

The effect of four weeks of aerobic exercise on cognitive function and expression levels of PGC α and VEGF genes in the hippocampus of old rats¹

Ensieh Ahmadpour

PhD. Student, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
ncahmadpour[✉]@gmail.com

Maghsoud Peeri

Professor, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (**Corresponding author**).
m.peeri@iauctb.ac.ir

Mohammad Ali Azarbayjani

Professor, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

Abstract

Aging is an important risk factor for cognitive functions. On the other hand, exercise improves brain health and improves cognitive functions. However, the mechanisms of these benefits have not yet been fully elucidated. Therefore, the present study was conducted with the aim of investigating the effect of four weeks of intermittent aerobic exercise with moderate intensity on cognitive function and the expression level of PGC α and VEGF genes in the hippocampus of old rats. For this purpose, 30-month-old male Wistar rats were divided into 2 exercise training groups (number = 8 heads) and control (number = 8 heads). The animals of the sports group performed intermittent aerobic training with moderate intensity for 4 weeks, 6 days a week. In order to investigate learning and spatial memory, the animals were subjected to the Morris water maze test 24 hours after the last training session. Then, the animals were killed and the hippocampal tissue was extracted. Real time-PCR method was used to measure gene expression. Statistical analysis was done using independent t-test and Pearson's correlation coefficient at a significant level of $P \leq 0.05$. The results showed that aerobic exercise improved learning performance ($P \geq 0.05$) and spatial memory ($P \geq 0.001$) and the expression level of PGC α ($P \geq 0.01$) and VEGF ($P \geq 0.001$) increasing. Also, a significant positive correlation between PGC α gene expression and

¹ Received: 2022/03/30; Revised: 2022/05/05; Accepted: 2022/07/13; Published online: 2022/12/22

Article type: Research Article

Publisher: Qom Islamic Azad University

© the authors



VEGF gene expression in the hippocampus was observed ($p \geq 0.001$, $r = 0.894$). In addition, there was a significant inverse relationship between VEGF gene expression and the average time spent to find the platform ($p \geq 0.05$, $r = -0.578$), and there was a significant positive relationship with the time spent in the quadrant of the target circle ($p \geq 0.01$, $r = 0.713$). In general, aerobic exercise improves learning performance and spatial memory in old animals; It seems that exercise-induced upregulation of the PGC α /VEGF signaling pathway in the brain is at least partially involved in this adaptation.

Keywords: Aging, Learning, Spatial memory, Aerobic exercise, Male Wistar rats, Hippocampus.

تأثیر ۴ هفته تمرین هوازی بر عملکرد شناختی و میزان بیان ژن‌های α PGC1 و VEGF در هیپوکمپ رت‌های پیر^۱

انسیه احمدپور

دانشجوی دکتری، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ncahmadpour47@gmail.com

مقصود پیری

استاد، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول). m.peeri@iauctb.ac.ir

محمدعلی آذربایجانی

استاد، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر عملکرد شناختی و میزان بیان ژن‌های α PGC1 و VEGF در هیپوکمپ رت‌های پیر بود. به این منظور، رت‌های نر نژاد ویستار ۲۰ ماهه به ۲ گروه تمرین ورزشی (تعداد = ۸ سر) و کنترل (تعداد = ۸ سر) تقسیم شدند. حیوانات گروه ورزشی، تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط را به مدت ۴ هفته، ۵ روز در هفته انجام دادند. جهت بررسی یادگیری و حافظه فضایی، حیوانات ۴۸ ساعت بدنبال آخرین جلسه تمرینی تحت آزمون ماز آبی 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 t مستقل و ضریب همبستگی پیرسون در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ انجام گرفت. نتایج نشان داد که تمرین هوازی باعث بهبود در

^۱ تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۲/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۰؛ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

© نویسندگان.



عملکرد یادگیری ($P \leq 0/05$) و حافظه فضایی ($P \leq 0/001$) شده و میزان بیان $PGC1\alpha$ ($P \leq 0/01$) و VEGF ($P \leq 0/001$) را افزایش می‌دهد. همچنین، ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان ژن $PGC1\alpha$ با بیان ژن VEGF در هیپوکمپ مشاهده شد ($r=0/894, p \leq 0/001$). به علاوه، بین بیان ژن VEGF با میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو، ارتباط معکوس معنی‌دار ($r=-0/578, p \leq 0/05$)، و با مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف، ارتباط مثبت معنی‌داری وجود داشت ($r=0/713, p \leq 0/01$). به طور کلی، تمرین هوازی موجب بهبود عملکرد یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات پیر می‌شود؛ به نظر می‌رسد که تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی $PGC1\alpha$ /VEGF ناشی از ورزش در مغز، حداقل تا بخشی، در این سازگاری نقش دارد.

کلیدواژه‌ها: پیری، یادگیری، حافظه فضایی، ورزش هوازی، عملکرد شناختی، بیان ژن، $PGC1\alpha$ ، VEGF، هیپوکمپ،

رت‌های پیر.

مقدمه

پیری یکی از عوامل خطرآفرین مهم، برای بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت و زوال عقل^۱ محسوب می‌شود، که یکپارچگی بدن و مغز را به خطر می‌اندازد (بیکر^۲ و همکاران، ۲۰۱۲). وقوع زوال عقل به تجمع عوامل خطرزا و محافظتی در طول زندگی نسبت داده می‌شود و فعالیت بدنی و ورزش می‌تواند به حفظ مغز پیر سالم کمک کند. مطالعات همه‌گیرشناسی و پایه تأکید داشته‌اند که نداشتن فعالیت بدنی - که یکی از عناصر شیوه زندگی قابل اصلاح است - می‌تواند، زوال عقل مرتبط با پیری و توسعه دمانس را متأثر سازد (رولاند^۳ و همکاران، ۲۰۱۰).

