

## Effect of Complex Voluntary Practice on Necroptosis-Related Genes Expression and Hippocampal Histology and Spatial Memory Function in Rat Model of Alzheimer's Disease

Kosar Zeini Zadeh<sup>1</sup>, Azam Zarneshan<sup>2</sup>, Karim Azali Alamdari<sup>3</sup>

1. Department of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: [kosarzeinizadeh@azaruniv.ac.ir](mailto:kosarzeinizadeh@azaruniv.ac.ir)
2. Department of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: [zarneshan@azaruniv.ac.ir](mailto:zarneshan@azaruniv.ac.ir)
3. Corresponding Author, Department of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: [k.azali@azaruniv.ac.ir](mailto:k.azali@azaruniv.ac.ir)

Article Info	ABSTRACT
<b>Article type:</b> Research	<b>Introduction:</b> little information is available regarding how to manipulate cerebral Necroptosis, which is common in Alzheimer's Disease (AD), with physical training along with cognitive challenges.
<b>Article history:</b> Received: 23 July 2023 Received in revised form: 13 August 2023 Accepted: 26 August 2023 Published online: 23 September 2023	<b>Methods:</b> Twenty-four male Wistar rats (4-6 weeks old) were randomly divided into three groups including Control-Healthy (C-H), Control-Alzheimer (C-ALZ), and Complex Training-Alzheimer (CWheel-ALZ). After AD induction by Streptozotocin (STZ) injection into the brain ventricle and confirming the disease with the shuttle box test, CWheel-ALZ training conducted for 12 weeks (by removal of 16 out of 38 metal floor rods which can be embedded in the spinning wheel, different distances in a random pattern were created). The time to exhaustion was measured using a treadmill and spatial memory functions were assessed by the Morris Water Maze test. After rats' euthanasia, the hippocampal CA1 pyramidal cell layer thickness and neuronal density were investigated by histochemical study, and necroptosis-related hippocampal genes' expression was evaluated by PCR method. Data were compared using One-way Analysis of Variance and Tukey's post hoc test.
<b>Keywords:</b> <i>Complex Voluntary Practice,</i> <i>Necroptosis,</i> <i>Alzheimer's Disease,</i> <i>Morphology.</i>	<b>Results:</b> In the Complex Training-Alzheimer's group, despite observing the improvement process in all the variables (observing a significant difference in all the variables in this group compared with the control-Alzheimer's group), a significant difference was still presented compared with the control-healthy group ( $P < 0.05$ ). <b>Conclusion:</b> Alzheimer's induction increases the probability of inflammation and necroptosis in the hippocampus and decreases the cognitive and physical function of rats, and complex voluntary training, despite having significant modifying effects, is not able to completely suppress these adverse effects of Alzheimer's disease. However, due to the lack of evidence and the existence of research limitations, there is still a need for further investigations.

**Cite this article.** Zeini Zadeh K., Zarneshan A., & Azali Alamdari K. Effect of Complex Voluntary Practice on Necroptosis-Related Genes Expression and Hippocampal Histology and Spatial Memory Function in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Sport Biosciences*. 2023; 15 (3): 77-96.  
DOI: <http://doi.org/10.22059/jsb.2023.362788.1597>



Journal of Sport Biosciences by University of Tehran Press is licensed under CC BY-NC 4.0.  
| Web site: <https://jsb.ut.ac.ir/> | Email: [jsb@ut.ac.ir](mailto:jsb@ut.ac.ir)

## Extended Abstract

### Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is characterized by a marked neuronal cell death with uncertainty as to the mechanisms of neuronal loss. Therefore, understanding the basic molecular mechanisms underlying the neurodegenerative process will be invaluable to the development of new therapeutic approaches. Classically, cell death has been classified into two main groups including apoptosis and necrosis. Apoptosis is a programmed form of cell death, whereas necrosis is an uncontrolled lysis of the cell. More recently, there has been a growing appreciation for necroptosis, a programmed form of necrosis. Necroptosis is mainly characterized by mimicking features of both necrosis and apoptosis. There are three key proteins involved in the execution of necroptosis: RIPK1, RIPK3, and MLKL. However, little information still is available regarding whether or not cerebral necroptosis could be manipulated by synergic physical training along with cognitive challenges.

### Methods

Twenty-four male Wistar rats (age: 4-6 weeks old) were randomly divided into three groups including Control-Healthy (C-H), Control-Alzheimer (C-ALZ), and Complex Training-Alzheimer (CWheel-ALZ). After AD induction by Streptozotocin (STZ) injection into the brain ventricle and confirming the disease with the shuttle box test, CWheel-ALZ training conducted for 12 weeks (by removal of 16 out of 38 metal floor rods which can be embedded in the spinning wheel, different distances in a random pattern were created). The time to exhaustion was measured using a treadmill and spatial memory functions were assessed by the Morris Water Maze test. After rats' euthanasia, the hippocampal CA1 pyramidal cell layer thickness and neuronal density were investigated by histochemical study, and necroptosis-related hippocampal genes' expression was evaluated by RT-PCR method. Data were compared using One-way Analysis of Variance and Tukey's post hoc test.

### Results

Expression levels of hippocampal RIPK1, MLKL, and TNFR1 genes as well as duration of spatial memory task function and time to exhaustion were higher in C-ALZ compared to C-H, while neuronal density and pyramidal CA1 cell layer thickness were lower ( $P < 0.05$ ). Despite restoration of all the measured variables in CWheel-ALZ rats (significant differences were observed compared to the C-ALZ group regarded all the variables), remarkable differences compared with H-C were still presented in post-intervention ( $P < 0.05$ ).

### Conclusion

AD elevates the likelihood of hippocampal inflammation and necroptosis along with both physical and mental performances. Previous evidence highlighted the contribution of necroptosis in the development and pathogenesis of AD. Necroptosis is positively linked to neuroinflammation and can be activated via the stimulation of certain death receptors including TNFR1 with its respective agonist TNF $\alpha$ . This TNF $\alpha$ /TNFR1 interaction, under certain conditions, causes phosphorylation of RIPK1. Accordingly, p-RIPK1 induces RIPK3 phosphorylation which in turn phosphorylates MLKL causing its oligomerization which migrates to the plasma membrane and destabilizes it causing cell lysis and necroptotic cell death.

Moreover, necroptosis not only occurs in Alzheimer's disease but also may play a crucial role due to several factors. Hyperglycemia activates the switch from apoptosis to necroptosis, and Alzheimer's disease is considered "diabetes type-3." Second, reactive oxygen species are produced in excess during necroptosis, and affect the production of amyloid beta in AD. Inflammation, a key consequence of necroptosis, also increases neurodegeneration and contributes to the overproduction of amyloid beta. These connections lend themselves to the 'starving brain' theory of AD, and insulin resistance exacerbates the role of necroptosis in the development of AD. Necroptosis may have a vicious cycle effect in AD due to various factors, and it is a key therapeutic target in AD that should be further examined. However, based on the results from this study, Complex wheel running fails to fully mitigate the adverse effects of AD, despite providing some appreciable amendments. Some studies showed that voluntary wheel running and treadmill running might differentially affect brain and behavior.

It is worth noting that exercise is crucial for preventing AD, although the exact underlying mechanism remains unclear. The findings of the current study suggest that although voluntary running on a complex wheel provides a protective effect against cognitive declines by reducing the severity of AD neuropathology, especially via manipulation of hippocampal necroptosis, however, this effect is not sufficient to fully overcome AD hazards. Therefore, more research is still warranted, because of study limitations and lack of similar evidence done in this area.

**Table 1.** Between-group comparison of the variables

Variable	CWheel-ALZ	C-ALZ	H-C
<b>Escape latency</b> (The time (in seconds) to find the platform)	111.78 ± 11.83 *p=0.029 † p=0.004	125.75 ± 11.41 *p=0.001	97.25 ± 7.97
<b>CA1 Pyramidal cell layer thickness</b> (mm)	0.034 ± 0.0038 *p=0.001 † p=0.009 NS	0.029 ± 0.0028 *p=0.001	0.056 ± 0.0066
<b>CA1 neural density</b> (n/μm <sup>2</sup> )	84.95 ± 9.69 *p=0.008 † p=0.004	67.7 ± 6.18 *p=0.001	100.88 ± 11.74
<b>Time to Exhaustion (s)</b>	45.28 ± 3.51 *p=0.015 NS † p=0.033 NS	42/30 ± 3.69 *p=0.008	49.21 ± 4.96
<b>Hippocampal RIPK1 expression level</b> (Fold change)	1.44 ± 0.35 *p=0.006 † p=0.038	1.79 ± 0.26 *p=0.001	1.00 ± 0.096
<b>Hippocampal MLKL expression level</b> (Fold change)	1.66 ± 0.15 *p=0.001 † p=0.001	2.19 ± 0.33 *p=0.001	1.00 ± 0.12
<b>Hippocampal TNFR1 expression level</b> (Fold change)	1.64 ± 0.17 *p=0.001 † p=0.001	2.81 ± 0.33 *p=0.001	1.00 ± 0.14

\* and †: respectively indicate the comparisons with C-H and C-ALZ groups.

#### Ethical Considerations:

**Compliance with ethical guidelines:** This research was approved by the ethics committee of the Sport Science Research Center with the ethical code of IR.SSRI.REC.1399.362

**Funding:** This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector

**Authors' contribution:** **Kosar Zeini Zadeh:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing the original draft. **Azam Zarneshan:** Supervision, Writing, Review, and Editing. **Karim Azali Alamdari:** Project administration, Supervision, Writing, Review, and Editing.

**Conflict of interest:** The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank **Dr. Elham Shabaviz**, who was responsible for measuring gene expression and histology analysis.

## تأثیر تمرین اختیاری پیچیده بر بیان ژن‌های مرتبط با نکروپتوز و هیستولوژی هیپوکامپ و عملکرد حافظه فضایی موش‌های مدل آلزایمر

کوثر زینی‌زاده<sup>۱</sup> ID، اعظم زرنشان<sup>۲</sup> ID، کریم آزالعی علمداری<sup>۳</sup> ID

۱. گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: [kosarzeinizadeh@gmail.com](mailto:kosarzeinizadeh@gmail.com)

۲. گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: [baraziliya@gmail.com](mailto:baraziliya@gmail.com)

۳. نویسنده مسئول، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: [azalof@azaruniv.ac.ir](mailto:azalof@azaruniv.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: پژوهشی	<b>مقدمه:</b> در مورد چگونگی دستکاری نکروپتوز مغزی شایع در بیماری آلزایمر توسط تمرین توأم بدنی همراه با چالش شناختی اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱	<b>روش پژوهش:</b> ۲۴ سر موش ویستار نر (۴-۶ هفته‌ای) به‌طور تصادفی به سه گروه شامل کنترل-سالم، کنترل-آلزایمر و تمرین پیچیده-آلزایمر تقسیم شدند. پس از القای AD با تزریق STZ به بطن مغز و تأیید ابتلا با از تست شاتل باکس، تمرین پیچیده-آلزایمر (با استفاده از حذف ۱۶ میله از مجموع ۳۸ میله قابل تعبیه در محیط چرخ دوار برای ایجاد فواصل مختلف با الگوی تصادفی) به مدت ۱۲ هفته انجام گرفت. زمان رسیدن به واماندگی با استفاده از ترمیل و حافظه فضایی با تست ماز موریس آبی بررسی شد. سپس حیوانات کشتار شدند و بررسی ضخامت و چگالی نورونی بخش CA1 هیپوکامپ با مطالعه هیستوشیمی و سنجش بیان ژن‌ها به روش PCR انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی مقایسه شدند.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۲۲	<b>یافته‌ها:</b> در گروه تمرین پیچیده-آلزایمر با وجود مشاهده روند اصلاح در تمام متغیرها (مشاهده تفاوت معنادار در مورد متغیرهای این گروه نسبت به گروه کنترل-آلزایمر)، هنوز تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل-سالم باقی بود ( $P < 0.05$ ).
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴	<b>نتیجه‌گیری:</b> القای آلزایمر موجب افزایش احتمال بروز التهاب و نکروپتوز در هیپوکامپ و کاهش عملکرد شناختی و بدنی موش‌ها می‌شود و تمرین اختیاری پیچیده با وجود دارا بودن تأثیرات اصلاحی قابل ملاحظه، قادر به فرو نشاندن کامل این تأثیرات سوء آلزایمر نیست. با این حال، به‌دلیل کمبود شواهد و وجود محدودیت‌های تحقیقی، همچنان نیاز به بررسی‌های بیشتر باقی است.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۰۱	

### کلیدواژه‌ها:

تمرین اختیاری پیچیده، نکروپتوز، آلزایمر، هیپوکامپ.

