامتی قبل از القای آلزایمر بر یادگیری، حافظه و تغییرات گاما سکرتاز هیپوکمپ در رت‌های نر نژاد ویستار

سجاد رجبی امیری، علیرضا براری*، احمد عبدی

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

*مسئول مکاتبات: alireza54.barari@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر تمرین استقامتی قبل القای آلزایمر بر یادگیری، حافظه و تغییرات گاماسکرتاز هیپوکمپ موش-های نر نژاد ویستار انجام شد. ۳۲ سر رت نر بالغ ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۷ ± ۲۵۰ گرم، قبل از القای آلزایمر به صورت تصادفی به دو گروه استراحت (۱٦ سر) و تمرین (۱٦ سر) تقسیم شدند. پس از ٤ هفته (هفته اول و دوم با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در دو نوبت ۱۵ دقیقه‌ای، هفته سوم با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در سه نوبت ۱۵ دقیقه‌ای و در هفته چهارم با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای)، هر گروه به دو زیرگروه: ۱- تزریق آمیلوئیدبتا و ۲- بدون تزریق تقسیم شدند. پس از ۷۲ ساعت حیوانات کشته و هیپوکمپ آنها جهت بررسی برداشته شد. تغییرات گاما سکرتاز با روش Real Time PCR اندازه‌گیری و اطلاعات با آزمون آنوا یک طرفه تجزیه و تحلیل گردید. در تست یادگیری و حافظه موریس بین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف در روزهای دوم ($F = ۱۰/۷۵۸$ ،$p \leq ۰/۰۰۱$)، سوم ($F = ۱۰/۵۷٤$ ،$p \leq ۰/۰۰۱$) و چهارم ($F = ٤/۸٤٦$ ،$p \leq ۰/۰۰۱$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه استراحت- تزریق Aβ1-42 در همه‌ی روزها به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های دیگر بود ($p \leq ۰/۰۰۱$). نتایج آزمون پروب (حافظه فضایی) نشان داد، زمان صرف شده در ربع دایره هدف برای گروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت است ($p \leq ۰/۰۰۱$ ،$F = ۹/۲٤۵$). همچنین، گاما سکرتاز در گروه تمرین نسبت به گروه استراحت در مرحله بعد از القای آلزایمرکاهش معناداری را نشان داد ($p = ۰/۰۰۱$). تمرین هوازی قبل از القای آلزایمر منجر به کاهش گاما سکرتاز و افزایش یادگیری و حافظه و از این طریق امکان دارد به شکل‌پذیری هیپوکامپی کمک و فوایـد شـناختی و عملکردی در پی داشته باشد.

کلمات کلیدی: بیماری آلزایمر، گاما سکرتاز، یادگیری و حافظه، هیپوکمپ.

مقدمه

در انسان‌ها، پیری یک عامل خطر برای بسیاری از شرایط، از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت و زوال عقل است که یکپارچگی بدن و مغز را به خطر می‌اندازد. بیماری آلزایمر شایع‌ترین علت زوال عقل در میان افراد مسن است و به وسیلهٔ آتروفی نواحی مشخصی از مغز، کاهش ادراک پیشرونده و از دست دادن حافظه و ناتوانی در انجام کارهای روزمره مشخص می‌شود (۲۵). پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید

(APP) یک پروتئین تراغشایی است که به طور زیادی در مغز بیان می‌شود و در سیناپس‌های عصبی تمرکز می‌یابد (۲۱، ۲۳).

APP در حفاظت عصبی و به عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ رشد سلول عصبی، تعاملات سلول–سلول یا سلول–ماتریکس و در شکل‌پذیری سیناپسی بکار می‌رود (۲۹). با این حال، APP تحت پردازش پس‌ترجمه‌ای قرار می‌گیرد. شکستن APP توسط آلفا–سکرتاز در غشای پلاسمایی یا در شبکه انتقالی گلژی، قطعه پایانه–sAPPα N و قطعه پایانه–C83 را تولید می‌کند. sAPPα به داخل وزیکول‌های درون‌سلولی و یا به خارج از سلول رها می‌شود. C83 متصل به غشاء باقی می‌ماند و توسط گاما–سکرتاز می‌شکند تا p3 و قلمرو داخل‌سلولی APP (AICD) را تولید کند.

AICD نیز به داخل سیتوپلاسم رها می‌شود. از آنجایی که در این مسیر $A\beta_{1-40}$ و $A\beta_{1-42}$ تولید نمی‌شود، مسیر غیرآمیلوئیدوژنیک نامیده می‌شود (۲۱). در مسیر آمیلوئیدوژنیک، شکستن APP توسط بتا سکرتاز در شبکه انتقالی گلژی و در اندوزوم‌ها رخ می‌دهد و قطعه پایانه –sAPPβ N و قطعه پایانه–C99 را تولید می‌کند. sAPPβ همانند sAPPα می‌تواند به داخل وزیکول‌های درون‌سلولی و یا به خارج از سلول رها شود. C99 متصل به غشاء باقی می‌ماند و متعاقباً توسط گاما–سکرتاز می‌شکند تا بتا آمیلوئید $A\beta_{1-40}$ یا $A\beta_{1-42}$ و AICD را تولید کند (۲۹).

