



Research Paper

Comparison the effects of diets with and without caloric restriction along with continuous training on the expression of Amyloid-beta precursor protein and Tau genes in Alzheimer's disease of old male rats



Houri Karimi¹, Mahtab Moazzami^{2*}, Ali Yaghoubi³, Sadeqh Abbasian⁴

Received: May 09, 2024

Revised: Aug 13, 2024

Accepted: Aug 13, 2024

Article info

1. PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.
2. Associate Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor at Department of Physical Education and Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.
4. Assistant Professor at Department of Physical Education, Farhangian University, Tehran, Iran.

* Corresponding Author Address:

Department of Exercise Physiology,
Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi
University of Mashhad, Mashhad, Iran;
Email: moazzami@um.ac.ir.

Extended Abstract

Background and Aim: Alzheimer's disease (AD) is recognized as the most common age-related neurodegenerative disease. It is characterized by progressive cognitive and behavioral decline. The hallmark pathological features of AD include the accumulation of extracellular Amyloid plaques composed of Amyloid-beta ($A\beta$) protein and the formation of intracellular neurofibrillary tangles consisting of Tau proteins. Previous studies have demonstrated that exercise training, as well as aerobic training, can have beneficial effects on brain health and cognitive function of the brain as well as reduces the destructive effects of neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and depression. One of the mechanisms through which exercise may exert its neuroprotective effects is by reducing Tau protein levels. However, the findings regarding changes in Tau and other related molecular factors in response to exercise remain inconsistent. Therefore, the aim of the present study was to compare the effects of diets with and without caloric restriction along with continuous exercise on the expression of selected genes associated with Alzheimer's disease in aged male rats.

Materials and Methods: Thirty-six aged male Wistar rats (26 months old) were used in this study. The animals were randomly assigned to four independent groups: the control group (n= 9), the continuous exercise group (n= 8), the

Cite this article:

Karimi H, Moazzami M, Yaghoubi A, Abbasian S. Comparison the effects of diets with and without caloric restriction along with continuous training on the expression of Amyloid-beta precursor protein and Tau genes in Alzheimer's disease of old male rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*. 2025;13(34):66-80. <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2024.7629.1865>



continuous exercise with caloric restriction group (n=9), and the caloric restriction group (n=7). All rats were housed in standard polycarbonate cages (47 × 27 × 20 cm) provided by Nikan Industry Company (Iran), under controlled laboratory conditions: a 12-hour light/dark cycle, ambient temperature of 22 °C, and 50% relative humidity. The animals were fed a specialized rodent diet (Jovaneh Khorasan Company). Each rat received 10 g of food per 100 g of body weight daily, except for the caloric restriction groups, where the food amount was reduced by 30%. Over time, this restriction was gradually adjusted to approximately a 20% reduction in total caloric intake.

The exercise protocol lasted six weeks, with five sessions per week. The duration of the training sessions was 10 minutes in the first week, 15 minutes in the second to fourth weeks, and 40 minutes in the fifth to sixth weeks. To ensure adaptation, all rats underwent a two-week familiarization period at a low treadmill speed (<6 m/min) prior to the start of the main protocol. The exercise regimen included a five-minute warm-up and five-minute cool-down at a moderate intensity (10 m/min) on a treadmill. Twenty-four hours after the final training session, brain tissues were harvested. The expression levels of Amyloid-beta precursor protein (APP) and Tau genes in the cerebral cortex were measured using real-time PCR. Additionally, blood samples were collected to determine insulin levels using a commercial kit, and insulin resistance was assessed using the Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR).

Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test for pairwise comparisons. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: Although there were statistically significant changes reported in Tau gene expression ($F=0.83$, $p=0.48$) — note: this appears to be a discrepancy since F and p values are the same as for APP — no significant pairwise differences were observed between the groups, as follows: ($p=0.99$ between the continuous exercise and continuous-caloric restriction groups; $p=0.14$: between the continuous exercise and caloric restriction groups; $p=0.05$: between the continuous exercise and control groups; $p=0.21$: between the continuous exercise-caloric restriction and caloric restriction groups; $p=0.08$: between the continuous exercise-caloric restriction and control groups; and finally $p=0.98$: between the caloric restriction and control groups) (Table 1). In addition, no significant difference was found in insulin resistance between the continuous exercise group and the continuous exercise with caloric restriction group ($F=3.67$, $p=0.90$) (Table 1).