**استناد:** زینی‌زاده کوثر، زرنشان اعظم، آزالعی علمداری کریم. تأثیر تمرین اختیاری پیچیده بر بیان ژن‌های مرتبط با نکروپتوز و هیستولوژی هیپوکامپ و عملکرد حافظه فضایی

موش‌های مدل آلزایمر. نشریه علوم زیستی ورزشی. ۱۴۰۲؛ ۳(۱۵): ۷۷-۹۶.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jsb.2023.362788.1597>

دسترسی به این نشریه علمی، رایگان است و حق مالکیت فکری خود را بر اساس لایسنس کرییتیو کامنز (CC BY-NC 4.0) به نویسندگان واگذار کرده است. | آدرس نشریه: <https://jsb.ut.ac.ir/> | ایمیل: [jsb@ut.ac.ir](mailto:jsb@ut.ac.ir)



© نویسندگان.

ناشر: انتشارات دانشگاه تهران.



## مقدمه

بیماری آلزایمر یک اختلال پیشرونده و برگشت‌ناپذیر عصبی است [۱، ۲] که هنوز روش درمان مؤثری برای جلوگیری از گسترش آن وجود ندارد و درمان‌های موجود تنها کارایی محدودی برای تسکین برخی علائم (همراه با عوارض جانبی) را دارند. با اینکه، AD با تجمع تائو پروتئین، آمیلوئید $\beta$  و التهاب عصبی همراه است، اما تحلیل نورونی، بارزترین جنبه این بیماری است (آتروفی مغز، حتی ۱۰ سال پیش از شروع زوال عقل روی می‌دهد [۳] که سازوکار دقیق این مرگ نورونی همچنان ناشناخته است [۴، ۵] و بی‌شک شناسایی علل تحلیل نورونی، برای درمان یا کند کردن پیشرفت AD ضروری هستند [۶]. در این زمینه مرگ سلولی به دو گروه اصلی آپوپتوز و نکروز طبقه‌بندی شده است. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی‌شده خودکار است، درحالی‌که نکروز به مرگ کنترل‌نشده ناگهانی و بدون برنامه سلولی ناشی از آسیب یا نفوذ پاتوژن‌ها اشاره دارد [۷]. ولی سلول‌های مهره‌داران می‌توانند نوع دیگری از نکروز را بدون ایجاد خطر برای سلول<sup>۴</sup> و به‌طور برنامه‌ریزی‌شده (ولی مستقل از کاسپازها) اجرا کنند که نکروپتوز نامیده می‌شود [۸]. نکروپتوز در شرایط منجرشونده به AD نیز، با ارائه محرک‌های مختلف (مانند TNF- $\alpha$ ، استرس اکسیداتیو، فعال شدن mTOR/Akt و غیره) [۹] فعال می‌شود که می‌تواند بخشی از سازوکار تحلیل نورونی را توجیه کند [۹، ۱۰] البته شواهد فزاینده دیگری نیز ارتباط بسیار نزدیک نکروپتوز با رخداد و گسترش AD را تأیید کرده‌اند [۱۱]. اما سه پروتئین کلیدی دخیل در اجرای نکروپتوز وجود دارد که شامل RIPK1<sup>۵</sup>، RIPK3<sup>۶</sup> و MLKL<sup>۷</sup> هستند. RIPK1 به RIPK3 و آن هم به MLKL متصل می‌شود تا نکروزوم را تشکیل دهند. RIPK3 پس از تشکیل نکروزوم، MLKL را فسفریله کرده و آن را به عامل ایجاد مرگ (کشنده) در نکروپتوز تبدیل می‌کند. MLKL پس از فسفریله شدن، به فسفاتیدیل اینوزیتول فسفاتاز متصل می‌شود و غشاهای سلول (غشای پلاسمایی و غشای اندامک‌ها) را نفوذپذیر می‌کند و سرانجام از طریق پاره کردن غشای پلاسمایی و کافت سلول، به مرگ سلول منجر می‌شود [۱۲، ۱۳]. اما اگرچه فسفوریلاسیون و دایمریزاسیون MLKL برای القای نکروپتوز کافی و ضروری است [۱۴، ۱۵]، سازوکار دقیق تنظیم بیان RIPK1 در شرایط بیماری AD هنوز نامشخص است، البته این کیناز توسط چندین مسیر پیام‌رسانی مانند التهاب ناشی از TNF $\alpha$  (یک جنبه متداول در بیماری AD) فعال می‌شود [۱۶]. التهاب عصبی ناشی از TNF $\alpha$ ، حتی به‌عنوان علت اصلی نکروپتوز پیشنهاد شده و افزایش بیان ژن گیرنده یک مربوط به TNF $\alpha$  در وضعیت AD و فعال‌سازی نکروپتوز به‌واسطه افزایش این گیرنده در نورون‌ها تأیید شده است [۱۷]. بنابراین با توجه به نقش نکروپتوز در پاتوژنز AD [۲۰ - ۱۸] به‌نظر می‌رسد که برای بررسی روند نکروپتوز در مغز، باید عناصر کلیدی نکروپتوز و متغیرهای درگیر در التهاب و به‌ویژه گیرنده TNF نیز در نظر گرفته شوند.

از سویی امروزه تمرین ورزشی به‌عنوان یکی از راهکارهای درمانی و جلوگیری از پیشرفت AD شناخته شده است که سازوکارهای آن مربوط به تأثیر مفید تمرینات ورزشی بر سیستم ایمنی و التهاب، عملکرد اندوتلیالی و نارسایی عروق خون مغزی، مرگ سلولی، ارتباطات درون سلولی، متابولیسم، استرس اکسایشی و سمیت عصبی، آسیب و ترمیم DNA، پروتئین‌های داربست سلولی و غشای پلاسمایی و شکل‌پذیری سیناپسی [۲۱]، نروژنز، دستکاری‌های اپی‌ژنتیک، آنژیوژنز، اتوفاژی و سنتز و ترشح نروتروفین‌ها و سیتوکین‌ها [۲۲] هستند. ورزش همچنین می‌تواند از طریق چندین مسیر از نکروپتوز جلوگیری کند. برای مثال ممکن است با تغییر سطوح آگروزوم‌های<sup>۹</sup> پلازما [۲۳]، تقویت دفاع ضد اکسایشی [۲۴] و کاهش در پیام‌رسانی مسیر التهابی TNF $\alpha$  [۲۵] از نکروپتوز نورون‌ها و گسترش AD [۲۶] جلوگیری کند. با این حال، این اطلاعات از سایر بافت‌ها حاصل شده و با وجود شواهد تحقیقی بسیار زیاد در مورد تأثیر مفید انواع فعالیت ورزشی بر کنترل روند بیماری AD [۳۰-۲۷]، هنوز هم در مورد قابلیت دستکاری نکروپتوز مغزی شایع در بیماری AD از طریق تمرینات ورزشی اطلاعات مستقیمی فراهم نشده است که به‌نظر می‌رسد بسیار جالب بوده و از بداعت ویژه‌ای برخوردار باشد. همچنین شواهد مربوط

1. Alzheimer's disease (AD)

2. Amyloid beta (A $\beta$ )

3. Sudden, traumatic, and non-programmed cell death

4. Fail-safe" cell death pathway

5. Receptor-like protein kinase 1

6. Receptor-like protein kinase 3

7. Mixed lineage kinase domain like pseudokinase

8. Tumor Necrosis Factor Alpha

Receptor 1 (TNFR1)

<sup>۹</sup> که می‌تواند از سد خونی مغزی عبور کند و بر

ایجاد و گسترش AD تأثیر بگذارد.

به هیپوکامپ بیماران AD اغلب حاکی از تأثیر کاهنده تمرینات ورزشی بر وضعیت التهابی و به‌ویژه در مورد پیام‌رسانی مسیر TNF در سیستم عصبی اند [۳۱، ۳۲]، اما در مورد چگونگی دستکاری نکرپتوز مغز از طریق این بهبود وضعیت التهابی ناشی از تمرین ورزشی نیز اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.

استرس ناشی از ورزش اجباری به‌دلیل ترشح CRH از هسته PVN هیپوتالاموس [۳۳] می‌تواند به نارسایی‌های شناختی و غیرشناختی منجر شود [۳۴]. بنابراین در حیوانات مدل اختلالات عصبی از تمرین اختیاری استفاده می‌شود که رفتار دوییدن طبیعی موش را بدون نیاز به اعمال محرک منفی (از قبیل شوک یا لمس)، حضور دائمی محقق و یا برهم زدن ریتم زندگی طبیعی شبانه‌روزی شبیه‌سازی می‌کند. اجرای تمرینات اختیاری می‌تواند به‌صورت ساده و پیچیده باشد. تمرین چرخ دوار ساده شامل شبیه به دوییدن ساده با حداقل اجبار و آسیب است. اما در طراحی چرخ دوار پیچیده از پله‌هایی با فواصل نامنظم استفاده می‌شود که دوییدن را چالش‌انگیز و دشوار می‌کند و ظرفیت شناختی نیز همزمان درگیر می‌شود [۳۵]، زیرا برای اجتناب از سقوط یا آسیب، همواره طول و سرعت گام‌برداری، باید با فواصل پله‌ها تطبیق یابد [۳۶] و این انطباق مداوم طول گام و هماهنگی دوطرفه در حین دوییدن روی چرخ پیچیده، دخالت قابل توجه مدارهای فوق‌نخاعی را ضروری می‌کند [۳۷] و به‌دلیل شبیه‌سازی مناسب سبک زندگی فعال در انسان [۳۸، ۳۹]، اما درحالی‌که فعالیت اختیاری طولانی‌مدت با بهبود یادگیری، حافظه فضایی [۴۰] و کاهش پلاک‌های A $\beta$  [۴۱، ۴۲] و کاهش فسفوریلاسیون تائو پروتئین، آستروگلیوز و بهبود نروژنز [۴۳] در مدل‌های مختلف موش‌های AD مرتبط بوده است، ولی در برخی تحقیقات نیز دوییدن اختیاری تأثیر مفیدی بر حافظه فضایی، به‌عنوان یکی از رایج‌ترین شاخص‌های مربوط به بررسی ظرفیت شناختی و حافظه در موش‌های مدل AD [۴۴] و مقدار پلاک‌ها نداشته است [۴۵، ۴۶]. این نکته نشان می‌دهد که در مورد تأثیرات تمرین اختیاری و به‌ویژه تمرینات پیچیده بر ظرفیت شناختی و جنبه‌های معمول آسیب‌شناختی AD و به‌ویژه نکرپتوز و روند التهاب عصبی متداول در این بیماری، به‌خصوص در ناحیه هیپوکامپ به بررسی بیشتری نیاز است.