شکسته‌شدن توسط گاما–سکرتاز در شبکه آندوپلاسمی، شبکه انتقالی گلژی، اندوزوم‌ها و بخش کوچکی از غشای پلاسمایی رخ می‌دهد (۱٤).

Aβ1-40 و Aβ1-42 می‌توانند در داخل سلول باقی بمانند یا به داخل مایع بینابینی ترشح شوند که پیرامون سلول‌های مغزی را احاطه کرده است. مسیرهای آمیلوئیدوژنیک و غیرآمیلوئیدوژنیک در مقابل هم قرار دارند. مولکول‌های APP که توسط آلفا–سکرتاز در غشای سلولی شکسته نمی‌شوند، می‌توانند از طریق اندوسیتوز به داخل سلول وارد شوند و متعاقب آن توسط بتا–سکرتاز بشکنند. بنابراین، توزیع مجدد APP به سوی غشای سلول یا داخل سلول می‌تواند مسیر پروتئولیتیکی را که APP تجربه می‌کند، تحت‌تأثیر قرار دهد (۹). پپتیدهای Aβ مولکول‌های کلیدی در بیماری‌زایی AD بشمار می‌روند. در AD، میزان تجمع پپتیدهای Aβ مغزی (عمدتاً $A\beta_{1-40}$ و $A\beta_{1-42}$) تسریع شده و موجب بوجود آمدن تجمعات سمی اندازه‌های متفاوتی از الیگومرهای محلول تا پلاک‌های نامحلول می‌شود (۱۳). به احتمال زیاد رسوب Aβ در مغز به عنوان پلاک‌های پیری و آنژیوپاتی آمیلوئیدی مغزی (CAA) آبشاری از رویدادها را آغاز می‌کند که موجب شروع بیماری می‌شود (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که وجود اشکال محلول الیگومرهای Aβ نسبت به رسوب‌های نامحلول، همبستگی بهتری با اختلال ادراکی و اختلال عملکرد سیناپسی دارند (۳). شواهد آزمایشگاهی نشان داده‌اند که الیگومرهای Aβ محلول هم خارج‌سلولی و هم داخل‌سلولی نقش مهمی در بیماری‌زایی AD ایفا می‌کنند. گزارش شده است که سمیت عصبی مرتبط با تجمع داخل‌سلولی الیگومرهای Aβ محلول به عنوان یک رخداد اولیه در AD بوده و مسئول اختلال عملکرد سیناپسی می‌باشد. این تجمعات می‌تواند از Aβ تولید شده در داخل سلول یا وارد شدن Aβ از فضای خارج‌سلولی به داخل سلول حاصل شود. تجمع داخل‌سلولی Aβ می‌تواند از یک سلول به سلول دیگر متصل به آن منتقل شود که منجر به پیشرفت تدریجی بیماری‌زایی در AD می‌شود (۲۰).

از سوی دیگر، قویاً برای پیشگیری از بیماری‌های عصبی و به تعویق انداختن فرآیندهای پیری، به انجام ورزش توصیه شده است. یافته‌های مطالعات حاکی از آن است که فعالیت جسمانی به عنوان روشی بی‌خطر،

کم‌هزینه و موثر در پیشگیری و بهبود علائم AD مطرح می‌باشد. فعالیت ورزشی منظم نقش حفاظت نرونی دارد، نوروتروفین‌ها را بصورت مثبت تنظیم می‌کند (۸، ۷) و آثار مطلوبی بر ادراک، حجم مغز و فعالیت شبکهٔ عصبی در مطالعات کنترل شدهٔ افراد مسن که از لحاظ ادراکی سالم هستند و بزرگسالان با اختلال حافظه دارد (۸، ۳۱). همچنین، افزایش فعالیت جسمانی به طور بالقوه از طریق آثار آن بر نشانگر زیستی Aβ در مغز (۱۸)، با کاهش خطر اختلال ادراکی و شیوع زوال عقلی همراه است. ورزش در حیوانات نیز اثرات مطلوبی بر پردازش Aβ در مدل‌های موش‌های تراریخته AD دارد (۱). ورزش همچنین اثرات زیان‌بار استرس اکسیداتیو که با پیری تسریع می‌شود را کاهش می‌دهد و پیامدهای مطلوبی در شکل پذیری سیناپسی و ادراک دارد. بعلاوه، سطوح بالای فعالیت جسمانی با سطوح کمتر نشانگرهای التهابی در محیط همراه است (۲٤) که ارتباط تنگاتنگی با AD دارند. بااینحال اگرچه این فرضیه که فعالیت ورزشی خطر کاهش عملکرد شناختی را کاهش می‌دهد، بطور کلی پذیرفته شده است، اما مکانیسم‌های سلولی درک چنین اثراتی بسیار ضعیف است. آگیوآر و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند، وهله های کوتاه ورزشی سطوح فسفوریلاسیون CREB را در هیپوکمپ موش‌های پیر افزایش می‌دهد. بنابراین بنظر می رسد وهله‌های کوتاه ورزشی یک استراتژی درمانی مناسب برای بهبود عملکرد شناختی و شکل‌پذیری سیناپس در موش‌های پیر می‌باشد (۲). همچنین کنگ و دیگران (۲۰۱۳) نشان دادند که موش‌های ترنسژنیک AD با جهش در پرسینیلین۲ که در فعالیت بدنی شرکت کردند، بطور قابل توجهی رسوب کمتری از Aβ در هیپوکمپ و قشر مغز در مقایسه با موش‌های کمتر فعال داشتند. این کاهش در تشکیلات پاتولوژی در گروه ورزشی با کاهش در مارکرهای آپوپتوزی و کاهش معنادارتر TNF-α و IL-1α همراه بود (۱۵).