مغز برای حفظ سوخت و ساز سلول‌های عصبی به وسیله سوبستراهای انرژی درون سلولی^۴، محدودیت دارد و از این نظر به شدت به فراهمی جریان خون مغزی^۵ توسط قلب و عروق وابسته است. بنابراین، اختلال در عملکرد قلبی-عروقی مرتبط با سن ممکن است، تنظیم جریان خون مغزی را تضعیف نموده و هموستاز^۶ عصبی را مختل نماید (دلانور^۷، ۲۰۰۴). اخیراً، لوئیس و همکاران^۸ (۲۰۱۸) بین جریان خون مغزی و عملکرد شناختی در سالمندان ارتباطی گزارش کرده‌اند؛ در این مطالعه نشان داده شد که بین جریان خون مغزی بالاتر و عملکرد بهتر در اعمال اجرایی، توجه و حافظه ارتباط معنی‌داری وجود دارد که با نقش پیشنهادی همودینامیک مغزی^۹ در کاهش عملکرد شناختی مطابقت دارد (لوئیس^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۸).

در مقابل، مداخلات دارویی و غیردارویی که بتوانند اختلال در عملکرد قلب و عروق مرتبط با سن را کاهش دهند، ممکن است، فراهمی جریان خون مغزی را بهبود ببخشند و در نتیجه، خطر نقص شناختی را کاهش دهند. در همین راستا، مطالعات قبلی مزایای بالقوه تمرینات هوازی بر سلامت مغز و عملکرد شناختی را نشان داده‌اند (کاتمن^{۱۱} و همکاران،

۱. Dementia

۲. Baker

۳. Rolland

۴. Intracellular energy substrates

۵. Cerebral blood flow

۶. Homeostasis

۷. de la Torre

۸. Leeuwis

۹. Cerebral hemodynamics

۱۰. Leeuwis

۱۱. Cotman

(۲۰۰۷). 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^۳ و نورونز^۴ در حیوانات با شیوه‌های مختلف تمرینات ورزشی است (ایتلکوفر و کاتمن^۵، ۲۰۱۳). از عوامل مهمی که اثرات مفید فعالیت ورزشی را بر مغز القاء می‌کنند، عوامل رشد عصبی هستند که از آن جمله می‌توان به عامل رشد آندوتلیال عروقی^۶ (VEGF) اشاره کرد.

آنژیونز^۷ به معنی افزایش چگالی مویرگ‌های عضله اسکلتی، قلبی و مغز است. ایجاد مویرگ جدید نیازمند تکثیر و مهاجرت سلول‌های آندوتلیال مویرگی است (آدام و علیتالو^۸، ۲۰۰۷). فاکتورهای رشدی زیادی در فرایند آنژیونز درگیر هستند؛ اما اکثر مطالعات از VEGF به عنوان مهم‌ترین عامل درگیر در این فرایند نام برده‌اند (روئیز^۹ و همکاران، ۲۰۰۹). VEGF گلیکوپروتئین ۴۵ کیلودالتونی است که از سلول‌های توموری و سلول‌های آندوتلیالی ترشح می‌شود و از طریق اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود یعنی VEGFR-۱ و VEGFR-۲ واقع در سلول‌های آندوتلیال پیام‌رسانی خود را انجام می‌دهد (آدام و علیتالو، ۲۰۰۷). در ادامه VEGF از طریق تنظیم افزایشی مؤلفه‌های آنتی‌آپوپتوتیک (کای^{۱۰} و همکاران، ۲۰۰۳)، سنتز DNA (سولپیس^{۱۱} و همکاران، ۲۰۰۹)، تخریب غشای پایه (چانگ^{۱۲} و همکاران، ۲۰۰۹)، و فسفریله شدن اجزاء چسبنده آندوتلیال بین سلولی و اتصالات محکم (بتیس^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۹) به ترتیب زمینه بقاء، تکثیر، مهاجرت، و نفوذپذیری سلول‌های آندوتلیال را موجب می‌شود. گزارش شده است که کاهش وابسته به سن در ظرفیت آنژیونز مغزی با کاهش بیان VEGF مرتبط است (ریوارد^{۱۴} و همکاران، ۲۰۰۰؛ ویبولوراکول و پاتومراج^{۱۵}،

۱. Dentate Gyrus (DG)

۲. Dendritic spines

۳. Synaptic plasticity

۴. Neurogenesis

۵. Intlekofer & Cotman

۶. Vascular endothelial growth factor

۷. Angiogenesis

۸. Adams & Alitalo

۹. Ruiz

۱۰. Cai

۱۱. Sulpice

۱۲. Chang

۱۳. Bates

۱۴. Rivard

۱۵. Viboolvorakul & Patumraj

۲۰۱۴). همچنین، نشان داده شده است که VEGF علاوه بر تحریک رگ‌زایی، اثرات مستقیمی بر انواع نرون‌ها از جمله سلول‌های بنیادی دارد؛ به طوری که کاهش مقادیر VEGF باعث تخریب نرونی می‌گردد (اوستوس^۱ و همکاران، ۲۰۰۱). با اینکه مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند که VEGF به دنبال تمرینات هوازی افزایش می‌یابد (ویبولوراکول و پاتومراج، ۲۰۱۴؛ زارع‌زاده مهریزی و همکاران، ۱۳۹۸)، با این حال سازوکار دقیق این امر به طور کامل شناخته نشده است. مطالعات نشان داده‌اند که ورزش از طریق افزایش PGC α بیان VEGF و آنژیوژنز را در عضله اسکلتی به صورت مثبت تنظیم می‌کند (آرانی^۲ و همکاران، ۲۰۰۸). با این حال، هنوز مطالعه‌ای در تغییرات احتمالی ناشی از ورزش هوازی در مسیر پیام‌رسانی PGC α /VEGF در مغز حیوانات پیر صورت نگرفته است. همچنین، پژوهشی به طور کامل تبیین نکرده است، که آیا تنظیم مثبت ناشی از ورزش در این عوامل می‌تواند موجب عملکرد شناختی بهتر در شرایط پیری شود؟ بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر عملکرد شناختی و میزان بیان ژن‌های PGC α و VEGF در هیپوکمپ رت‌های پیر انجام شد.