بدین ترتیب باید اشاره شود که هنوز هم برای AD درمان قطعی وجود ندارد و به‌علاوه، سازوکارهای دقیق مرگ سلولی و همچنین چگونگی تأثیر مداخلات مختلف از جمله تمرین ورزشی بر تحلیل نورونی در AD هم هنوز با قطعیت تعیین نشده‌اند. بنابراین هدف قرار دادن سازوکارهای مؤثر بر تحلیل عصبی اهمیت بسیار ویژه‌ای خواهد داشت. در این زمینه یک تحقیق اخیراً شواهد مستقیمی ارائه کرده است که نکرپتوز در مغز انسان‌های مبتلا به AD و همچنین موش‌های مدل AD فعال شده و به تحلیل سلول‌های عصبی منجر می‌شود [۴۷]. بنابراین بررسی اثرگذاری تمرین اختیاری طولانی‌مدت پیچیده بر فرایند نکرپتوز در بیماری AD، می‌تواند در معرفی سازوکارهای زیست‌شناختی مربوطه و همچنین ارائه دیدگاه‌های جدید برای شناسایی بیشتر پاتولوژی این بیماری بسیار مهم باشد. به‌علاوه، نتایج چنین تحقیقاتی بی‌شک از منظر درمانی نیز می‌تواند بسیار بااهمیت و جالب بوده و همچنین زمینه‌ساز تحقیقات بیشتر آینده با رویکرد شناسایی بهترین جزئیات مربوط به پروتکل‌های ورزشی احتمالاً مؤثر در این زمینه باشند. بدین ترتیب هدف تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین اختیاری بر بیان ژن‌های مرتبط با نکرپتوز (RIPK1 و P-MLKL) و التهاب (TNFR1) و هیستولوژی هیپوکامپ و عملکرد حافظه فضایی موش‌های صحرائی مدل آلزایمر بود که تصور می‌شود بسیار جالب و کاربردی بوده و ضمن دارا بودن بداعت پژوهشی، زمینه‌ساز انجام تحقیقات بسیار بیشتر در این زمینه در آینده باشد.

## روش‌شناسی پژوهش

در این تحقیق تجربی، پس از تأیید طرح تحقیق در کمیته اخلاق با کد IR.SSRI.REC.1399.362، ۲۴ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار (۴-۶ هفته‌ای) از مرکز انستیتو پاستور تهیه و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته جهت تطابق با محیط جدید، در قفسه‌های پلی‌کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. طی دوره پژوهش، حیوانات به غذای ساخت شرکت بهپروور (پلت) دسترسی آزاد داشتند و همچنین آب مورد نیاز

چونندگان نیز به صورت آزاد و از طریق بطری‌های ویژه در دسترس آنها قرار داده شد. حیوانات به طور تصادفی به سه گروه شامل کنترل- سالم (H-C)، کنترل-آزایمر (C-ALZ) و تمرین پیچیده-آزایمر (CWheel-ALZ) تقسیم شدند.

**القای آزایمر:** ابتدا حیوانات به وسیله ترکیبی از کتامین و زایلازین (۶۰ و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب) بی‌هوش شدند. ابتدا موهای سر حیوان کاملاً تراشیده شد. سپس درون دستگاه استریوتاکسی جهت انجام جراحی مغز قرار گرفتند. وسایل و مکان جراحی ضد عفونی شد. پس از تزریق زیرجلدی لیدوکائین ۳ درصد (به مقدار ۰/۱ سی‌سی) پوست سر و بافت‌های پیوندی کنار زده شد و مجسمه نمایان شد و نواحی Bregma و Lambda روی مجسمه مشخص شدند. سپس مقدار ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم استریتوزوسین<sup>۱</sup> در حجم ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در ناحیه بطن مغز تزریق شد [۴۸]. برای اطمینان از ایجاد مدل آزایمر، دو هفته پس از تزریق، از حیوانات آزمون شاتل باکس به عمل آمد. در تست شاتل باکس، حیوان در شرایط کاملاً آرام وارد دستگاه شاتل باکس شده، سپس ۱۵ دقیقه به حیوان فرصت داده می‌شود تا به دور از استرس با شرایط انطباق پیدا کند. سپس حیوان در محفظه روشن جعبه شاتل باکس قرار گرفته و پس از بسته شدن در ورودی جعبه شاتل، کلید چراغ موجود در فضای روشن جعبه زده می‌شود. سپس در گیوتینی موجود در دیواره بالا رفته و پس از روشن شدن چراغ به حیوان ۱۰ دقیقه فرصت داده می‌شود تا محفظه روشن را ترک کند و به محفظه تاریک برود. در صورتی که حیوان پس از ۱۰ ثانیه این کار را انجام ندهد، شوک الکتریکی (محرك غیرشرطی) اعمال می‌شود و حیوان محفظه روشن را ترک خواهد کرد. مدت زمان شوک ۱۵۰۰ میکروثانیه و شدت آن ۱۰۰ میلی‌آمپر است. با ورود حیوان به محفظه تاریک، در گیوتینی بسته شده و فاز استراحت که بین ۵ تا ۴۰ ثانیه است، شروع می‌شود. دوباره حیوان به فضای روشن رانده شده و این فرایند دوباره تکرار می‌شود. فاصله زمانی از لحظه شروع محرك شرطی (نور) تا فرار حیوان به اتاقک تاریک به عنوان زمان پاسخ (بر حسب ثانیه) در نظر گرفته شد. مقایسه نتایج عملکرد موش‌های سالم (n=۸) و تحت تزریق STZ (n=۱۶) در تست شاتل باکس با آزمون تی مستقل نشان داد که زمان سپری شده گروه سالم در بخش تاریک فاقد شوک الکتریکی (۹۴/۹۸ ± ۱۵/۱۰) به طور معناداری بیشتر از گروه‌های تحت تزریق STZ (۴۶/۸۱ ± ۱۴/۰۲) بود (P=۰/۰۰۱، t=-۱۲/۷۹۷) و از این طریق صحت کلی القای آزایمر تأیید شد.

**تمرین اختیاری پیچیده:** از آنجا که چرخ دوار در داخل قفس تعبیه شده و جزیی از قفس محسوب می‌شود، حیوانات به صورت اختیاری و در طول ۲۴ ساعت، داوطلبانه به فعالیت پرداختند. طول دوره تمرین ۱۲ هفته در نظر گرفته شد. سطح محیطی هر دور چرخ، برابر با یک متر است که در محیط خود حاوی ۳۸ جفت سوراخ با فاصله‌های منظم برای تعبیه میله‌ها به عنوان پله‌هست که برای پیچیده کردن نوع فعالیت، تنها ۲۲ میله (پلکان) با ترتیب قرارگیری نامنظم با استفاده از سه نوع الگوی متفاوت برای جاهای خالی (شامل یک جای خالی پس از یک میله، یک جای خالی پس از دو میله متوالی و یک جای خالی پس از سه میله متوالی)، با ترتیب تصادفی چیدمان شد [۴۹]. این ترتیب در هر دو هفته یک بار تغییر کرد تا حیوانات با الگوی منظم مواجه نباشند.

**آزمون حافظه فضایی:** در انتهای دوره تمرین برای بررسی حافظه فضایی از تست آبی موریس استفاده شد. ماز آبی به عمق ۲۵ سانتی‌متر با دمای ۲۲ ± ۲ درجه پر شد و یک سکوی سیاه‌رنگ به قطر ۱۰ سانتی‌متر غیرقابل دید، در عمق دو سانتی‌متری زیر سطح آب قرار گرفت. همه موش‌ها برای یادگیری فضایی تحت آموزش قرار گرفتند. آموزش آنها شامل دو تمرین ۶۰ ثانیه‌ای برای پنج روز متوالی بود. پس از هر بار یافتن سکو برای ۲۰ ثانیه اجازه استراحت داده شد. در تست اصلی مدت زمان جست‌وجوی سکوی پنهان توسط موش به عنوان عملکرد در تکلیف حافظه فضایی در نظر گرفته شد. ردیابی مسیر حرکت رت‌ها توسط سیستم ردیابی خودکار انجام گرفت [۵۰].

**آزمون عملکرد ورزشی و امانده‌ساز:** پس از پایان مداخله، بدین منظور، حیوانات روی تردمیل با شیب صفر و سرعت ۵ متر در دقیقه قرار داده شدند و در ادامه با سپری شدن هر سه دقیقه، سرعت تردمیل به مقدار ۵ متر بر دقیقه و شیب به مقدار ۵ درجه افزوده شد [۵۱]. مدت زمان فعالیت حیوان روی تردمیل به عنوان زمان رسیدن به واماندگی در نظر گرفته شد.

<sup>۱</sup>. Streptozotocin (STZ)

**جداسازی مغز:** در پایان رت‌ها توسط کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوش و کشتار شدند. سپس مغز خارج شده و پس از جداسازی مغز هیپوکامپ یک سمت جدا شده و در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**بررسی ریخت‌شناسی هیپوکامپ:** هیپوکامپ سمت مقابل جهت فیکس شدن، به مدت ۲۴ ساعت در فرمالدئید ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از انجام مراحل پردازش بافتی، مقاطع بافتی با ضخامت هفت میکرون تهیه و توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط میکروسکوپ نوری (Olympus CX21FS1, Japan) مجهز به دوربین عکس‌برداری (Cannon, Japan) تصویربرداری شد. مشاهده و شمارش تصاویر توسط عدسی با بزرگنمایی ۴۰ بر روی مانیتور انجام گرفت. تحلیل چگالی نورونی و ضخامت لایه سلولی در چارچوب‌های مرجع انجام شد. از هر حیوان ۶ فریم (هر بار یک فریم  $250 \times 40$  میکرومتری) از امتداد نوار CA1 به‌طور تصادفی انتخاب شد که نورون‌های دارای قطعات سلولی چندقطبی، هسته کاملاً آشکار، غشای سلولی سالم و حاوی تعداد زیادی از اجسام نیسل سیتوپلاسمی موجود در فریم شمارش شد. پس از محاسبه میانگین آنها، چگالی نورونی با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه شد. شایان ذکر است که اجسام سلولی مجاور لبه سمت چپ و تحتانی فریم طبق استاندارد، شمارش نشدند. ضخامت لایه سلولی پیرامیدی بر مبنای مقایسه با یک ستون مقیاس توسط نرم‌افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) انجام گرفت. ضخامت نهایی از میانگین ۲۴ بار اندازه‌گیری تصادفی از بخش‌های مختلف ناحیه CA1 محاسبه شد [۵۲].

**روش سنجش بیان ژن:** ابتدا برای استخراج RNA از بافت‌ها، ۲۰۰ لاندا کیازول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای -۸۰ انکوبه شد و به‌منظور لیز شدن نمونه‌ها میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت یک دقیقه به آنها اضافه شد. محلول حاصل، با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود، به آرامی برداشته شده و در یک میکروتیوب DEPC قرار داده شد. یک سی‌سی ایزوپروپانول بر روی RNA ریخته شد و به مدت یک دقیقه به هم زده شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن یک سی‌سی الکل ۷۰ درصد اضافه شد. پس از Vortex کردن، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شده و پس از تخلیه مایع رویی، پلاک درون میکروتیوب خشک شد. ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه روی پلاک ریخته شد و پنج دقیقه روی صفحه ۶۰ درجه قرار گرفت. پس از استخراج RNA، مراحل ساخت cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. درجه خلوص RNA به کمک دستگاه NonoDrop و با روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد که در بازه ۵۰۰-۷۶۵ ng/ $\mu$ L بوده است. پرایمرها از بانک ژنی NCBI (توسط شرکت ماکروژن) طراحی شد. از ژن (GAPDH) به‌عنوان کنترل استفاده شد. بیان ژن‌ها به‌وسیله روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و به‌صورت duplicate تعیین شد [۵۳].

جدول ۱. پروتکل دستگاه گرمایی ریل تایم آر تی بی سی آر

تعداد چرخه‌ها	دما	زمان
دنا توره اولیه	۹۵	پنج دقیقه
32 سیکل	۹۵	۳۰ ثانیه
	۶۰	۳۰ ثانیه
	۷۲	۳۰ ثانیه
اکستنشن انتهایی	۷۲	پنج دقیقه

**روش آماری:** پس از بررسی شکل توزیع داده‌ها با آزمون شاپیروویلک، برای مقایسه بین گروهی داده‌های پس از پایان مداخله، از تحلیل واریانس تک‌راهه (با آزمون تعقیبی توکی و یا جیمز هاول (بسته به نتایج آزمون لون)) استفاده شد.



## یافته‌های پژوهش

وزن بدن اولیه موش‌ها در سه گروه (جدول ۲) تفاوت معناداری نداشت ( $F=0/41$  و  $P=0/66$ )، اما در طول تحقیق وزن هر سه گروه به‌طور معناداری افزایش یافت و بیشترین وزن در گروه کنترل-آزایمر مشاهده شد ( $P<0/05$ ).