با این حال اختلافات در مطالعات ممکن است ناشی از تفاوت در مدت دویدن، نوع فعالیت (اجباری یا اختیاری) یا نوع و منبع چالش التهابی باشد. بنابراین مطالعات آتی در این زمینه ممکن است بتواند توضیح دهد که آیا ورزش می‌تواند بر تغییرات ناشی از التهاب بر نوروژنز و عملکرد شناختی اثرگذار باشد یا خیر. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی قبل القای آلزایمر بر یادگیری، حافظه و تغییرات گاماسکرتاز هیپوکمپ موش‌های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری، نمونه آماری: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر رت نژاد ویستار نر در سن ۸ هفتگی با میانگین وزنی ۱۷/۲۰ ± ۲۵۰ از موسسه انستیتو پاستور تهیه شد. رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات بخش فیزیولوژی و فارموکولوژی موسسه پاستور در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ٦ صبح و شروع خاموشی ٦ عصر) دما (۳±۲۲ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ٤٥ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد رت در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. پس از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری و یک هفته به منظور آشناسازی با نوارگردان (۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و پنج روز در هفته)، رت‌ها به روش تصادفی ساده به ۲ گروه تقسیم شدند:

۱) گروه اول: شامل ١٦ سر رت ۱۰ هفته‌ای بود که به مدت ٤ هفته و هر هفته ٥ جلسه تمرین استقامتی پیش‌آماده‌سازی انجام دادند. پس از گذشت ٤ هفته

رت ها به صورت تصادفی به دو گروه ۱. تزریق بتا آمیلوئید (۸ سر) و ۲. بدون تزریق بتا آمیلوئید (۸ سر) تقسیم‌بندی شدند. لازم به ذکر است بعد از تزریق بتا آمیلوئید سه روز به حیوانات اجازه ریکاوری داده شد. ۲) گروه دوم: شامل ۱۶ سر رت ۱۰ هفته‌ای بود که به عنوان گروه استراحت در هیچ‌گونه فعالیتی شرکت نکرد. پس از گذشت ٤ هفته رت ها به صورت تصادفی به دو گروه ۱- تزریق بتا آمیلوئید (۸ سر) ۲- بدون تزریق بتا آمیلوئید (۸ سر) تقسیم‌بندی شدند. این گروه از شروع دوره تمرینی در هیچ فعالیت ورزشی شرکت نمی‌کردند ولی در محیط مشابه با گروه تمرین، در معرض نوارگردان قرار می‌گرفتند ولی هیچ حرکتی نمی‌کردند تا شرایط آزمایشگاهی یکسان باشد. رت‌ها تا پایان مرحله در قفس‌های خود نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است تمامی مراحل نگهداری و کشتار رت‌ها بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات مؤسسه پاستور انجام شد.

نحوه ایجاد آلزایمر القا شده با پپتید بتا آمیلوئید ٤۲-۱: به منظور آماده‌سازی پپتید بتاآمیلوئید ٤۲-۱، در مرحله اول بتاآمیلوئید را در محلول بافر DMSO حل کردیم تا pH آن به ۷/٤ برسد، سپس محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز انکوبه شد تا بتاآمیلوئید به شکل متراکم درآید و بعد در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پس از استراحت شبانه، حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس سر حیوانات در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی جمجمه، کانول‌های مخصوص تزریق در داخل بطن‌های جانبی در موقعیت ۰/۸ عقب برگما، ۱/۵ میلی‌متر در طرفین شکاف طولی و ۲/۵ میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه قرار گرفت و تزریق درون هیپوکمپ بتاآمیلوئید (هر طرف ۱ میکرولیتر) توسط سرنگ همیلتون صورت گرفت. جهت اطمینان از محل درست تزریق در مغز به دو سر از رت‌ها رنگ تزریق شد و پس از کشتار محل تزریق بررسی شد. در گروه شم نیز تمام مراحل آزمایشگاهی مانند گروه تزریق بتاآمیلوئید بود، با این تفاوت که در گروه شم میزان ۱ میکرولیتر بافر DMSO در هر یک از هیپوکمپ‌ها تزریق شد.