روش‌شناسی پژوهش

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل است. به این منظور، تعداد ۱۶ سر رت نر 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 غذای استاندارد، محدودیتی نداشتند. به دنبال یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، همه 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 ۲ گروه 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.۱۴۰۰,۰۱۳ انجام شد.

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

۱. Oosthuyse

۲. Arany

که در سه نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۲ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها انجام می‌شد. در هفته چهارم، رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار نوبت ۱۵ دقیقه‌ای با ۳ وقفه ۵ دقیقه‌ای بین آنها تمرین کردند (خدادادی و همکاران، ۲۰۱۸؛ زاگار^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). 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 یادگیری و حافظه فضایی حیوانات از آزمون ماز آبی موریس استفاده شد که ۴۸ ساعت به دنبال آخرین جلسه تمرینی اجرا شد. دستگاه رفتاری شامل یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی بود که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن از آب 21 ± 2 درجه سانتیگراد پر شده بود. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم‌افزار *Etho Vision V* و دوربینی که در بالای مخزن قرار می‌گرفت، ردیابی و ثبت می‌شد. روش آموزش ماز آبی به این صورت 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 ۲ گروه به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کارآزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در وسط ربع سوم (جنوب شرقی) قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. در شروع هر کارآزمایی ابتدا به هر رت مدت 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 زمان پیدا کردن سکو (تأخیر در رسیدن به سکو) در هر بار آموزش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. آزمون پروب (انتقال): یک روز 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 سفید رنگ، مرئی شد و هم‌سطح با آب قرار گرفت تا به صورت واضح دیده شود. سپس، حیوان شنا می‌کرد 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 (خدادادی و همکاران، ۱۳۹۶).

^۱. Zagaar

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 هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ g 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 کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول به مدت ۳-۲ 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، ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شستشو 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 ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. سنتز cDNA به وسیله (Applied Biosystems)-high capacity 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 (Real time-PCR): برای اندازه‌گیری بیان ژن با استفاده از روش کمی 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 C_t مشاهده شود. Real time-PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA به صورت duplicate انجام گرفت. توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه براساس 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 گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز^۱ (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده شد و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (فافل^۲، ۲۰۰۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد مطالعه

Gene	Forward/Reverse	Primer (۵' → ۳')
PGC α	F	TCAGCGGTCTTAGCACCTA
	R	TCTCTGTGGGTTTGGTGTGA
VEGF	F	ATGAACTTTCTGCTCTCTTGGGT
	R	AAGCTGCCTCGCCTTGCAACGCG
GAPDH	F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
	R	CATACTCAGCACCAGCATCACC

در پایان، طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. همچنین، بررسی همسان بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون لوین انجام شد. تحلیل داده‌های یادگیری و حافظه فضایی و همچنین متغیرهای بیان ژن با استفاده از آزمون t مستقل صورت گرفت. 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^۸ استفاده شد.

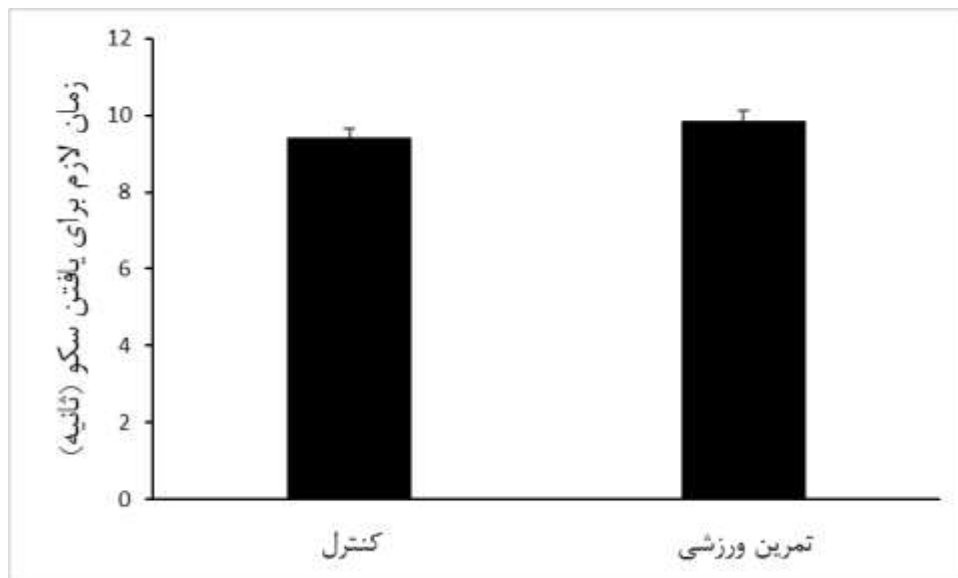
نتایج

در اجرای آزمون سکوی آشکار، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت ($p > 0/05$) (شکل ۱ الف). نتایج آزمون t مستقل نشان داد، که میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در طی ۴ روز مرحله یادگیری در گروه تمرین ورزشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود ($p \leq 0/05$, $t=2/361$) (نمودار ۱ ب). نتایج آزمون t مستقل نشان داد که مدت زمان صرف شده در ربع دایره هدف در آزمون پروب برای گروه تمرین ورزشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر است ($p \leq 0/001$, $t=-10/23$) (نمودار ۱ ج).