جدول ۲. شاخص‌های توصیفی وزن بدن و مسافت طی شده در طول تحقیق

متغیر	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	میانگین مسافت طی شده در هر روز (متر)
C-H	$207/20 \pm 19/70$	$268/30 \pm 35/47$	-
C-ALZ	$206/70 \pm 21/22$	$327/00 \pm 26/77$	-
CWheel-ALZ	$213/5 \pm 14/55$	$302/90 \pm 8/60$	$335/60 \pm 106/14$

کنترل-سالم (C-H)، کنترل-آزایمر (C-ALZ)، تمرین پیچیده-آزایمر (CWheel-ALZ)

نتایج تحلیل واریانس تک‌راهه در مورد مقایسه بین گروهی متغیرها (جدول ۳) حاکی از وجود تفاوت معنادار بین گروهی در مورد تمام متغیر شامل عملکرد حافظه فضایی ( $F=14/59$  و  $P=0/001$ )، ضخامت لایه نورونی هرمی ناحیه CA1 ( $F=72/31$  و  $P=0/001$ )، چگالی نورونی ناحیه CA1 ( $F=24/45$  و  $P=0/001$ )، زمان رسیدن به واماندگی به‌عنوان ملاک ظرفیت عملکرد جسمانی ( $F=5/69$  و  $P=0/011$ )، بیان ژن RIPK1 هیپوکامپ ( $F=18/81$  و  $P=0/001$ )، بیان ژن MLKL هیپوکامپ ( $F=54/32$  و  $P=0/001$ ) و بیان ژن TNFR1 هیپوکامپ ( $F=12/24$  و  $p=0/001$ ) بود.

نتایج مقایسه تعقیبی با آزمون توکی نیز نشان داد که تأثیر مضر لقای آزایمر بر تضعیف عملکرد حافظه فضایی (افزایش زمان عملکرد)، کاهش ضخامت لایه نورونی هرمی و چگالی نورونی ناحیه CA1 (دلالت بر آتروفی ناحیه هیپوکامپ) و افزایش بیان ژن‌های RIPK1، MLKL و TNFR1 هیپوکامپ حتی با وجود بهبود ناشی از تمرین اختیاری پیچیده، کاملاً برطرف نمی‌شود ( $P<0/05$  در همه موارد).

جدول ۳. نتایج مقایسه تعقیبی گروه‌ها با آزمون توکی

متغیر	کنترل-سالم	کنترل-ALZ	تمرین اختیاری پیچیده-ALZ
زمان جست‌وجوی سکوی پنهان در ماز موریس (ثانیه)	$97/25 \pm 7/97$	$125/75 \pm 11/41$	$111/87 \pm 11/83$ * $p=0/029$ † $p=0/040$
ضخامت لایه نورونی هرمی ناحیه CA1 (میلی‌متر)	$0/056 \pm 0/0066$	$0/029 \pm 0/0028$	$0/034 \pm 0/0038$ * $p=0/001$ † $p=0/109$ NS
چگالی نورونی ناحیه CA1 (تعداد در هر میکرومتر مربع)	$100/88 \pm 11/74$	$67/7 \pm 6/18$	$84/95 \pm 9/69$ * $p=0/008$ † $p=0/004$
زمان رسیدن به واماندگی (ثانیه)	$49/21 \pm 4/96$	$42/30 \pm 3/69$	$45/28 \pm 3/51$ * $p=0/15$ NS † $p=0/33$ NS
نسبت بیان ژن Ripk1 به GAPDH	$1/00 \pm 0/096$	$1/79 \pm 0/26$	$1/44 \pm 0/35$ * $p=0/006$ † $p=0/038$
نسبت بیان ژن MLKL به GAPDH	$1/00 \pm 0/12$	$2/19 \pm 0/33$	$1/66 \pm 0/15$ * $p=0/001$ † $p=0/001$
نسبت بیان ژن TNFR1 به GAPDH	$1/00 \pm 0/14$	$2/81 \pm 0/33$	$1/64 \pm 0/17$ * $p=0/001$ † $p=0/001$

\* و †: به ترتیب نمایانگر مقایسه نسبت به گروه‌های کنترل سالم و کنترل-ALZ ( $P<0/05$ )، NS: غیرمعنادار ( $P>0/05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

در بخش مهمی از نتایج مشاهده شد که در گروه کنترل آلزایمر بیان ژن‌های هر سه عامل درگیر در نکرپتوز مغزی شامل RIPK1، MLKL و TNFR1 هیپوکامپ تغییر یافت که احتمال فعال‌سازی نکرپتوز را تأیید می‌کند. شایان ذکر است که مشارکت نکرپتوز در التهاب عصبی و مرگ نورونی ناشی از آن [۵۴] هم در مغز بیماران AD و هم در موش‌های مدل AD [۲۰] تأیید شده است و ضمن اینکه می‌تواند بخشی از سازوکار تحلیل نورونی را توجیه کند [۹، ۱۰]، تأیید می‌کند که از نظر بالینی دستکاری نکرپتوز می‌تواند یک ابزار درمانی بااهمیتی برای بیماران AD تلقی شود [۲۰]. سازوکار بروز نکرپتوز به مسیر پیام‌رسانی<sup>۱</sup> TNF ربط داده شده است که با اتصال به گیرنده خود، سبب فعال کردن RIPK1 می‌شود که آن هم سبب تشکیل یک پروتئین دیگر به نام MLKL<sup>۳</sup> می‌شود. در نهایت، RIPK3 سبب فسفوریله شدن MLKL می‌شود و آن هم از طریق ماشین دستگاه گلژی-میکروتوبولین-اکتین به غشای پلاسمایی منتقل می‌شود و با تشکیل یک دسته منافذ غشایی توسط پروتئین‌های اتصال محکم<sup>۴</sup> یا تنظیم جریان کانال یونی، پاره شدن غشا را القا می‌کند و با کافت سلول، به مرگ نکرپتوزی آن منجر می‌شود [۵۵]. اما ممکن است یک چرخه معیوب به سرعت گرفتن نکرپتوز و تشدید AD منجر شود. برای مثال در مغز حیوانات تحت تزریق STZ، مقاومت به انسولین و کاهش متابولیسم گلوکز مغز ایجاد می‌شود که مشابه با شرایط آلزایمر پراکنده<sup>۵</sup> انسانی (آغاز بیماری به‌طور معمول پس از ۶۵ سالگی) و حتی افراد مبتلا به دیابت، با التهاب عصبی، استرس اکسایشی، اختلال پیشرونده کولینرژیک، تجمع Aβ (در محیط برون نورونی که در نهایت به مرگ نورون منجر می‌شود) و تائو پروتئین‌های پیرفسفوریله شده (در داخل سلول که به از هم پاشیدن اسکلت سلولی و اختلال در نقل و انتقال آکسونی منجر می‌شود) و تحلیل عصبی همراه می‌شود. مکانیسم این تأثیرات هیپوگلیسمی به القای تغییر از آپوپتوز به نکرپتوز ربط داده شده است [۴۷]. تحقیقات اخیر درگیری نکرپتوز در فرایندهای تحلیل عصبی مرتبط با AD را پررنگ می‌دانند. اما اگرچه تغییر در بیان ژن همواره دلیل بر بروز نهایی پاسخ مورد انتظار از پروتئین‌های نهایی مورد هدف آن ژن‌ها نیست [۵۶]، اما به هر حال، در این تحقیق مشاهده تغییرات هماهنگ و دارای الگوی مشابه و همخوان در بیان این ژن‌ها، احتمال درگیری نکرپتوز در مرگ نورونی هیپوکامپ موش‌های مدل AD ناشی از تزریق درون بطنی STZ را تقویت می‌کند. البته با توجه به اینکه نکرپتوز در وضعیت AD، به‌طور معمول در اثر التهاب فعال می‌شود [۹]، احتمال دارد که در تحقیق حاضر نیز فعال‌سازی نکرپتوز از TNFR1 به‌عنوان یک گیرنده مهم التهابی در هیپوکامپ سرچشمه گرفته است. بنابراین احتمالاً باید مداخلات منجرشونده به تسکین التهاب مزمن در اولویت پیشگیری از بروز بیماری‌های تحلیل عصبی و AD قرار داده شود [۵۷]. اما به‌طور معمول در التهاب عصبی، فعال‌سازی میکروگلیا (سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی ساکن در CNS) و ترشح عوامل پیش‌التهابی از قبیل TNFα، IL-6، IL-1β، پروستاگلاندین‌ها، گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن روی می‌دهد [۵۸]. با این حال، در این تحقیق حاضر به دلیل محدودیت مالی، فقط بیان ژن TNFR1 اندازه‌گیری شد که تصویر کاملی از التهاب مغز فراهم نمی‌کند و در تحقیقات آینده، حتماً باید سایر متغیرهای پیش‌التهابی نیز اندازه‌گیری شوند. ولی شاید مهم‌ترین نکته مستخرج از یافته‌های ما در مورد تغییرات بیان ژن‌های RIPK1، MLKL و TNFR1 هیپوکامپ در اثر تزریق درون بطنی STZ و یا به دنبال مشارکت در فعالیت اختیاری پیچیده آن است که احتمالاً تأثیرات مضر القای AD بر فعال‌سازی روند نکرپتوز، حتی با وجود بهبود قابل توجه ناشی از تمرین اختیاری پیچیده، کاملاً برطرف نمی‌شود و نسبتاً ماندگار است. بنابراین حتی با مشارکت در تمرین پیچیده، ادامه یافتن نکرپتوز و تحلیل عصبی به‌ویژه در هیپوکامپ محتمل است که می‌تواند سبب گسترش پیشرونده وخامت AD شود که البته در مورد بیماران انسانی نیز [۵۹، ۶۰] چنین پدیده‌ای متداول است. البته فعلاً در مورد زمان بروز احتمالی آسیب‌های ناشی از تزریق STZ به مغز قطعیت کافی وجود ندارد [۶۱] و تحقیقات مختلف زمان‌های متفاوتی [۶۲ - ۶۷] برای بروز آسیب مغزی ناشی از تزریق STZ در مغز را گزارش کرده‌اند. مواجهه با برخی سموم مانند آفت‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها در زندگی روزمره انسان می‌تواند سبب افزایش استعداد بروز AD شود [۶۸، ۶۹] که معمولاً منشأ آنها دامنه‌ای از مکانیسم‌های القای استرس اکسایشی نورونی تا فرایندهای خیلی ویژه‌تر AD شامل Aβ و تائوپروتئین‌های پیرفسفوریله شده و جهش‌های پیکری، دستکاری‌های

<sup>1</sup> Tumor necrosis factor (TNF)

<sup>2</sup> TNFR1 associated death domain protein

<sup>3</sup> RIPK1RIPK3mixed lineage kinase domainlike protein (MLKL)

<sup>4</sup> Tight junction

<sup>5</sup> Sporadic AD (sAD)