پروتکل تمرین: رت‌ها بر روی نوارگردان با شیب صفر درجه در چرخه روشنایی، از ساعت ۹ صبح تا ۲/۳۰ بعد از ظهر و از شنبه تا چهارشنبه به مدت ٤ هفته (۵ روز در هفته با شدت و مدت مورد نظر) به تمرین پرداختند. رت‌ها در هفته اول و دوم با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در دو نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه (بدون فعالیت) ۵ دقیقه‌ای (به منظور جلوگیری از خستگی عضلانی در رت‌ها) بر روی نوارگردان شروع به دویدن کردند. در هفته سوم تمرینات را با افزایش شدت و زمان فعالیت، با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در سه نوبت ۱۵ دقیقه‌ای و وقفه ۵ دقیقه‌ای ادامه دادند. در هفته چهارم رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای به فعالیت پرداختند (۳٤).

رت‌های گروه تمرین هوازی در تمام جلسات تمرینی پایش شدند و با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف (شدت ۰/۵ میلی‌آمپر) که در حیوان ایجاد استرس زیادی نمی‌کند و یا دستکاری با یک اسفنج به ادامه دویدن تشویق شدند.

استخراج نمونه: ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی ٤ سر رت از هر گروه بوسیله ی تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی هوش و هیپوکمپ سریعا استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال ۸۰- منتقل شد. حدود ۱۰۰ میلی‌گرم هیپوکمپ با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج Total RNA در ۱ میلی‌لیتر واکنش دهنده ایزولایسنس

RNA هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در ٤ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۱۵–۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شد. سپس با نسبت ۱ به ۵ کلروفرم با ایزولایسنس اولیه مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول به مدت ۳–۲ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شد.

سپس میکروتیوب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه 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 رها و سپس در ٤ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰در دقیقه سانتریفیوژ شد. پلت حاوی RNA در اتانول شست و شو و در ۳۰ µl آب RNase-Free حل گردید. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملا استریل انجام گرفت. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ سنجیده و نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ بین ۲/۱ –۱/۸ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید.

جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA تعدادی از RNA های تخلیص شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و مشاهده باندهای RNAهای ریبوزومی 18S و 28S به طور منفک صحت تخلیص را تائید کرد. RNA توتال روی یخ و بافرها و ترکیبات مختلف کیت در دمای اتاق ذوب شدند. برای هر واکنش از دستورالعمل مربوط به کیت برای فراهمی و اضافه کردن مواد استفاده شد. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد آنکوبه شد و سپس برای توقف واکنش تیوب‌ها ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند، سپس دمای واکنش‌ها به ٤ درجه سانتی‌گراد تقلیل یافت تا مراحل بعدی آزمایش روی cDNA ها انجام شود.

برای اندازه‌گیری بیان ژن با استفاده از روش Real time-PCR در ابتدای کار میزان غلظت بهینه 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 Ct مشاهده شود. Real time-PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت آمپلیکون و با استفاده از غلظت ۲۵۰ ng از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمر مربوط به گاما سکرتاز در جدول شماره ۱ گزارش شده است. از 18S به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان این ژن به صورت توامان اندازه گیری و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول ΔΔCT اندازه‌گیری شد.

آزمون حافظ و یادگیری فضایی ماز آبی موریس ٤ هفته پس از القای تمرین: برای آزمون حافظه فضایی از آزمون ماز آبی موریس استفاده شد (٤ سر در هر گروه). دستگاه رفتاری شامل یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی (به قطر ۱/۵ و ارتفاع ٦۰ سانتی‌متر) بود که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن از آب ۲±۲۱ 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 می‌شد. 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، ۲٤ 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 ۱۰ گروه به مدت ٤ روز متوالی و هر روز در ٤ 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 ۱۵ تا ۲۰ 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 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 ٦۰ 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 (Probe Test) (انتقال): یک روز بعد از آخرین روز آموزش، حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله، رت‌ها در یک آزمون ٦۰ 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.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاد از نرم افزار SPSS و اکسل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به نحوی که از مقادیر گرایش مرکزی و پراکندگی (میانگین و انحراف استاندارد) و همچنین ترسیم گراف جهت برآورد آمار توصیفی پژوهش استفاده شد. سپس از آنوا یک طرفه به ترتیب جهت برآورد تفاوت های بین گروهی در مراحل پیش از القای آلزایمر استفاده شد. سطح معناداری $p \leq$ ۰/۰۰۱ نیز به عنوان ضابطه تصمیم گیری جهت رد یا قبول فرضیه ها در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها