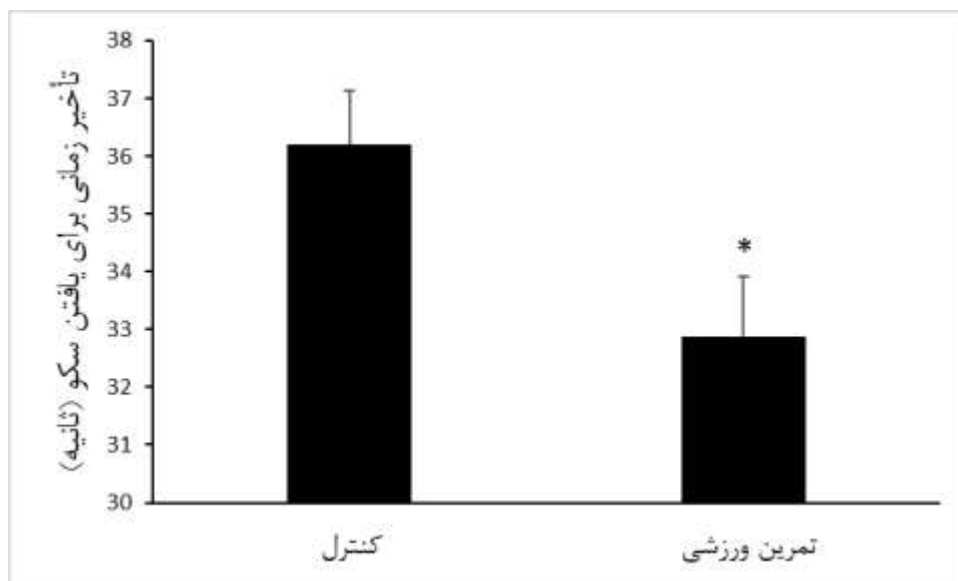
۱. Glyceraldehyde-۳-phosphate dehydrogenase

۲. Pfaffl

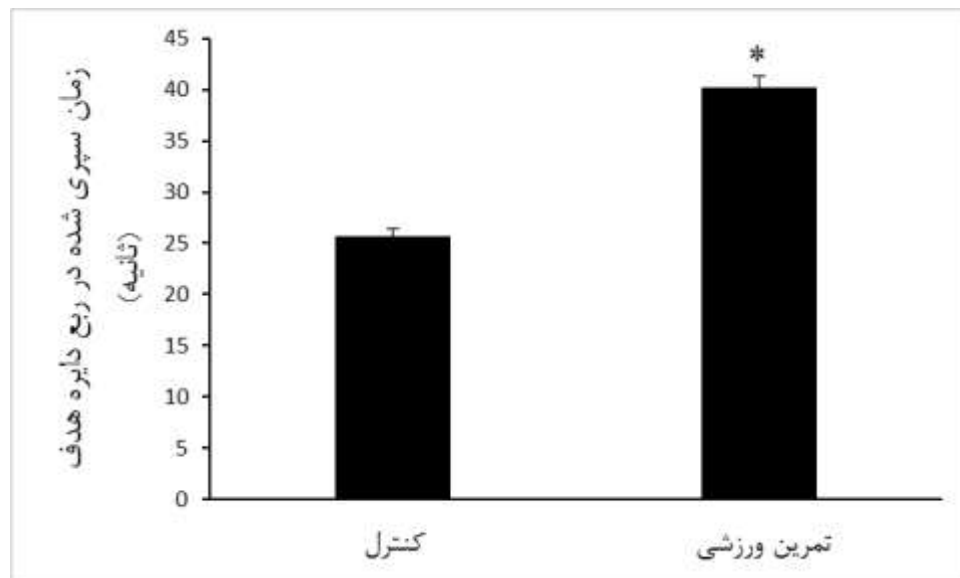
(الف)



(ب)