آبی ژنتیک، نقص در نورون‌ها و مشکلات مربوط به میکروبیوتا [۶۸] و مکانیسم‌های التهابی و نکرولی احتمالاً منجرشونده به نکروپتوز مغز [۷۰] را شامل می‌شود. اما همه این موارد روند طولانی مدتی دارند و تظاهرات بالینی AD سال‌ها قبل از ظهور علائم بالینی آن روی می‌دهد [۷۱، ۷۲]. در صورتی که تزریق مستقیم STZ، تظاهرات AD را با سرعت خیلی بیشتری نسبت به روند واقعی متداول پیشرفت بیماری AD در جمعیت انسانی ایجاد می‌کند. در تحقیقات گذشته تغییر وزن بدن موش‌ها پس از تزریق درون بطنی STZ در پیوستاری از کاهش تا عدم تغییر و کسب وزن به دنبال کاهش اولیه در نوسان بوده است و هنوز معلوم نیست آیا این تفاوت‌ها در نوع تغییر وزن بدن احتمالاً با تغییرپذیری در آثار سمی STZ در موش هم همراه است یا نه؟ [۶۹]. اما در کل معمولاً توافق بر این است که STZ در حیوانات قادر است تا به خوبی متداول‌ترین نوع AD را ایجاد کند [۷۳] و بروز تحلیل عصبی و آتروفی هیپوکامپ در اثر تزریق درون بطنی STZ مسئله‌ای تقریباً بدیهی است [۷۴]. همچنین تضعیف حافظه و فعال‌سازی نکروپتوز از طریق التهاب ناشی از TNF- $\alpha$  در اثر تزریق درون بطنی STZ هم قبلاً تأیید شده است [۷۵]. ولی ما احتمال دادیم که به دلیل طولانی مدت نبودن تأثیرات STZ در فراهم کردن آثار مرتبط با AD [۷۶] و همچنین ایجاد آثار خیلی سریع، این روش تنها برای مطالعه در دوره زمانی کوتاه مدت مفید است [۷۶، ۷۷]. به بیان دیگر چون معمولاً نکروز و نکروپتوز در مقایسه با آپوپتوز روند سریع‌تری دارد [۷۸]، تصور می‌شود که شاید در طولانی مدت و با سپری شدن عمر، نتوان بخش زیادی از منشأ اصلی AD پراکنده انسانی را به نکروپتوز ربط داد. بنابراین به نظر می‌رسد بهتر است برای شفاف‌سازی بهتر رخدادهای دستکاری فرایندهای مرتبط با نکروپتوز در AD، از سایر مدل‌های القای طولانی مدت AD از قبیل اسکوپولامین که با احتمال بیشتری بتا آمیلوئید را تجمع می‌دهد [۷۹] و یا از مدل‌های دچار سکنه و ایسکمی در بخش‌های مختلف بدن که در طی زمان به AD می‌انجامند [۸۰، ۸۱] و یا از مدل موش‌های سالمند (در معرض حضور توأم محیط دارای کاهش نورون‌ها، آسیب اکسایشی، التهاب و نارسایی متابولیکی و دارای یک الگوی طولانی مدت سیر وخامت مشابه شرایط بیماری انسانی) [۸۲، ۸۳] استفاده شود. در هر حال، ماندگاری بخشی از تأثیرات STZ بر شاخص‌های درگیر در نکروپتوز و احیا نشدن کامل کاهش عملکرد بدنی و حافظه‌ای پس از تمرین اختیاری پیچیده، بیان می‌کند که تنها نمی‌توان با اتکا به تمرین توأم جسمی و چالش ذهنی، پیشرفت AD را کاملاً متوقف کرد و همچنان نیاز به مداخلات درمانی دیگر باقی است. البته در برخی تحقیقات، فعالیت اختیاری طولانی مدت با بهبود یادگیری، حافظه و کاهش پلاک‌های A $\beta$  [۴۱، ۴۲] و کاهش فسفوریلاسیون تائو پروتئین، آستروگلیوز و بهبود نورون [۴۳] در مدل‌های مختلف موش‌های AD مرتبط بوده است، ولی در برخی تحقیقات نیز دویدن اختیاری تأثیر مفیدی بر حافظه فضایی و مقدار پلاک‌ها نداشته است [۴۵، ۴۶]. یکی از مهم‌ترین دلایل تناقض در شواهد موجود در مورد نقش تمرین اختیاری بر عملکرد شناختی و جنبه‌های نورپاتولوژیک AD می‌تواند به مقطع زمانی بررسی تأثیر تمرین اختیاری نسبت به ایجاد AD مربوط باشد. برای مثال اگر تمرین اختیاری قبل از شروع علائم AD آغاز شود، ممکن است آثار محافظتی و مفید آن بر شناخت و آسیب‌شناسی AD مشاهده شود، ولی اگر دویدن اختیاری بعد از تجمع انباشت پلاک شروع شود، ممکن است تمرین قادر به مقابله با کاهش ظرفیت شناختی و آسیب‌های مختلف AD نباشد [۸۴]. در تحقیق دیگری هم [۸۵] بیان شده است که ورزش اختیاری برای جلوگیری از افت ظرفیت شناختی بیماران AD، باید در دوران اولیه بزرگسالی (و نه در مراحل آخر آن) آغاز شود. اگرچه موش‌های تحقیق حاضر بالغ (و نه سالمند) بودند، اما گزارش شده است که در مدل موش‌های تحت تزریق STZ، با وجود نمایش خیلی از جنبه‌های AD پراکنده در مغز، پلاک تشکیل نمی‌شود [۸۶، ۸۷]. بنابراین، شاید این مدل از موش‌ها، برای مطالعه تأثیر تمرین بدنی و یا چالش ذهنی بر ظرفیت شناختی نیز خیلی مناسب نباشند.

اگرچه در تحقیق حاضر، اثر خالص تمرین بدنی از پیچیدگی آن (جزء شناختی تمرین) تفکیک نشد، اما درحالی‌که انواع خاصی از تمرینات شناختی می‌توانند فعال‌سازی ارتباطات عملکردی بین نواحی پیشانی، گیجگاهی و آهیانه‌ای و هیپوکامپ را افزایش دهند، اما انواع دیگری از تمرینات، فعال‌سازی و ارتباطات عملکردی را کاهش می‌دهند. بنابراین این مسئله از منطق گسترش و ویژه‌سازی تکنیک‌های تمرینات شناختی حمایت می‌کند [۸۸]. همچنین در مورد سازوکار و حداقل دوز تمرینات شناختی (شامل حجم تمرین و شدت چالش ذهنی ایجادشده)، برای بهبود احتمالی متغیرهای ریخت‌شناختی و شناختی AD، اطلاعات مستقیمی موجود نیست. به بیان دیگر، ما اطمینان کافی

1. mnemonic strategy training (MST)

2. spaced retrieval training (SRT)

نداریم که آیا پیچیده کردن محیط با حذف برخی میله‌ها از محیط چرخ دوار، به اندازه کافی قادر به بهبود ظرفیت‌شناختی، ریخت‌شناسی مغزی و حتی دستکاری متغیرهای مربوط به نکرپیتوز و التهاب در مغز موش‌های مدل AD است یا نه و چگونه و اینکه تأثیرات آن چقدر با MST یا SRT شباهت دارد؟ برخی تحقیقات نیز از تأثیر مفید وابسته به دوز کلی ترکیب تمرینات بدنی و شناختی به صورت توأم در بیماران دارای اختلالات عصبی شناختی استفاده کرده‌اند که در بیماران دارای سن بالاتر و دارای اختلالات عصبی شناختی شدیدتر، فواید کم‌رنگ‌تر بوده است. بنابراین بیان شده است که در آینده نیاز به بررسی تأثیر تمرینات توأم بدنی و شناختی با مدت طولانی‌تر باقی است [۸۹].

در بیماران انسانی بالای ۵۰ سال دارای حداقل یک مشکل شناختی، برای بروز تأثیرات مثبت ورزش بر ظرفیت شناختی یک حد آستانه حداقل و معین وجود دارد که برابر با ۷۲۴ مت-دقیقه در هفته (پایین‌تر از دوز مورد توصیه سازمان بهداشت جهانی) است و دوزهای بالای ۱۲۰۰ مت-دقیقه در هفته تأثیرات مثبت کمتری دارند. البته دوزهای بالاتر هم ضرورتاً بهتر نیستند [۹۰] و این اثر وابسته به دوز، به نوع ورزش نیز وابسته است، به طوری که از ورزش مقاومتی تأثیرات بیشتری نسبت به سایر انواع ورزش مورد انتظار است [۹۱]. همچنین شواهد از فواید انواع تمرینات ورزشی در دامنه‌ای مابین پنج هفته دویدن روی تردمیل تا نه ماه دویدن روی چرخ دوار حمایت کرده‌اند [۳۴]. ولی در این تحقیق، چرخ‌های دوار مورد استفاده، امکان تعیین شدت و مدت تمرین را میسر نکرد و امکان داشت تعدادی از موش‌ها مثلاً در عرض شبانه‌روز فقط یک ساعت بر روی چرخ دوار فعالیت کنند (برای مثال ۱۰۰ دور در روز) و در عوض تعدادی موش دیگر در قالب چندین وهله همان تعداد دور در روز را (مثلاً ۱۰۰ دور در روز) برای مثال در عرض پنج وهله ۲۰ دقیقه‌ای طی کنند. بنابراین شدت و مدت می‌تواند بسیار متفاوت بوده باشد و با در نظر گرفتن احتمال بالای افسردگی و انهدونیا (بی‌لذتی) در موش‌های مدل AD [۹۲، ۹۳] که به کاهش جابه‌جایی و جنب‌وجوش، فعالیت اکتشافی، کاهش میل به غذا و بی‌تفاوتی به محیط [۹۴] منجر می‌شود، الگوی شرکت در فعالیت اختیاری در بین موش‌ها احتمالاً یکسان نخواهد بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات مشابه آینده، تمرینات مقاومتی به صورت پیچیده طراحی شوند و با ضبط دائمی ویدئویی، شدت و مدت تمرین ۲۴ ساعته برای هر موش نیز تعیین شود و در ضمن قابلیت‌های شناختی در مراحل مختلف زمانی و در بین گروه‌های دارای سطوح متفاوت فعالیت بدنی اختیاری مقایسه شود.

در دیگر یافته‌های تحقیق، زمان عملکرد مکان‌یابی در گروه کنترل آلزایمر بیشتر از گروه کنترل سالم بود (تضعیف عملکرد حافظه فضایی) که بر افت ظرفیت شناختی و صحت کلی پروتکل القای AD دلالت دارد. اما با اینکه در گروه تمرین اختیاری پیچیده آلزایمری، زمان عملکرد حافظه‌ای تا حد چشمگیری کمتر از گروه کنترل آلزایمر شد، هنوز از گروه کنترل سالم، بالاتر بود. به بیان دیگر، تأثیر مضر القای آلزایمر بر تضعیف عملکرد حافظه فضایی (افزایش زمان عملکرد)، حتی با وجود بهبود ناشی از تمرین اختیاری پیچیده، کاملاً برطرف نشد. این یافته همراستا با تحقیقات گذشته [۹۵] بر مزیت انجام هم‌زمان تمرین شناختی و بدنی برای بهبود قابلیت‌های شناختی در مدل AD دلالت می‌کند. اشاره شده است که هر دو نوع تمرین بدنی و شناختی قادر به کاهش استرس اکسایشی هیپوکامپ، احیای تغییر فعالیت استیل کولین استراز ناشی از سمیت  $A\beta$  و بهبود یکپارچگی بافت هیپوکامپ هستند [۹۶] که می‌تواند در توجیه بهتر بودن عملکرد حافظه فضایی در گروه آلزایمری تحت تمرین اختیاری پیچیده کمک‌کننده باشد. همچنین افزایش جمعیت میکروگلیا، محافظت در برابر تحلیل، افزایش رشد دندرتیک، بهبود شکل‌پذیری سیناپسی [۹۷] و افزایش BDNF در نواحی مختلف مغز و به‌ویژه هیپوکامپ [۳۸] به‌عنوان سازوکارهای احتمالی ویژه برای بهبود حافظه ناشی از تمرینات اختیاری پیشنهاد شده‌اند. اما تمرین پیچیده به‌دلیل تحریک قشر مغز [۹۸]، درگیر کردن مدارهای کنترل حرکتی در عقده‌های قاعده‌ای، مخچه، قشر حرکتی و مسیرهای عبوری از جسم پینه‌ای به صورت مستقل از هیپوکامپ و افزایش میلینه شدن اکسون‌های جسم پینه‌ای و قشری [۳۶] و تحریک ظهور نورون‌های هرمی جدید و افزایش تراکم ستون دندرتیک نورون‌های موجود در هیپوکامپ به‌دلیل افزایش ترشح و بیان گیرنده آریتروپویتین در اثر ایجاد کمبود نسبی اکسیژن [۹۹]، به بهبود فعالیت شناختی منجر می‌شود. اما ورزش همچنین شاخص‌های التهابی از قبیل IL-6 با قابلیت سرکوب بیان BDNF را افزایش

۱. Anhedonia

۲. سلول‌های ایمنی ساکن در مغز که واسطه التهاب و کاهش نورونز و عامل اصلی تسریع کاهش شناختی در موش‌های مسن هستند.



می‌دهد و همچنین سطوح BDNF هم می‌تواند در تعدیل محور ایمنی-عصبی مشارکت کند [۱۰۰]. بنابراین شاید اندازه‌گیری BDNF در تحقیقات آینده هم برای ترسیم بهتر رویدادهای ناشی از دوییدن اختیاری ساده و پیچیده در مدل‌های AD کمک‌کننده باشد.