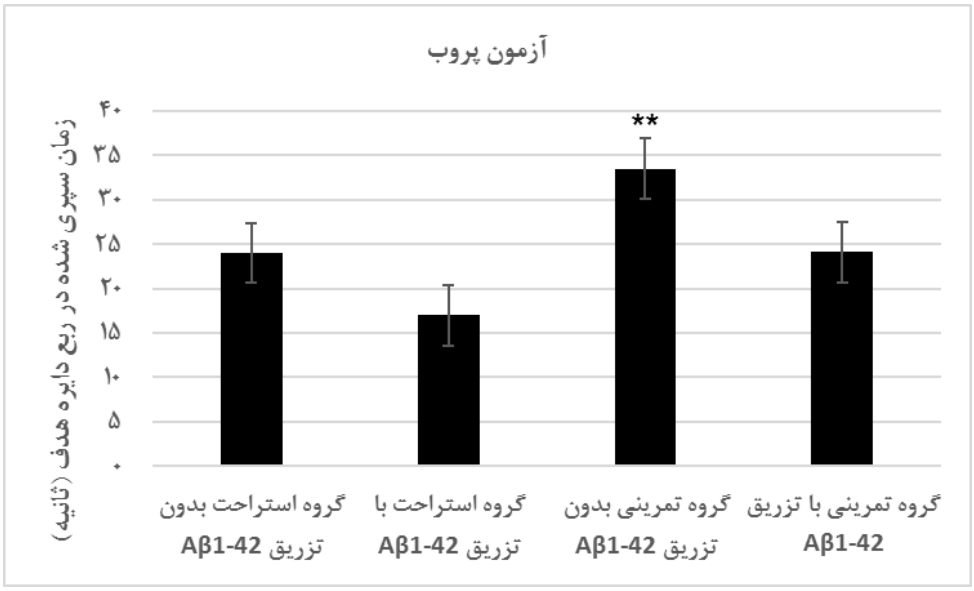
ژن	Forward primer (5´-3´)	Reverse primer (5´-3´)
گاما سکرتاز	CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG	GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA

نتایج

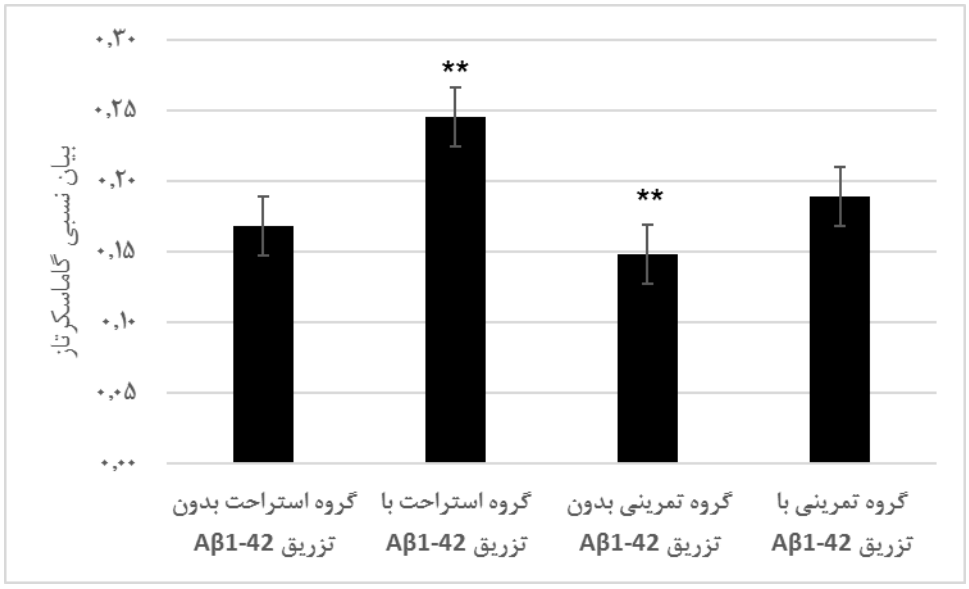
بین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف در روزهای دوم (F=۱۰/۷۵۸ ،P≤۰/۰۰۱)، سوم (F=۱۰/۵۷٤ ،$p \leq$ ۰/۰۰۱) و چهارم ($p \leq$ ۰/۰۰۱، F=٤/۸٤٦) تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد. مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه استراحت- تزریق Aβ1-42 در همه‌ی روزها به طور معنی‌داری

بیشتر از گروه‌های دیگر بود ($p \leq$ ۰/۰۰۱). همچنین، در همه‌ی روزها گروه ورزش بدون تزریق Aβ1-42 در مقایسه با گروه‌های دیگر در مدت زمان کمتری سکو را یافتند ($p \leq$ ۰/۰۰۱) (شکل ۱). نتایج آزمون پروب برای بررسی حافظه فضایی رت‌ها نشان داد که زمان صرف شده در ربع دایره هدف برای گروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت است ($p \leq$ ۰/۰۰۱، F =۹/۲٤٥). زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه استراحت با تزریق Aβ1-42 به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های دیگر بود ($p \leq$ ۰/۰۰۱). همچنین، گروه تمرین بدون تزریق Aβ1-42 به طور معنی‌دار عملکرد بهتری داشت ($p \leq$ ۰/۰۰۱) (شکل ۲). علاوه بر این، نتایج نشان داد که ٤ هفته تمرین هوازی ، منجر به کاهش معنی‌دار سطوح گاما سکرتاز به ترتیب به میزان ۰/۱۳ و ۰/۱٤ پیکوگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با مقدار پایه و گروه استراحت (شکل ۳).