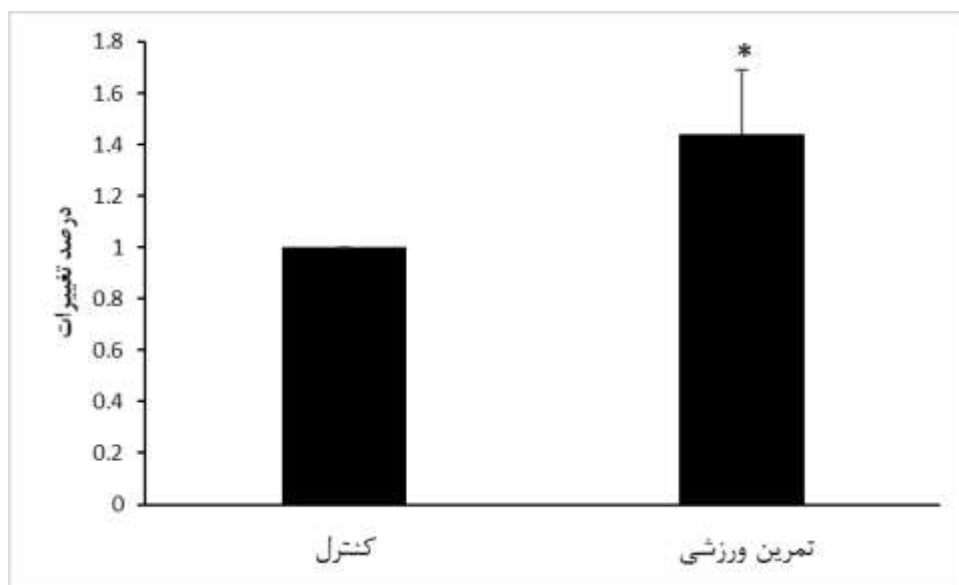


ج



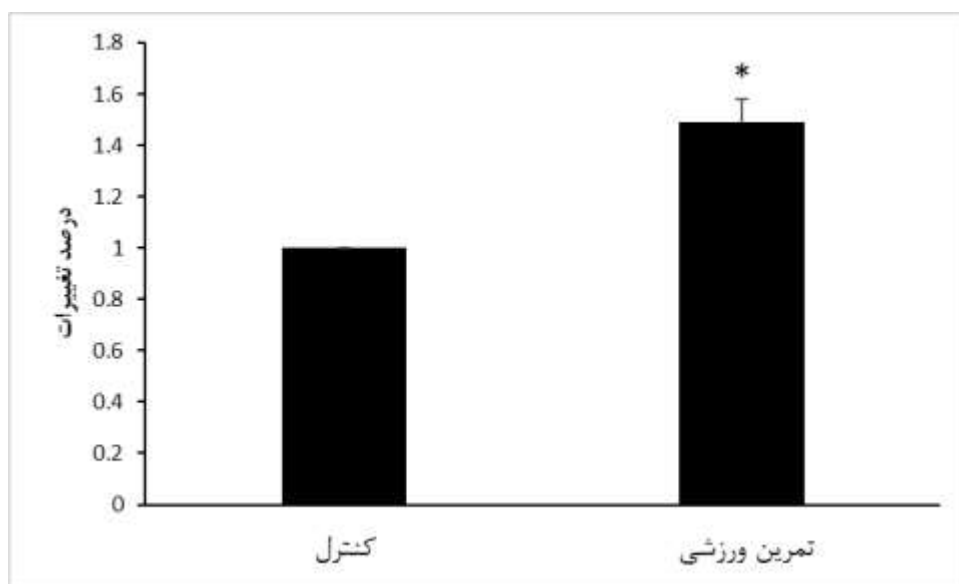
نمودار ۱- الف) میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در آزمون سکوی آشکار؛ ب) میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در مرحله یادگیری ج) مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف در آزمون پروب. *: $P \leq 0/05$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

نتایج آزمون t مستقل نشان داد که میزان بیان $PGC1\alpha$ در حیواناتی که تمرین ورزشی انجام داده بودند، به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P \leq 0/01$) (شکل ۲).



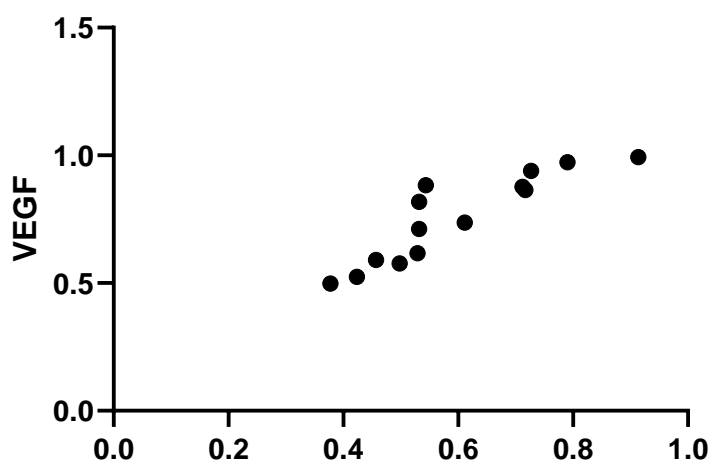
شکل ۲- میزان بیان ژن $PGC1\alpha$ در گروه‌های مطالعه. *: $P \leq 0/01$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

نتایج آزمون t مستقل نشان داد که میزان بیان VEGF در حیواناتی که تمرین ورزشی انجام داده بودند، به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P \leq 0/001$) (شکل ۳).



شکل ۳- میزان بیان ژن VEGF در گروه‌های مطالعه. *: $P \leq 0/01$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

تحلیل آماری پیرسون نشان داد که ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان ژن α PGC با بیان ژن VEGF در هیپوکمپ وجود دارد ($r=0/894, p\leq 0/001$) (شکل ۴). همچنین، بین بیان ژن VEGF با میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو ارتباط معکوس معنی‌دار ($r=-0/578, p\leq 0/05$)، و با مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف ارتباط مثبت معنی‌داری وجود داشت ($r=0/713, p\leq 0/01$) (جدول ۱).



شکل ۴- ارتباط بین میزان بیان ژن‌ها ($r=0/894, p\leq 0/001$)

جدول ۱- 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)	
PGC1α	-۰/۵۳۰	۰/۰۵۱	۰/۵۱۱	۰/۰۶۲	
VEGF	-۰/۵۷۸	۰/۰۳*	۰/۷۱۳	۰/۰۰۴**	

* همبستگی معنی‌دار در سطح $P \leq 0/05$

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

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط بر عملکرد شناختی و میزان بیان ژن‌های $PGC1\alpha$ و $VEGF$ در هیپوکمپ رت‌های پیر انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین هوازی افت عملکرد شناختی مرتبط با افزایش سن را بهبود می‌بخشد و بیان ژن‌های $PGC1\alpha$ و $VEGF$ در هیپوکمپ رت‌های پیر را به صورت مثبت تنظیم می‌کند. همچنین، همبستگی مثبت قوی بین بیان ژن $PGC1\alpha$ با بیان ژن $VEGF$ در هیپوکمپ مشاهده شد. به علاوه، بین بیان ژن $VEGF$ با یادگیری و حافظه فضایی همبستگی وجود داشت. این یافته‌ها از این ایده که تمرین هوازی از طریق تعدیل مسیر پیام‌رسانی $PGC1\alpha/VEGF$ در مغز حیوانات پیر موجب بهبود یادگیری و حافظه فضایی می‌شود، حمایت می‌کنند.

نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که تمرینات هوازی، مورفولوژی عروق را تغییر می‌دهد و موجب آنژیوژنز می‌شود که در نتیجه، جریان خون ارگان بهبود می‌یابد (پریور^۱ و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین، تمرینات هوازی، یادگیری و حافظه فضایی را بهبود می‌بخشد، افسردگی و اختلالات نرونی را کاهش می‌دهد و موجب افزایش عملکرد شناختی می‌شود. با این حال، سازوکارهای تنظیمی این سازگاری‌های ناشی از ورزش هوازی هنوز به طور کامل تبیین نشده است. به نظر می‌رسد که یکی از این سازوکارها مسیر پیام‌رسانی $PGC1\alpha/VEGF$ باشد که نقش مهمی در فرآیندهای آنژیوژنز و نوروژنز ایفا می‌کند. پیشتر نشان داده شده بود که ورزش از طریق افزایش $PGC1\alpha$ بیان $VEGF$ و آنژیوژنز در عضله اسکلتی را به صورت مثبت تنظیم می‌کند (آرانی و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر، نشان داده شد که تمرین هوازی تناوبی با شدت متوسط می‌تواند موجب افزایش بیان ژن‌های $PGC1\alpha$ و $VEGF$ در بافت هیپوکمپ حیوانات پیر شود.

افزایش بیان ژن $PGC1\alpha$ در مغز با مطالعات عظیمی و همکاران (عظیمی و همکاران، ۲۰۱۸) و ورن^۲ و همکاران (۲۰۱۳) همخوانی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی هوازی با افزایش بیان $PGC1\alpha$ منجر به تحریک بیوژنز میتوکندری^۳ در عضلات اسکلتی (فینک و کلی^۴، ۲۰۰۶) و نواحی مختلف مغز می‌شود (ستینر^۵ و همکاران، ۲۰۱۱). به نظر می‌رسد که فعالیت ورزشی هوازی با افزایش عملکرد و فعالیت نورون‌های هیپوکمپ، منجر به افزایش کلسیم درون سلولی در این نورون‌ها شده و در نتیجه، از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی مختلف، افزایش پلاستیسیته سیناپسی را موجب می‌شود (عظیمی و همکاران، ۱۳۹۸). با این حال، اینکه فعالیت ورزشی دقیقاً با چه سازوکاری و با تحریک چه عناصری

۱. Prior

۲. Wrann

۳. Mitochondrial biogenesis

۴. Finck & Kelly

۵. Steiner

موجب افزایش بیان $PGC^1\alpha$ در هیپوکمپ می‌شود، هنوز به طور کامل تبیین نشده است. نقش عوامل متابولیکی از جمله پروتئین متصل‌شونده به عنصر پاسخ به $cAMP^1$ (CREB) و پروتئین‌کیناز فعال شده با آدنوزین مونو فسفات^۲ (AMPK) به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی بیان $PGC^1\alpha$ (فرشباغ و همکاران، ۲۰۱۶؛ یو و یانگ^۳، ۲۰۱۰). در افزایش ناشی از ورزش هوازی در بافت هیپوکمپ بسیار محتمل است؛ در نتیجه پیشنهاد می‌شود، این موضوع در مطالعات آینده مورد بررسی قرار بگیرد.

همسو با نتایج این مطالعه، ویبولوراکول و پاتومراج (۲۰۱۴)، رضایی و همکاران (۱۳۹۴) و زارعزاده و همکاران (۱۳۹۸) افزایش بیان ژن VEGF در مغز را گزارش کرده‌اند. بدین مفهوم که ویبولوراکول و پاتومراج (۲۰۱۴) نشان دادند، که هشت هفته تمرین هوازی می‌تواند تغییرات میکروواسکولار و هیپوپرفیوژن ناشی از افزایش سن را به واسطه تنظیم مثبت در بیان VEGF و eNOS بهبود بخشد (ویبولوراکول و پاتومراج، ۲۰۱۴). رضایی و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که هشت هفته تمرین تناوبی مداوم یا تمرین با شدت بالا می‌تواند میزان پروتئین‌های VEGF-A و VEGFR^۲ را افزایش دهند (رضایی و همکاران، ۱۳۹۴). زارعزاده مهریزی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند که هشت هفته تمرین هوازی می‌تواند از طریق افزایش $HIF-1\alpha$ بیان VEGF را به صورت مثبت تنظیم کند (زارعزاده مهریزی و همکاران، ۱۳۹۸). دینگ^۴ و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی اثر یک، سه و شش هفته تمرین هوازی روی تردمیل بر سطوح mRNA فاکتورهای آنژیوژنز از جمله VEGF، آنژیوپوئین ۱ و ۲ و ارتباط آن با چگالی مویرگی و کاهش حجم آسیب ناشی از سکنه گزارش کردند که چگالی مویرگی در هفته سوم در پی افزایش سطوح mRNA فاکتورهای VEGF و آنژیوپوئین ۱ و ۲ افزایش می‌یابد و این تغییرات با کاهش حجم آسیب ناشی از سکنه مغزی همراه است (دینگ و همکاران، ۲۰۰۶). اخیراً، کاراکیلیچ^۵ و همکاران (۲۰۲۱) نشان داده‌اند 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 (کاراکیلیچ و همکاران، ۲۰۲۱).

افزایش آنژیوژنز ناشی از ورزش هوازی در بیشتر مطالعات صورت گرفته در این زمینه گزارش شده است (کلیم، کوپر و وندربرگ^۶، ۲۰۰۲؛ سوین^۱ و همکاران، ۲۰۰۳). هنگامی که نیاز به اکسیژن در طول فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد، افزایش