افزون بر این یک ناهنجاری بارز مغز بیماران AD، کاهش گلوکز به دلیل اختلال در پیام‌رسانی انسولین مغزی [۱۰۱] و همچنین کاهش ناشی از افسردگی در اشتها و احساس بو و مزه و سرکوب دریافت غذا [۱۰۲] است که این کاهش گلوکز مغزی با شدت افت عملکرد شناختی همبستگی دارد [۱۰۳]. بنابراین شاید افزایش مصرف غذا (بر مبنای داده‌های وزن بدن) و بهبود فراهمی گلوکز مغز در اثر بهبود افسردگی و انهدونیا، بهبود عملکرد فضائی را در گروه تمرین اختیاری پیچیده توجیه کند. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که برای تعیین سازوکار دقیق بهبود ظرفیت شناختی در اثر تمرین بدنی و شناختی، اندازه‌گیری مقدار دریافت غذا و مقاومت انسولینی و گلوکز خون پیشنهاد بسیار جالبی برای تحقیقات آینده باشد.

با اینکه انتظار می‌رود احتمالاً در اثر فعالیت روی چرخ پیچیده باید درگیری قشر مغز بیشتر از چرخ ساده باشد، ولی به دلیل ریتم متناوب گام‌برداری و ایجاد تکان‌های نامنظم (مشهور به بروز سکنه) در مسیر چرخش چرخ دوار پیچیده، به طور معمول سرعت در چرخ ساده بیشتر است. این مسئله می‌تواند بر شدت دوییدن بسیار تأثیرگذار باشد. همچنین دوییدن روی چرخ پیچیده سطح غیریکنواخت و بالاتری از فعالیت مغز (ذهن‌آگاهی) را نسبت به چرخ ساده طلب می‌کند [۱۰۴] و این ذهن‌آگاهی بیشتر در طول روز، نیاز به خواب و شدت و مدت خواب را افزایش می‌دهد [۱۰۵]. بنابراین شاید موش‌های گروه تمرین پیچیده، زمان خواب بیشتری نسبت به دو گروه دیگر داشته‌اند (که در این تحقیق اندازه‌گیری نشده است) و با در نظر گرفتن این نکته که خواب بیشتر سبب تثبیت بهتر یادگیری می‌شود [۱۰۶]، بهبود عملکرد حافظه فضایی آنها در تکلیف ماز موریس، بهتر توجیه‌پذیر می‌شود. اما در این تحقیق مدت خواب، فعالیت قشر مغز، مدت و تعداد وهله‌ها و سرعت دوییدن اختیاری و سطح ذهن‌آگاهی اندازه‌گیری نشده است و لحاظ کردن این موارد برای تحقیقات مشابه آینده پیشنهاد می‌شود.

یکی دیگر از یافته‌های پژوهش حاضر، افزایش چگالی نورونی ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه تمرین اختیاری پیچیده نسبت به گروه کنترل آلزایمر بود. آتروفی هیپوکامپ در بیماران زوال عقل و AD یک پدیده مسلم است [۱۰۷، ۱۰۸]. افزایش تراکم نورونی ناحیه هیپوکامپ یا به عبارتی نورون‌ها به این معناست که سلول‌های عصبی جدید تولید می‌شوند که می‌تواند به بازسازی هیپوکامپ کمک کند [۱۰۹]. تعداد و بلوغ نورون‌های عصبی در این منطقه با پیشرفت بیماری به تدریج کاهش می‌یابد و با اختلالات شناختی و حافظه ارتباط دارد [۱۱۰]. نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در تقویت عملکرد مدارهای مستقیم و چند سیناپسی دخیل در تثبیت حافظه درگیرند [۱۱۱]. از این رو در تشخیص بیماری زوال عقلی و آلزایمر، ضخامت ناحیه CA1 بهتر از حجم هیپوکامپ است [۱۱۲]. در بزرگسالی نورون‌ها عمدتاً در دو ناحیه تحت بطنی<sup>۱</sup> در امتداد بطن‌های جانبی و در ناحیه تحت گرانولار<sup>۲</sup> مربوط به شکنج دنداندار<sup>۳</sup> روی می‌دهد. در هر دو ناحیه، افزایش نورون‌ها با تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی ساکن آغاز می‌شود. نورون‌ها توسط عوامل رشد عصبی و به ویژه BDNF کنترل می‌شود. اما افزایش ضخامت لایه سلول‌های هرمی ناحیه CA1 حاکی از بهبود آرایش سلولی در این ناحیه است [۱۱۳]. این بهبود آرایش می‌تواند اتصالات عصبی بین ساییکولوم و قشر آنتورینال<sup>۴</sup> را تسهیل کند [۱۱۳]. سلول‌های لایه پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌توانند در کوتاه شدن دندریت‌ها، از دست دادن سیناپس‌های نخاعی و تسهیل نورون‌ها نقش داشته باشد. آسیب به این بخش از هیپوکامپ با اختلال حافظه فضایی همراه است [۱۱۴]. کاهش حجم لایه پیرامیدال ناحیه CA1 در رت‌های پیر می‌تواند نشانی از آتروفی دندریت نورون‌های هرمی این ناحیه باشد [۱۱۵]. از نظر پاتوفیزیولوژیکی، نورون‌های بخش CA1 از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا آنها آسیب‌پذیری انتخابی<sup>۵</sup> در برابر استرس متابولیک سلولی از جمله هیپوکسمی و ایسکمی را نشان می‌دهند [۱۱۱]. سلول‌های هرمی در CA1 هیپوکامپ بسیار مستعد آسیب‌هایی مانند ایسکمی با سموم [۱۱۶، ۱۱۷] و استرس اکسیداتیو [۱۱۸] است. اما ما نتوانستیم تعیین کنیم که چه مقدار از تغییرات مشاهده‌شده در چگالی نورونی و ضخامت سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ مستقیماً به نکروپتوز مرتبط است و اینکه چه مقدار از بهبودی‌های مذکور به تفکیک به تمرین بدنی و یا چالش ذهنی حاصل از پیچیده کردن محیط تمرین اختیاری مرتبط هستند. البته

1. Subventricular Zone (SVZ)

3. Dentate Gyrus (DG)

5. Selective Vulnerability

2. Subgranular Zone (SGZ)

4. Entorhinal Cortex

قابلیت تمرینات بدنی اختیاری بر مورفولوژی هیپوکامپ [۱۲۳-۱۱۹]، قبلاً هم تأیید شده است. همچنین اشاره شده است که حتی پس از دو روز انجام فعالیت اختیاری، افزایش عوامل درگیر در نروژنز روی می‌دهد که بر آغاز سریع آن دلالت دارد. البته در همین مدت زمان، تمایز سلولی نیز به شدت روی می‌دهد و فراخوانی و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی خاموش نیز وجود دارد. پس از دو روز تا روز هفتم تمرینات، کاهش تکثیر سلولی گزارش شده که بیان شده است برای پر کردن ذخیره سلولی و تضمین نروژنز بیشتر روی می‌دهد [۱۲۴]. اما در مورد تأثیر ویژه تمرینات اختیاری پیچیده بر نروژنز و به‌ویژه آنروپی مغزی ناشی از نکروپتوز، اطلاعات بسیار اندکی موجود است. به بیان دیگر معلوم نیست که هرگونه افزایش نروژنز مغزی دقیقاً مربوط به نکروپتوز است یا اینکه از سایر جنبه‌های مرگ سلولی از جمله آپوپتوز و نکروز و غیره نشأت می‌گیرد. بنابراین به نظر می‌رسد که در تحقیقات آینده رخداد واقعی نکروپتوز و سایر انواع مرگ سلولی نیز باید مستقیماً تفکیک شود.

در نهایت باید اشاره شود که پیشرفت AD با هرگونه مداخله (اعم از دارویی، رژیم، ورزشی و ...) کاملاً قابل توقف نیست [۱۲۵] و به‌طور روزمره پیشرفت بیماری در انسان روی می‌دهد [۱۲۶]. همچنین اصولاً نباید از مسئله پیشرفت سن و تأثیر آن بر افت ظرفیت شناختی و سایر رویدادهای منجرشونده به بیماری‌های تحلیل عصبی غفلت شود. اما حداقل مشاهده تغییر ژن‌های احتمالاً مؤثر بر روند التهاب و نکروپتوز در هیپوکامپ و بهبود حافظه فضایی موش‌های مدل AD در اثر تمرین اختیاری پیچیده (اگرچه هنوز شواهد بیشتری و به‌ویژه در مورد جمعیت انسانی نیاز است)، اهمیت احتمالی تمرین ورزشی توأم با چالش شناختی را برای بهبود اختلالات شناختی در بیماران AD برجسته و نویدبخش می‌کند [۱۲۷]. بنابراین بر مبنای یافته‌های تحقیق حاضر، پیشنهاد می‌شود که بهتر است تمرینات جسمی و شناختی توأم در اولویت تجویز پزشکان قرار گیرد. از طرفی تمرینات بدنی با بهبود متابولیسم، افسردگی، تعادل و کاهش خطر زمین خوردن و ... مواجه‌اند که در بیماران AD به دلیل مستعد بودن به اختلالات مذکور، اهمیت ویژه‌ای دارند و احتمالاً غنی کردن محیط تمرینی آنها با ایجاد چالش شناختی، نتایج تمرینات بدنی را ارتقا دهد.

در کل نتایج تحقیق حاضر بر قابلیت تمرین اختیاری پیچیده بر بهبود ریخت‌شناسی مغز و حافظه فضایی و همچنین کاهش روند التهاب و نکروپتوز در هیپوکامپ موش‌های مدل AD دلالت دارد. اما یکی از نکات اصلی و محدودیت‌های تحقیق حاضر مربوط به گروه‌بندی بود که نتوانستیم اثر تمرین بدنی را از اثر چالش ذهنی تفکیک کنیم. اگرچه به دلیل حیوانی بودن تحقیق، این مسئله کلاً قابل حل به نظر نمی‌رسد و تنها در مطالعات انسانی می‌توان تأثیر جداگانه چالش‌های ذهنی و بدنی در بیماران AD یا در جمعیت‌های مستعد بررسی کرد. در تحقیق حاضر در مورد کافی بودن پیچیدگی کافی محیط تمرین (در قالب استفاده از چرخ دوآر) برای اعمال محرکی مؤثر و کارآمد و ایجاد سازگاری حاصل از چالش ذهنی (مشابه با تمرین شناختی در جمعیت انسانی) اطمینان وجود ندارد که البته این مسئله چالش کلی و بزرگی برای تمام محققان این زمینه محسوب می‌شود. همچنین ما از بین متغیرهای التهابی فقط TNFR1 را سنجش کردیم و رخداد واقعی نکروپتوز در مغز را به‌طور مستقیم تأیید نکردیم. افزون بر این بیان ژن‌های مرتبط با نکروپتوز نمی‌تواند دلیل بر بروز نهایی آن باشد و بهتر است که سطوح پروتئین‌های عملگر نهایی دخیل در نکروپتوز و یا التهاب مستقیماً سنجش شود. در ضمن، تعداد نمونه‌های تحقیق در گروه‌های تحقیق حاضر نسبتاً کم بود و همچنین با وجود فراهم بودن فرآیندهای بسیار زیاد، با توجه به ماهیت چندعلتی آلزایمر با منشأ التهابی، متابولیکی، نروتروفیکی و ...، در حال حاضر عملاً از چگونگی و کافی بودن احتمالی نوع و دوز تمرین بدنی برای مراحل مختلف بیماری آلزایمر با اتیولوژی مختلف، اطمینان وجود ندارد. از سویی در مورد مسیرهای مولکولی و مکانیسم‌های احتمالی توجیه‌کننده و ربط‌دهنده دستکاری التهاب و نکروپتوز مغز توسط پیچیدگی حاصل از دستکاری محیط تمرین (از طریق حذف میله‌های محیط چرخ دوآر) اطلاعات روشنی در دسترس نیست که امکان تفسیر و بحث در این زمینه را به‌شدت محدود می‌کند. بدین ترتیب با در نظر گرفتن محدودیت‌های تحقیق و به‌ویژه احتمال مناسب نبودن مدل تزریق stz به دلیل ایجاد تغییرات سریع مورفولوژیک در هیپوکامپ و حتی کافی نبودن احتمالی دوز تمرینات بدنی و شناختی، به نظر می‌رسد که بهتر است تأثیر مداخلات توأم جسمی و ذهنی در جمعیت انسانی مستعد آلزایمر و یا حداقل واقع در مراحل اولیه AD و یا در حیوانات مبتنی بر مدل‌های القای طولانی‌مدت AD بررسی شود (با توجه به اینکه پیشنهاد شده است AD تنها در مراحل اولیه قابل کنترل است [۱۲۸]) و فقط بر یک مسیر مانند نکروپتوز اتکا نشده و در کنار مسیرهای

مولکولی، به بهینه‌سازی نوع و دوز تمرینات بدنی و شناختی پرداخته شده و به تظاهرات بالینی و ریخت‌شناختی AD نیز بیشتر تمرکز شود.