شکل ۱- مقایسه میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه‌های مورد آزمایش در مدت چهار روز آموزش ماز آبی موریس. *** تفاوت معنی‌دار گروه تمرین بدون تزریق با سایر گروه‌ها ($p \leq$ ۰/۰۰۱). ** تفاوت معنی‌دار گروه استراحت با تزریق با سایر گروه‌ها ($p \leq$ ۰/۰۰۱).



شکل ۲- زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه های مورد مطالعه در آزمون پروب. ** تفاوت معنی‌دار با گروه‌های دیگر ($p \leq ۰/۰۰۱$).



شکل ۳- بیان نسبی گاما سکرتاز نسبت به ژن 18s. ** تفاوت معنی‌دار با گروه‌های دیگر (P≤۰/۰۰۱)

بحث

مزایای ورزش و فعالیت بدنی بر کاهش عملکرد مغز ناشی از افزایش سن با سازگاری‌های شکل‌پذیری در سطوح سیناپسی و میتوکندریایی تایید شده است، این امر در مطالعات قبلی بر روی جوندگان با استفاده از دوره‌های طولانی ورزش اختیاری روی چرخ دوار و یا ورزش اجباری نشان داده شده است (۳۰). آلزایمر عمدتا با کاهش عملکرد شناختی در گونه‌های مختلف، شامل انسان‌ها و رت‌ها مرتبط بوده است. در میان مناطق مغز بنظر می‌رسد هیپوکمپ نسبت به پیری و بیماری‌های تخریب عصبی در اتصالات ناحیه هیپوکامپ و شکل‌پذیری سیناپسی بیشتر حساس باشد (٤).

برنامه‌های ورزشی طولانی مدت با شدت متوسط به بهبود عملکردهای شناختی کمک می‌کند (۵)، اما ورزش‌های کوتاه مدت در انجام آن ناتوان ماندند. اگرچه این فرضیه که فعالیت ورزشی خطر کاهش عملکرد شناختی را کاهش می‌دهد، بطور کلی پذیرفته شده است، اما مکانیسم‌های سلولی درک چنین اثراتی بسیار ضعیف است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین ورزشی از طریق کاهش گاما-سکرتاز که مسیر آمیلوئیدوژنیک می‌باشد، می‌تواند منجر به افزایش حافظه و یادگیری شود. این نتایج با نتایج پژوهش لیو و همکاران (۲۰۱۳)، کانگ و چو (۲۰۱٤)، و کانگ و همکاران (۲۰۱۳) همسو می‌باشد (۱۵، ۱٦، ۱۹).

در مطالعه‌ای یودا و همکاران (۲۰۰۹) نیز به دنبال ٤ ماه دویدن موش‌های تراریخته آلزایمری بصورت اختیاری و اجباری با وجود مقداری کاهش، هیچ تفاوتی معناداری روی سطوح Aβ محلول در قشر و هیپوکامپ مغز موش‌های گروه کنترل و تمرینی وجود نداشت (۳۳). بر اساس فرضیه آبشار Aβ و طبق قانون جرم، سطح هر پروتئین در بدن تعادلی بین تولید و تخریب آن می‌باشد و سطح Aβ موجود در مغز نیز تعادلی بین تولید و پاکسازی آن می‌باشد (۱۱). در پژوهش حاضر جهت مطالعه تاثیر فعالیت ورزشی بر میزان حافظه و یادگیری، سطح گاما-سکرتاز مورد سنجش قرار گرفت و مشاهده شد که سطح گاما-سکرتاز گروه استراحت و تزریق Aβ نسبت به گروه‌های دیگر بطور معناداری بالاتر بود. بنابراین بنظر می‌رسد اختلال در نتایج آزمون ماز آبی گروه‌های آلزایمری نسبت به گروه‌های تمرینی و سالم ناشی از افزایش سطح گاما-سکرتاز هیپوکمپ آن‌ها باشد. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطح ۷-سکرتاز هیپوکمپ موش‌های گروه‌های تمرین و تزریق Aβ نسبت به موش‌های آلزایمر و بدون تمرین بطور معناداری پایین‌تر بود. کاهش سطح تزریق Aβ هیپوکمپ موش‌های تمرین و تزریق Aβ نیز با بهبود تست ماز آبی همراه بود.

اخیراً نیز چندین مطالعه به نقش پیش‌آماده‌سازی ورزشی بر آثار ناشی از تزریق Aβ پرداخته‌اند.

دائو و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که ٤ هفته فعالیت تردمیل با شدت متوسط از نقص سیناپسی شکنج دندانه‌ای و تغییرات آسیب‌رسان در مسیرهای پیام-رسانی مرتبط با AD که در اثر تزریق Aβ1–42 حاصل می‌شود، جلوگیری می‌کند (۷).

در مطالعه دیگری در همین زمینه، سوزا و دیگران (۲۰۱۳) گزارش کردند که ۸ هفته تمرین شنا قبل از تزریق Aβ1–40 می‌تواند از کاهش ادراک، افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی ایجاد شده با پپتیدهای Aβ1–40 جلوگیری کند (۲۸).