^۱. cAMP response-element-binding protein

^۲. Adenosine monophosphate-activated protein kinase

^۳. Yu & Yang

^۴. Ding

^۵. Karakilic

^۶. Kleim, Cooper & VandenBerg

چگالی عروق خونی به بازگشت جریان خون کمک می‌کند تا اکسیژن بیشتری را به مغز تحویل دهد (راداک^۲ و همکاران، ۲۰۰۰). 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 (دینگ و همکاران، ۲۰۰۶). VEGF، نقش مرکزی در فرایندهای آنژیوژنز و واسکولوژنز ایفا می‌کند (لیانگ^۳ و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین، VEGF می‌تواند به عنوان یک عامل رشد عصبی عمل کرده و در فرایند نوروژنز هیپوکمپ ناشی از ورزش درگیر شود (فابل^۴ و همکاران، ۲۰۰۳). شواهدی وجود دارد که کمبود VEGF می‌تواند به بیماری‌های اختلال عملکرد عصبی منجر شود (لمبرچتز و کارملیت^۵، ۲۰۰۶). نشان داده شده است که سطح VEGF و عملکرد شناختی به هم مرتبط هستند (کائو و همکاران، ۲۰۰۴؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۶) و افزایش بیان VEGF در هیپوکمپ، عملکرد شناختی را بهبود می‌بخشد (کائو و همکاران، ۲۰۰۴). تزریق مسدودکننده گیرنده VEGF درون هیپوکمپ، عملکرد حافظه بلند مدت را کاهش داد (پاتی^۶ و همکاران، ۲۰۰۹). 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 می‌شود؛ به نظر می‌رسد که تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی $PGC1\alpha/VEGF$ ناشی از ورزش در مغز، حداقل تا بخشی، در این سازگاری نقش دارد.

ملاحظات اخلاقی

همه مراحل مربوط به کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره ۱۴۰۰،۰۱۳ IR.IAU.CTB.REC. انجام شد.

تشکر و قدردانی

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

۱. Swain

۲. Radák

۳. Liang

۴. Fabel

۵. Lambrechts & Carmeliet

۶. Pati

منابع

- خدادادی، داور؛ قراخانلو، رضا؛ نقدی، ناصر؛ سلیمی، مونا؛ عظیمی، سید محمد؛ شاهد، اتابک (۱۳۹۶). تأثیر ۴ هفته پیش آماده‌سازی ورزشی بر سطح آمیلوئیدبتای محلول و اختلال حافظه در رت‌های مبتلا به بیماری آلزایمر القاء شده با تزریق β ۲۸-۴۱. *مجله علوم پزشکی رازی*، ۲۴(۱۶۵)، ص ۷۶-۶۶.
- رضایی، رسول؛ نورشاهی، مریم؛ بیگدلی، محمدرضا؛ خداقلی، فریبا؛ حق‌پرست، عباس (۱۳۹۴). تأثیر هشت هفته تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید بر مقادیر VEGF-A و VEGFR-۲ بافت مغز موش‌های صحرایی نر ویستار. *فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی*، ۸(۲)، ص ۱۲۱۳-۱۲۲۱.
- زارع‌زاده مهریزی، علی اصغر؛ رجیبی، حمید؛ قراخانلو، رضا؛ نقدی، ناصر؛ عظیمی دخت، سید محمدعلی (۱۳۹۸). تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن عامل القای هایپوکسی (α -HIF)، عامل رشد اندوتلیال عروق (VEGF) و آنژیواستاتین هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار. *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد*، ۲۷(۱۱)، ص ۲۰۶۳-۲۰۷۵.
- عظیمی، سید محمد؛ قراخانلو، رضا؛ نقدی، ناصر؛ خدادادی، داور؛ زارع‌زاده مهریزی، علی اصغر (۱۳۹۸). تأثیر دویدن روی نوارگردان با شدت کم بر بیان ژن‌های α -PGC، FNDC۵ و BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر. *مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش*، ۷(۱۴)، ص ۹۱-۱۰۱.

- Adams, R.H. & Alitalo, K. (۲۰۰۷). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, ۸(۶), p. ۴۶۴-۴۷۸.
- Arany, Z. & et al. (۲۰۰۸). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC- α . *Nature*, ۴۵۱(۷۱۸۱), p. ۱۰۰۸-۱۰۱۲.
- Azimi, M., Gharakhanlou, R., Naghdi, N., Khodadadi, D. & Heysieattalab, S. (۲۰۱۸). Moderate Treadmill Exercise Ameliorates Amyloid- β -Induced Learning and Memory Impairment, possibly via Increasing AMPK Activity and Up-regulation of the PGC- α /FNDC۵/BDNF Pathway. *Peptides*, Vol. ۱۰۲, p. ۷۸-۸۸.
- Baker, L.D. & et al. (۲۰۱۲). High-intensity physical activity modulates diet effects on cerebrospinal amyloid- β levels in normal aging and mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, ۲۸(۱), p. ۱۳۷-۱۴۶.
- Bates, K., Verdile, G., Li, Q., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. & Martins, R. (۲۰۰۹). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*, ۱۴(۱۲), p. ۱۱۴۴. DOI: ۱۰.۱۰۳۸/mp.۲۰۰۸.۹۶