## تقدیر و تشکر

از تمامی دست‌اندرکاران پژوهش به سبب حمایت مالی/ حمایت معنوی/ همکاری در اجرای پژوهش حاضر (مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده ردیف اول) سپاسگزاری می‌شود.

## References

- [1] Liu-Seifert H, Siemers E, Sundell K, Price K, Han B, Selzler K, et al. Cognitive and functional decline and their relationship in patients with mild Alzheimer's dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;43(3):949-55. DOI: 10.3233/JAD-140792
- [2] Zahodne LB, Manly JJ, MacKay-Brandt A, Stern Y. Cognitive declines precede and predict functional declines in aging and Alzheimer's disease. *PloS one*. 2013;8(9):e73645. doi.org/10.1371/journal.pone.0073645
- [3] Dickerson B, Stoub T, Shah R, Sperling R, Killiany R, Albert M, et al. Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*. 2011;76(16):1395-402. doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182166e96
- [4] Popescu BO, Ankarcona M. Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease: role of presenilins. *Journal of Alzheimer's disease*. 2004;6(2):123-8. DOI: 10.3233/JAD-2004-6203
- [5] Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Current Alzheimer Research*. 2006;3(4):393-6. doi.org/10.2174/156720506778249470
- [6] Niikura T, Tajima H, Kita Y. Neuronal cell death in Alzheimer's disease and a neuroprotective factor, humanin. *Current neuropharmacology*. 2006;4(2):139-47. doi.org/10.2174/157015906776359577
- [7] Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG, editors. *The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis*. *Seminars in cell & developmental biology*; 2015: Elsevier. doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.003
- [8] He S. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009;137. doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021
- [9] Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*. 2005;1(2):112-9. doi.org/10.1038/nchembio711
- [10] Newton K, Manning G. Necroptosis and inflammation. *Annual review of biochemistry*. 2016;85:743-63. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014830
- [11] Zhao W, Liu Y, Xu L, He Y, Cai Z, Yu J, et al. Targeting Necroptosis as a Promising Therapy for Alzheimer's Disease. 2022. DIO: 10.1021/acschemneuro.2c00172
- [12] Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer biology & therapy*. 2016;17(9):899-910.
- [13] Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(5):455-65.
- [14] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell reports*. 2014;7(4):971-81.
- [15] Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L-F, et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*. 2014;54(1):133-46.
- [16] Zheng C, Zhou X-W, Wang J-Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Translational neurodegeneration*. 2016;5(1):1-15.
- [17] Jayaraman A, Htike TT, James R, Picon C, Reynolds R. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus. *Acta neuropathologica communications*. 2021;9(1):1-21.
- [18] Yu Z, Jiang N, Su W, Zhuo YJFIP. Necroptosis: a novel pathway in neuroinflammation. 2021;12.
- [19] Yang SH, Lee DK, Shin J, Lee S, Baek S, Kim J, et al. Nec-1 alleviates cognitive impairment with reduction of A $\beta$  and tau abnormalities in APP/PS1 mice. 2017;9(1):61.
- [20] Caccamo A, Branca C, Piras IS, Ferreira E, Huentelman MJ, Liang WS, et al. Necroptosis activation in Alzheimer's

- disease. 2017;20(9):1236-46.
- [21] López-Ortiz S, Pinto-Fraga J, Valenzuela PL, Martín-Hernández J, Seisedos MM, García-López O, et al. Physical exercise and Alzheimer's disease: effects on pathophysiological molecular pathways of the disease. 2021;22(6):2897.
- [22] Sujkowski AL, Hong L, Wessells R, Todi SVJARR. The protective role of exercise against age-related neurodegeneration. 2021;101543.
- [23] Fuller OK, Whitham M, Mathivanan S, Febbraio MA. The protective effect of exercise in neurodegenerative diseases: the potential role of extracellular vesicles. Cells. 2020;9(10):2182.
- [24] Ghardashi Afousi A, Gaeini A, Rakhshan K, Naderi N, Darbandi Azar A, Aboutaleb N. Targeting necroptotic cell death pathway by high-intensity interval training (HIIT) decreases development of post-ischemic adverse remodelling after myocardial ischemia / reperfusion injury. Journal of cell communication and signaling. 2019;13(2):255-67.
- [25] Jahani M, Matin Homaie H, Farzanegi P. Effect of Continuous and Interval Exercise on the Necroptosis and Apoptosis of Endoplasmic Reticulum Proteins in the Heart of Diabetic Wistar Rats. Ilam-University-of-Medical-Sciences. 2020;28(5):53-63.
- [26] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. Nature. 2014;505(7483):344-52.
- [27] Gronek P, Balko S, Gronek J, Zajac A, Maszczyk A, Celka R, et al. Physical activity and Alzheimer's disease: a narrative review. 2019;10(6):1282.
- [28] Azevedo CV, Hashiguchi D, Campos HC, Figueiredo EV, Otaviano SFS, Penitente AR, et al. The effects of resistance exercise on cognitive function, amyloidogenesis, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. 2023;17:1131214.
- [29] Huuha AM, Norevik CS, Moreira JBN, Kobro-Flatmoen A, Scrimgeour N, Kivipelto M, et al. Can exercise training teach us how to treat Alzheimer's disease? Ageing Research Reviews. 2022;75:101559.
- [30] Meng Q, Lin MS, Tzeng IS. Relationship Between Exercise and Alzheimer's Disease: A Narrative Literature Review. Frontiers in neuroscience. 2020;14:131.
- [31] Mohammadikia E, Mohebbi F, Babaei HJJoSP, Conditioning A. The effect of 12 weeks aerobic training on TNF- $\alpha$  levels in the hippocampus and prefrontal cortex, and depression in rats with Alzheimer's disease. 4(4):48.
- [32] Liu Y, Chu JMT, Yan T, Zhang Y, Chen Y, Chang RCC, et al. Short-term resistance exercise inhibits neuroinflammation and attenuates neuropathological changes in 3xTg Alzheimer's disease mice. 2020;17(1):1-16.
- [33] Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S, Kita IJLs. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. 2007;80(4):356-63.
- [34] Belviranlı M, Okudan N. Voluntary, involuntary and forced exercises almost equally reverse behavioral impairment by regulating hippocampal neurotrophic factors and oxidative stress in experimental Alzheimer's disease model. Behavioural Brain Research. 2019;364:245-55.
- [35] Chomiak T, Block EW, Brown AR, Teskey GC, Hu B. Development and testing of a new system for assessing wheel-running behaviour in rodents. BMC Research Notes. 2016;9(1):262.
- [36] McKenzie IA, Ohayon D, Li H, Paes de Faria J, Emery B, Tohyama K, et al. Motor skill learning requires active central myelination. science. 2014;346(6207):318-22.
- [37] Fazelzadeh M, Afzalpour ME, Fallah Mohammadi Z, Falah Mohammadi H. The effects of voluntary complex and regular wheel running exercises on the levels of 8-oxoguanine DNA glycosylase, semaphorin 3B, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and apoptosis in the hippocampus of diabetic rats. Brain and Behavior. 2021;11(3):e01988.
- [38] Ferrer-Pérez C, Reguilón MD, Miñarro J, Rodríguez-Arias MJB. Effect of Voluntary Wheel-Running Exercise on the Endocrine and Inflammatory Response to Social Stress: Conditioned Rewarding Effects of Cocaine. 2022;10(10):2373.
- [39] Manzanares G, Brito-da-Silva G, Gandra PJBJoM, Research B. Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. 2018;52.
- [40] Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, et al. 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. 2009;35(3):426-32.
- [41] Francis N, Robison LS, Popescu DL, Michaelos M, Hatfield J, Xu F, et al. Voluntary Wheel Running Reduces Amyloid- $\beta$  42 and Rescues Behavior in Aged Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. 2020;73(1):359-74.
- [42] Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CWJJoN. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model



- of Alzheimer's disease. 2005;25(17):4217-21.
- [43] Tapia-Rojas C, Aranguiz F, Varela-Nallar L, Inestrosa NCJBP. Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. 2016;26(1):62-74.
- [44] Stewart S, Cacucci F, Lever CJJoAsd. Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. 2011;26(1):105-26.
- [45] Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, et al. Cognitive and Physical Activity Differently Modulate Disease Progression in the Amyloid Precursor Protein (APP)-23 Model of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. 2006;60(12):1314-23.
- [46] Svensson M, Andersson E, Manouchehrian O, Yang Y, Deierborg TJSr. Voluntary running does not reduce neuroinflammation or improve non-cognitive behavior in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. 2020;10(1):1-10.
- [47] Richard R, Mousa S. Necroptosis in Alzheimer's disease: Potential therapeutic target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;152:113203.
- [48] Ahmadi f, fallahmohammadi z. THE EFFECT OF FOUR WEEKS' VOLUNTARY EXERCISE ON A REGULAR AND COMPLEX WHEEL RUNNING ON NG2 BRAIN LEVELS IN HEALTHY MALE WISTAR RATS %J Studies in Medical Sciences. 2019;29(12):896-903.
- [49] McKenzie IA, Ohayon D, Li H, De Faria JP, Emery B, Tohyama K, et al. Motor skill learning requires active central myelination. *science*. 2014;346(6207):318-22.
- [50] Soheili Kashani M, Salami M, Rezaei-Tavirani M, Talaie Zavareh SAJKJ. Maze training improves learning in an Alzheimer model of rat. 2010;14(3):209-16.
- [51] Qin F, Dong Y, Wang S, Xu M, Wang Z, Qu C, et al. Maximum oxygen consumption and quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-8.
- [52] Mehta K, Kaur B, Pandey KK, Kaler S, Dhar P. Curcumin supplementation shows modulatory influence on functional and morphological features of hippocampus in mice subjected to arsenic trioxide exposure. *Anatomy & Cell Biology*. 2020;53(3):355-65.
- [53] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
- [54] Thadathil N, Nicklas EH, Mohammed S, Lewis TL, Richardson A, Deepa SS. Necroptosis increases with age in the brain and contributes to age-related neuroinflammation. *GeroScience*. 2021;43(5):2345-61.
- [55] Samson AL. MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nat Commun*. 2020;11.
- [56] Hosseini-Gerami L, Higgins IA, Collier DA, Laing E, Evans D, Broughton H, et al. Benchmarking causal reasoning algorithms for gene expression-based compound mechanism of action analysis. *BMC Bioinformatics*. 2023;24(1):154.
- [57] Brod SA. Anti-Inflammatory Agents: An Approach to Prevent Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2022;85(2):457-72.
- [58] Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor SJJ. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. 2018;154(2):204-19.
- [59] Anna Catharina van L, Wiesje Maria van der F, Alle Meije W, Ellen D, Colin G, Jos T, et al. Cognitive reserve and clinical progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2019;93(4):e334.
- [60] Van Loenhoud AC, van der Flier WM, Wink AM, Dicks E, Groot C, Twisk J, et al. Cognitive reserve and clinical progression in Alzheimer disease: a paradoxical relationship. 2019;93(4):e334-e46.
- [61] Poddar J, Singh S, Kumar P, Bali S, Gupta S, Chakrabarti S. Inhibition of complex I-III activity of brain mitochondria after intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats is possibly related to loss of body weight. *Heliyon*. 2020;6(7):e04490.
- [62] Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai C-I, Lee MH, et al. Brain Gene Expression of a Sporadic (icv-STZ Mouse) and a Familial Mouse Model (3xTg-AD Mouse) of Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e51432.
- [63] Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, Lamanna JC, Perry G, et al. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 2013;10(4):406-19.
- [64] Santos TdO, Mazucanti CHY, Xavier GF, Torão AdS. Early and late neurodegeneration and memory disruption