همچنین پاراچیکووا و دیگران (۲۰۰۸) نشان دادند که به دنبال ۳ هفته دویدن روی چرخ اختیاری در موش-های مدل تراریخته‌ی آلزایمری Tg2576، عملکرد ادراکی بدون تغییر در سطوح Aβ1-40 و Aβ1-42 نامحلول بهبود یافت. آنان نتیجه گرفتند که این حالت ممکن است از طریق تغییرات در پاسخ التهابی ایجاد شده باشد (۲۳).

نتایج ماز آبی موریس نشان داد که رت‌ها در هر چهار روز آموزش در گروه تمرین و تزریق آمیلوئید بتا، کنترل و تمرین و بدون تزریق آمیلوئید بتا نسبت به گروه تزریق آمیلوئید دارای عملکرد بهتری بوده‌اند.

در پژوهشی که ژونسولاکتدی و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی ارتباط بین ورزش ملایم اجباری و مصرف منیزیم بر روی عملکرد شناختی رت‌ها پرداختند مشخص شد 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 (۱۰) که این نتیجه با نتایج پژوهش ما

ناهمسو می‌باشد. به نظرمی‌رسد که دلیل ناهمسویی در این پژوهش به علت پروتکل ورزش انجام شده باشد، چرا که با توجه به اینکه رت‌ها 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 پژوهش حاضر با توجه به اینکه رت‌ها آلزایمری بوده‌اند و شدت تمرین هم بالاتر بوده به همین دلیل اثر فعالیت بدنی مشهودتر دیده می‌شود.

در پژوهشی دیگر کاشانی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی اثر بهبود دهنده تمرین در مازآبی بر حافظه فضایی موش‌های صحرایی 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 صحرایی آلزایمری می‌شود (۲۷) که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. همچنین در مورد حافظه فضایی نیز نتایج نشان دهنده عملکرد بهتر گروه تمرین در این آزمون بوده است.

کراکچیولو و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی با ایجاد موش‌های ترنسژنیک 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 پژوهش 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 می-تواند سبب بهبود علائم شناختی شود (٦).

به طور کلی، اثر فعالیت‌های مختلف اجتماعی و فیزیکی در کاهش خطر ابتلا به انواع ناهنجاری‌های مغزی از جلمه آلزایمر مشخص شده است، اما نوع فعالیت و همچنین مکانیزم دقیق اثرگذاری آن‌ها هنوز به خوبی مشخص نشده است.

در پژوهشی دیگر، کدالی و همکاران (۲۰۱٦) به بررسی نقش فعالیت دویدن با شدت‌های مختلف بر روی عصب‌زایی و حافظه فضایی در موش‌ها پرداختند. نتایج آنها چنین نشان داد که رت‌هایی که به صورت اجباری دویده بودند ۱/۵ تا ۲ برابر عصب‌زایی 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 (۱۷).

چنین به نظر می‌رسد که دلیل تفاوت در نتایج این پژوهش با پژوهش حاضر شدت تمرین اعمال شده می‌باشد با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش‌های 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 (۲٦). چرا که هر چه شدت بالاتر و در حد توان آزمودنی‌ها باشد، نتایج نشانگر بهبود وضعیت عملکردی مغز شامل عصب‌زایی و عملکرد در تست‌های رفتاری بوده است و با توجه به کمبود پژوهش‌های موجود بر روی شدت ورزش‌های انجام شده پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های 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.

نتیجه‌گیری

در مجموع هر چند بسیاری از محققین استفاده از داروهای مختلف را برای آلزایمر ارائه داده‌اند، اما عموما هر کدام اثرات جانبی چندی را دارا می‌باشند. بنابراین تغییر در شیوه زندگی مانند انجام فعالیت‌های ورزشی می‌تواند بعنوان مکمل در کنار درمان‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه بسیاری از تلاش‌های دارویی به مهار گاما سکرتاز و

نهایتا کاهش آمیلوئیدبتا تمرکز کرده‌اند و با توجه به نتایج پژوهش حاضر بنظر می‌رسد تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش گاما سکرتاز، از مسیرهای آمیلوئیدوژنیک جلوگیری کرده و کاهش سطح آمیلوئیدبتا را در پی داشته باشد. در مجموع تمرین ورزشی می‌تواند بعنوان یک روش درمانی مکمل در بیماران آلزایمری مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشگاه آیت الله آملی آمل، مدرس و تهران و انستیتو پاستور و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای رساله شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. ضمناً تمامی هزینه‌های رساله به صورت شخصی بوده و هیچ سازمانی حمایت مالی نکرده است.

منابع

1. Adlard P.A., Perreau V.M., Pop V., Cotman C.W. 2005. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 25(17): 4217-4221.

2. Aguiar A.S., Castro A.A., Moreira E.L., Glaser V., Santos A.R., Tasca C.I., PredigerR.D. 2011. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mech Ageing Dev*, 132(11-12): 560-567.

3. Brouillette J., Caillierez R., Zommer N., Alves-Pires C., Benilova I., Blum D., Buée L. 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-β1–42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *Journal of Neuroscience*, 32(23): 7852-7861.