- Cai, J., Ahmad, S., Jiang, W.G., Huang, J., Kontos, C.D., Boulton, M. & Ahmed, A. (۲۰۰۳). Activation of vascular endothelial growth factor receptor- γ sustains angiogenesis and Bcl- γ expression via the phosphatidylinositol γ -kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes*, ۵۲(۱۲), p. ۲۹۰۹-۲۹۶۸ .
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D. & During, M.J. (۲۰۰۴). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature genetics*, ۳۶(۸), p. ۸۲۷-۸۳۰ .
- Chang, S.-H. & et al. (۲۰۰۹). VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation. *Cancer research*, ۶۹(۱۰), p. ۴۵۳۷-۴۵۴۴ .
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C. & Christie, L.-A. (۲۰۰۷). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences*, ۳۰(۹), p. ۴۶۴-۴۷۲ .
- de la Torre, J.C. (۲۰۰۴). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *The Lancet Neurology*, ۳(۳), p. ۱۸۴-۱۹۰ .
- Ding, Y.-H., Li, J., Zhou, Y., Rafols, J.A., Clark, J.C. & Ding, Y. (۲۰۰۶). Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Current neurovascular research*, ۳(۱), p. ۱۵-۲۳ .
- Fabel, K. & et al. (۲۰۰۳). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, ۱۸(۱۰), p. ۲۸۰۳-۲۸۱۲ .
- Farshbaf, M.J., Ghaedi, K., Megraw, T.L., Curtiss, J., Faradonbeh, M. S., Vaziri, P. & Nasr-Esfahani, M.H. (۲۰۱۶). Does PGC α /FNDC β /BDNF elicit the beneficial effects of exercise on neurodegenerative disorders? *Neuromolecular medicine*, ۱۸(۱), p. ۱-۱۵ .
- Finck, B.N. & Kelly, D.P. (۲۰۰۶). PGC- γ coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, ۱۱۶(۳), p. ۶۱۵-۶۲۲ .
- Intlekofer, K.A. & Cotman, C.W. (۲۰۱۳). Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, No. ۵۷, p. ۴۷-۵۵ .
- Karakilic, A. & et al. (۲۰۲۱). Regular aerobic exercise increased VEGF levels in both soleus and gastrocnemius muscles correlated with hippocampal learning and VEGF levels. *Acta neurobiologiae experimentalis*, ۸۱(۱).
- Khodadadi, D., Gharakhanlou, R., Naghdi, N., Salimi, M., Azimi, M., Shahed, A. & Heysieattalab, S. (۲۰۱۸). Treadmill Exercise Ameliorates Spatial Learning and Memory Deficits Through Improving the Clearance of Peripheral and Central Amyloid-Beta Levels. *Neurochemical Research*, ۴۳(۸), p. ۱۵۶۱-۱۵۷۴. DOI: ۱۰.۱۰۰۷/s۱۱۰۶۴۰-۰۱۸-۲۵۷۱-۲۱۱-۱۴.
- Kleim, J.A., Cooper, N.R. & VandenBerg, P.M. (۲۰۰۲). Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain research*, ۹۳۴(۱), p. ۱-۶ .

- Lambrechts, D. & Carmeliet, P. (۲۰۰۶). VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, ۱۷۶۲(۱۱-۱۲), p.۱۱۰۹-۱۱۲۱ .
- Leeuwis, A.E. & et al. (۲۰۱۸). Cerebral blood flow and cognitive functioning in a community-based, multi-ethnic cohort: the SABRE study. *Frontiers in aging neuroscience*, ۱۸(۱۰), p.۲۷۹. DOI: ۱۰,۳۳۸۹/fnagi.۲۰۱۸,۰۰۲۷۹ ۱۰, ۲۷۹ .
- Liang, D., Chang, J.R., Chin, A.J., Smith, A., Kelly, C., Weinberg, E.S. & Ge, R. (۲۰۰۱). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mechanisms of development*, ۱۰۸(۱-۲), p.۲۹-۴۳ .
- Oosthuysen, B. & et al. (۲۰۰۱). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature genetics*, ۲۸(۲), p.۱۳۱-۱۳۸ .
- Pati, S., Orsi, S.A., Moore, A.N. & Dash, P.K. (۲۰۰۹). Intra-hippocampal administration of the VEGF receptor blocker PTK^{۷۸۷}/ZK^{۲۲۲۰۸۴} impairs long-term memory. *Brain research*, ۱۲۵۶, p.۸۵-۹۱ .
- Pfaffl, M.W. (۲۰۰۱). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, ۲۹(۹), p. e۴۵-e۴۵ .
- Prior, B.M., Yang, H. & Terjung, R.L. (۲۰۰۴). What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*, ۹۷(۳), p.۱۱۱۹-۱۱۲۸ .
- Radák, Z., Sasvári, M., Nyakas, C., Pucsok, J., Nakamoto, H. & Goto, S. (۲۰۰۰). Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Archives of biochemistry and biophysics*, ۳۷۶(۲), p.۲۴۸-۲۵۱ .
- Rivard, A. & et al. (۲۰۰۰). Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor ۱ activity. *Journal of Biological Chemistry*, ۲۷۵(۳۸), p.۲۹۶۴۳-۲۹۶۴۷ .
- Rolland, Y., van Kan, G.A. & Vellas, B. (۲۰۱۰). Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clinics in geriatric medicine*, ۲۶(۱), p.۷۵-۸۷ .
- Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M. & Carmeliet, P. (۲۰۰۹). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiological reviews*, ۸۹(۲), p.۶۰۷-۶۴۸ .
- Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D. & Davis, J.M. (۲۰۱۱). Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of Applied Physiology*, ۱۱۱(۴), p.۱۰۶۶-۱۰۷۱ .
- Sulpice, E. & et al. (۲۰۰۹). Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biology of the Cell*, ۱۰۱(۹), p.۵۲۵-۵۳۹ .
- Swain, R.A. & et al. (۲۰۰۳). Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, ۱۱۷(۴), p.۱۰۳۷-۱۰۴۶ .

- Viboolvorakul, S. & Patumraj, S. (۲۰۱۴). Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *BioMed research international*, DOI: ۱۰,۱۱۵۵/۲۰۱۴/۲۳۰۷۹۱
- Wang, Y., Galvan, V., Gorostiza, O., Ataie, M., Jin, K. & Greenberg, D.A. (۲۰۰۶). Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain research*, ۱۱۱۵(۱), p.۱۸۶-۱۹۳ .
- Wrann, C.D. & et al. (۲۰۱۳). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC- α /FNDC α pathway. *Cell metabolism*, ۱۸(۵), p.۶۴۹-۶۵۹ .
- Yu, L. & Yang, S. (۲۰۱۰). AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator- α and nuclear respiratory factor 1 expression in rat visual cortical neurons. *Neuroscience*, ۱۶۹(۱), p.۲۳-۳۸ .
- Zagaar, M., Alhaider, I., Dao, A., Levine, A., Alkarawi, A., Alzubaidy, M. & Alkadhi, K. (۲۰۱۲). The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiology of disease*, ۴۵(۳), p.۱۱۵۳-۱۱۶۲ .