- after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiology & Behavior*. 2012;107(3):401-13.
- [65] Zhou S, Yu G, Chi L, Zhu J, Zhang W, Zhang Y, et al. Neuroprotective effects of edaravone on cognitive deficit, oxidative stress and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Neurotoxicology*. 2013;38:136-45.
- [66] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci*. 2014;96(1-2):7-17.
- [67] Du LL, Chai DM, Zhao LN, Li XH, Zhang FC, Zhang HB, et al. AMPK activation ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease model in rats. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;43(3):775-84.
- [68] Tang BLJT. Neuropathological mechanisms associated with pesticides in Alzheimer's disease. 2020;8(2):21.
- [69] Yan D, Zhang Y, Liu L, Yan HJSr. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. 2016;6(1):32222.
- [70] Tu Y, Yang Y, Wang Y, Wu N, Tao J, Yang G, et al. Developmental exposure to chlorpyrifos causes neuroinflammation via necroptosis in mouse hippocampus and human microglial cell line. 2022;314:120217.
- [71] Godbolt A, Waldman A, MacManus D, Schott J, Frost C, Cipelotti L, et al. MRS shows abnormalities before symptoms in familial Alzheimer disease. 2006;66(5):718-22.
- [72] McDade E, Wang G, Gordon BA, Hassenstab J, Benzinger TL, Buckles V, et al. Longitudinal cognitive and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer disease. 2018;91(14):e1295-e306.
- [73] Kamat PK. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural regeneration research*. 2015;10(7):1050-2.
- [74] Roy A, Sharma S, Nag TC, Katyal J, Gupta YK, Jain S. Cognitive Dysfunction and Anxiety Resulting from Synaptic Downscaling, Hippocampal Atrophy, and Ventricular Enlargement with Intracerebroventricular Streptozotocin Injection in Male Wistar Rats. *Neurotox Res*. 2022;40(6):2179-202.
- [75] Nasserri B, Zareian P, Alizade H. Apelin attenuates streptozotocin-induced learning and memory impairment by modulating necroptosis signaling pathway. *International Immunopharmacology*. 2020;84:106546.
- [76] Silva SSL, Tureck LV, Souza LC, Mello-Hortega JV, Piombini AL, Teixeira MD, et al. Animal model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin: New insights about cholinergic pathway. *Brain research*. 2023;1799:148175.
- [77] Costa M, Bernardi J, Fiuza T, Costa L, Brandão R, Pereira ME. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-biological interactions*. 2016;253:10-7.
- [78] Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, et al. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death & Differentiation*. 2002;9(8):818-31.
- [79] Chen WN, Yeong KY. Scopolamine, a Toxin-Induced Experimental Model, Used for Research in Alzheimer's Disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2020;19(2):85-93.
- [80] Pluta R, Januszewski S, Czuczwar SJJFIAN. Brain ischemia as a prelude to Alzheimer's disease. 2021;13:636653.
- [81] Pluta R, Miziak B, Czuczwar SJJJoMS. Post-Ischemic Permeability of the Blood-Brain Barrier to Amyloid and Platelets as a Factor in the Maturation of Alzheimer's Disease-Type Brain Neurodegeneration. 2023;24(13):10739.
- [82] Stefanova N, Kozhevnikova O, Vitovtov A, Maksimova K, Logvinov S, Rudnitskaya E, et al. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. 2014;13(6):898-909.
- [83] Disterhoft JF, Moyer Jr JR, Thompson LTJAotNYAoS. The Calcium Rationale in Aging and Alzheimer's Disease: Evidence from an Animal Model of Normal Aging a. 1994;747(1):382-406.
- [84] Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, et al. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? 2008;190(1):74-84.
- [85] Wang G, Zhou H-H, Luo L, Qin L-Q, Yin J, Yu Z, et al. Voluntary wheel running is capable of improving cognitive function only in the young but not the middle-aged male APPSwe/PS1De9 mice. 2021;145:105010.
- [86] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Grünblatt E, Riederer P, Hoyer SJJJoAsdJ. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. 2009;18(4):729-50.
- [87] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer PJJont. Cerebral amyloid

- [angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. 2011;118:765-72.](#)
- [88] [Hampstead BM, Stringer AY, Jordan AD, Ploutz-Snyder R, Sathian K. Toward rational use of cognitive training in those with mild cognitive impairment. 2023;19\(3\):933-45.](#)
- [89] [Bamidis PD, Fissler P, Papageorgiou SG, Zilidou V, Konstantinidis EI, Billis AS, et al. Gains in cognition through combined cognitive and physical training: the role of training dosage and severity of neurocognitive disorder. 2015;7:152.](#)
- [90] [Belleville S, Cloutier S, Mellah S, Willis S, Vellas B, Andrieu S, et al. Is more always better? Dose effect in a multidomain intervention in older adults at risk of dementia. 2022;18\(11\):2140-50.](#)
- [91] [Gallardo-Gómez D, del Pozo-Cruz J, Noetel M, Álvarez-Barbosa F, Alfonso-Rosa RM, del Pozo Cruz B. Optimal dose and type of exercise to improve cognitive function in older adults: A systematic review and bayesian model-based network meta-analysis of RCTs. Ageing Research Reviews. 2022;76:101591.](#)
- [92] [Turner V, Husain MJAP, Translational, Integration C. Anhedonia in neurodegenerative diseases. 2022:255-77.](#)
- [93] [Natta LE, Melrose RJ, Harwood DG, Sultzer DLJTAJoGP. An examination of anhedonia separate from depression in Alzheimer's disease: a preliminary study. 2013;21\(3\):S78-S9.](#)
- [94] [Scheggi S, De Montis MG, Gambarana CJIJoN. Making sense of rodent models of anhedonia. 2018;21\(11\):1049-65.](#)
- [95] [Joubert C, Chainay HJCIia. Aging brain: the effect of combined cognitive and physical training on cognition as compared to cognitive and physical training alone—a systematic review. 2018:1267-301.](#)
- [96] [Dare LR, Garcia A, Soares CB, Lopes L, Neves B-HS, Dias DV, et al. The reversal of memory deficits in an Alzheimer's disease model using physical and cognitive exercise. 2020;14:152.](#)
- [97] [Huang Y-Q, Wu C, He X-F, Wu D, He X, Liang F-Y, et al. Effects of voluntary wheel-running types on hippocampal neurogenesis and spatial cognition in middle-aged mice. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2018;12:177.](#)
- [98] [Lenizky M. The Effect of Working Memory on Corticospinal Excitability: University of Waterloo; 2020.](#)
- [99] [Ehrenreich H, Garcia-Agudo LF, Steixner-Kumar AA, Wilke JB, Butt UJ. Introducing the brain erythropoietin circle to explain adaptive brain hardware upgrade and improved performance. Molecular Psychiatry. 2022;27\(5\):2372-9.](#)
- [100] [Jin Y, Sun LH, Yang W, Cui RJ, Xu SB. The Role of BDNF in the Neuroimmune Axis Regulation of Mood Disorders. Frontiers in neurology. 2019;10:515.](#)
- [101] [Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CXJTJop. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. 2011;225\(1\):54-62.](#)
- [102] [Sergi G, De Rui M, Coin A, Inelmen EM, Manzato EJPotNS. Weight loss and Alzheimer's disease: temporal and aetiological connections. 2013;72\(1\):160-5.](#)
- [103] [Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, et al. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. 2003;30:1104-13.](#)
- [104] [Vyazovskiy VV, Fisher SP, Gemignani J, Summerer L, Vyazovskiy VV, Summerer L. Assessment of Physical Exercise Benefits on Brain Health for Long-Duration Spaceflight. 2017.](#)
- [105] [Fisher SP, Cui N, McKillop LE, Gemignani J, Bannerman DM, Oliver PL, et al. Stereotypic wheel running decreases cortical activity in mice. 2016;7\(1\):13138.](#)
- [106] [Nagai H, de Vivo L, Bellesi M, Ghilardi MF, Tononi G, Cirelli CJS. Sleep consolidates motor learning of complex movement sequences in mice. 2017;40\(2\):zsw059.](#)
- [107] [Wisse L, Ravikumar S, Ittyerah R, Lim S, Lane J, Bedard M, et al. Downstream effects of polypathology on neurodegeneration of medial temporal lobe subregions. acta neuropathologica communications. 2021;9\(1\):1-11.](#)
- [108] [La C, Linortner P, Bernstein JD, Cruadhlaioich MAU, Fenesy M, Deutsch GK, et al. Hippocampal CA1 subfield predicts episodic memory impairment in Parkinson's disease. NeuroImage: Clinical. 2019;23:101824.](#)
- [109] [Risher ML, Sexton HG, Risher WC, Wilson WA, Fleming RL, Madison RD, et al. Adolescent intermittent alcohol exposure: dysregulation of thrombospondins and synapse formation are associated with decreased neuronal density in the adult hippocampus. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2015;39\(12\):2403-13.](#)
- [110] [Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. Nature medicine. 2019;25\(4\):554-60.](#)



- [111] Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010;2:12.
- [112] Kerchner G, Hess C, Hammond-Rosenbluth K, Xu D, Rabinovici G, Kelley D, et al. Hippocampal CA1 apical neuropil atrophy in mild Alzheimer disease visualized with 7-T MRI. *Neurology*. 2010;75(15):1381-7.
- [113] Moorthi P, Premkumar P, Priyanka R, Jayachandran K, Anusuyadevi M. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward SAD. *Neuroscience*. 2015;301:90-105.
- [114] Gouthaman P, Vijayalakshmi S, Vijayaraghavan R, Senthilkumar S. Effect of *Loranthus longiflorus* Extract on Neuronal Damage Induced by Electromagnetic Radiation in Wistar Rats. *Indian Journal of Animal Research*. 1:7.
- [115] Sabbatini M, Catalani A, Consoli C, Marletta N, Tomassoni D, Avola R. The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: an animal model of vascular dementia? *Mechanisms of ageing and development*. 2002;123(5):547-59.
- [116] Bartsch T, Alfke K, Stingele R, Rohr A, Freitag-Wolf S, Jansen O, et al. Selective affection of hippocampal CA-1 neurons in patients with transient global amnesia without long-term sequelae. *Brain*. 2006;129(11):2874-84.
- [117] Wang J-Y, Xia Q, Chu K-T, Pan J, Sun L-N, Zeng B, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2011;70(4):314-22.
- [118] Wang X, Zaidi A, Pal R, Garrett AS, Braceris R, Chen X-w, et al. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC neuroscience*. 2009;10(1):1-20.
- [119] Vivar C, Praag Hv. Running Changes the Brain: the Long and the Short of It. 2017;32(6):410-24.
- [120] Kitamura T, Mishina M, Sugiyama H. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon 1$  subunit. *Neuroscience Research*. 2003;47(1):55-63.
- [121] Gao Y, Syed M, Zhao X. Mechanisms underlying the effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis. 2023;33(4):373-90.
- [122] Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007;17(11):1017-22.
- [123] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(23):13427-31.
- [124] Gremmelspacher T, Gerlach J, Hubbe A, Haas CA, Häussler UJFiN. Neurogenic processes are induced by very short periods of voluntary wheel-running in male mice. 2017;11:385.
- [125] Sang Z, Wang K, Dong J, Tang LJEJoMC. Alzheimer's disease: updated multi-targets therapeutics are in clinical and in progress. 2022;238:114464.
- [126] Aisen PS, Jimenez-Maggiora GA, Rafii MS, Walter S, Raman RJNRN. Early-stage Alzheimer disease: getting trial-ready. 2022;18(7):389-99.
- [127] De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, Millan F, Salvador-Pascual A, García-Lucerga C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of sport and health science*. 2020;9(5):394-404.
- [128] Assunção SS, Sperling RA, Ritchie C, Kerwin DR, Aisen PS, Lansdall C, et al. Meaningful benefits: a framework to assess disease-modifying therapies in preclinical and early Alzheimer's disease. 2022;14(1):1-16.