4. Burger C. 2010. Region-specific genetic alterations in the aging hippocampus: implications for cognitive aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2: 1-12.

5. Cotman C.W., Berchtold N.C. 2002 Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences*, 25(6): 295-301.

6. Cracchiolo J.R., Mori T., Nazian S.J., Tan J., Potter H., Arendash G.W. 2007. Enhanced cognitive activity-over and above social or physical activity-is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Aβ deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(3): 277-294.

7. Dao A.T., Zagaar M.A., Alkadhi K.A. 2015. Moderate treadmill exercise protects synaptic plasticity of the dentate gyrus and related signaling cascade in a rat model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 52(3): 1067-1076.

8. Erickson K.I., Voss M.W., Prakash R. S., Basak C., Szabo A., Chaddock L., Kramer A.F. 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 108(7): 3017-3022.

9. Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5): 1121-1129.

10. Ghonsulakandi S.H., Sheikh M., Shasaltaneh M.D., Chopani S., Naghdi N. 2017. 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*, 178(2): 235-245.

11. Haass C., Selkoe D.J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8(2): 101-112.

12. Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Andreasson U., Londos E., Minthon L., Blennow K. 2007. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ42/Aβ40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dementia and Ggeriatric Cognitive Disorders,* 23(5): 316-320.

13. Jan A., Hartley D.M., Lashuel H.A. 2010. Preparation and characterization of toxic Aβ aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nature Protocols,* 5(6): 1186-1209.

14. Jiang S., Li Y., Zhang X., Bu G., Xu H., Zhang Y.W. 2014. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration,* 9(1): 6.

15. Kang E.B., Kwon I.S., Koo J.H., Kim E.J., Kim C.H., Lee J., Cho J.Y. 2013. Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during Aβ-induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis,* 18(11): 1332-1347.

16. Kang E.B., Cho J.Y. 2014. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and β-amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of exercise Nutrition and Biochemistry,* 18(1): 89-96.

17. Kodali M., Megahed T., Mishra V., Shuai B., Hattiangady B., Shetty A.K. 2016. Voluntary running exercise-mediated enhanced neurogenesis does not obliterate retrograde spatial memory. *Journal of Neuroscience,* 36(31): 8112-8122.

18. Liang K.Y., Mintun M.A., Fagan A. M., Goate A.M., Bugg J.M., Holtzman D.M., Morris J.C., Head D. 2010. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Annuals of Neurology,* 68(3): 311-318.

19. Liu H.l., Zhao G., Zhang H. 2013. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behavior and Brain Research,* 256: 261-272.

20. Nath S., Agholme L., Kurudenkandy F.R., Granseth B., Marcusson J., Hallbeck M. 2012. Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β-amyloid. *Journal of Neuroscience,* 32(26): 8767-8777.

21. O'Brien R.J., Wong P.C. 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of Neuroscience,* 34: 185-204.

22. Parachikova A., Nichol K., Cotman C. 2008. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiological Disease,* 30(1): 121-129.

23. Puzzo D., Sapienza S., Arancio O., Palmeri A. 2008. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatric Disease and Treatment,* 4(2): 371-387.

24. Reuben D.B., Judd-Hamilton L., Harris T.B., Seeman T.E. 2003. The Associations Between Physical Activity and Inflammatory Markers in High-Functioning Older Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *Journal of the American Geriatrics Society,* 51(8): 1125-1130.

25. Rolland Y., Abellan van Kan G., Vellas B. 2010. Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clinics in Geriatric Medicine,* 26(1): 75-87.

26. Shahed, A., Ravasi, A. A., Choubineh, S., & Khodadadi, D. 2018. 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. *Journal of Arak University of Medical Sciences,* 20(11): 56-66.

27. Soheili Kashani M., Salami M., Rezaei Tavirani M., Talaei Zavareh S.A. 2010. Maze training improves learning in an

Alzheimer model of rat. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 14(3): 209-216.

28. Souza L.C., Filho C.B., Goes A.T., Del Fabbro L., de Gomes M.G., Savegnago L., Oliviera M.S., Jesse C.R. 2013. Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β-amyloid 1–40 peptide. *Neurotoxicity Research*, 24(2): 148-163.

29. Storey E., Cappai R. 1999. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 25(2): 81-97.

30. Stranahan A.M., Lee K., Becker K.G., Zhang Y., Maudsley S., Martin B., Cutler R.G., Mattson M.P. 2010. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiology of Aging*, 31(11): 1937-1949.

31. Voss M.W., Prakash R.S., Erickson, K.I., Basak C., Chaddock L., Kim J.S., Kramer A.F. 2010. Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2: 1-17

32. Yuede C.M., Zimmerman S.D., Dong H., Kling M.J., Bero A.W., Holtzman D.M., Timson B.F., Csernansky J.G. 2009. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 35(3): 426-432.

33. Zagaar M., Alhaider I., Dao A., Levine A., Alkarawi A., Alzubaidy M., Alkadhi K. 2012. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiologi cal and molecular evidence. *Neurobiology of Disease*, 45(3): 1153-1162.