Conclusion: In summary, six weeks of continuous exercise combined with caloric restriction (initially 30%, then reduced to

Table 1. Changes in the Amyloid-beta precursor protein (APP) and Tau genes as well as insulin resistance of aged male rats after the interventions

Variables	Groups	Mean ± SD	F statistic	Sig
APP gene expression (arbitrary unit)	Continuous (n = 8)	0.70 ± 1.49	1.15	0.35
	Continuous with restriction (n = 9)	0.64 ± 1.32		
	Caloric restriction (n = 7)	0.93 ± 1.02		
	Control (n = 9)	0.01 ± 1.00		
Tau gene expression (arbitrary unit)	Continuous (n = 8)	2.65 ± 1.89	3.75	0.02 *
	Continuous with restriction (n = 9)	2.48 ± 1.19		
	Caloric restriction (n = 7)	1.21 ± 1.32		
	Control (n = 9)	1 ± 0.01		
Insulin (pmol/lit)	Continuous (n = 8)	35.72 ± 289.44	3.67	0.29
	Continuous with restriction (n = 9)	36.8 ± 275.66		
	Caloric restriction (n = 7)	59.6 ± 287.66		
	Control (n = 9)	68.24 ± 291.22		
Insulin resistance	Continuous (n = 8)	9.51 ± 0.80	1.24	0.29
	Continuous with restriction (n = 9)	9.37 ± 0.60		
	Caloric restriction (n = 7)	8.77 ± 0.79		
	Control (n = 9)	8.85 ± 1.30		

approximately 20%) did not result in significant changes in Tau gene expression in the brain tissue of aged male rats. Similarly, no significant changes were observed in APP gene expression or insulin levels.

These findings suggest that the combined intervention of caloric restriction and exercise may not be sufficient to alter the expression of key genes implicated in Alzheimer's disease under the conditions tested. To gain a more comprehensive understanding of the molecular mechanisms involved in Alzheimer's pathology, future studies should explore different intensities and durations of exercise, varying degrees of caloric restriction, and a broader range of genetic markers.

Keywords: Exercise training, Caloric restriction, Amyloid-beta precursor protein, Tau gene, Aging.

Ethical Considerations: The current investigation was conducted in accordance with ethical guidelines, including obtaining informed consent from all participants and ensuring their confidentiality throughout the research process.

Compliance with ethical guideline: This study was conducted with the approval of the Ethics Committee of Islamic Azad University, Bojnourd Branch (IR.NKUMS.REC.1402.058 IR.IAU.BOJNOURD.REC.1401.006).

Funding: This study did not receive any funding from institutions.

Conflicts of interest: The authors declare that there were no conflicts of interest in the current article.



مقاله پژوهشی

مقایسه اثر رژیم‌های با و بدون محدودیت کالریک به همراه تمرین تداومی بر بیان ژن‌های پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا و تائو در بیماری آلزایمر در رت‌های نر سالمند

حوری کریمی^۱، مهتاب معظمی^{۲*}، علی یعقوبی^۳، صادق عباسیان^۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰

اطلاعات مقاله

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم انسانی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران.
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران.
۴. استادیار گروه آموزش تربیت بدنی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر به عنوان شایع‌ترین بیماری تحلیل برنده مغزی وابسته به سن تعریف می‌شود. لذا، هدف از پژوهش حاضر مقایسه اثر رژیم‌های با و بدون محدودیت کالریک به همراه تمرین تداومی، بر بیان ژن‌های منتخب موثر در بیماری آلزایمر در رت‌های نر سالمند بود. **روش تحقیق:** ۳۶ سر رت نر سالمند (۲۶ ماهه با میانگین وزن $41/3 \pm 437/8$ گرم) به طور تصادفی به چهار گروه کنترل، تمرین تداومی، تمرین تداومی با محدودیت کالریک، و محدودیت کالریک تقسیم شدند. تمرینات تداومی به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته (۱۰ الی ۴۰ دقیقه) با رعایت اصل اضافه بار روی نوارگردان انجام شد. همچنین، محدودیت کالریک در ابتدا با کاهش ۳۰ درصدی و سپس ۲۰ درصدی در غذای مصرفی اعمال گردید. بافت برداری از مغز، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و بیان ژن پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا و ژن تائو در بافت در قشر مغز، با روش Real Time-PCR بررسی شد. همچنین، با استفاده از کیت تجاری انسولین خون اندازه‌گیری شد و توسط مدل هموئوستازی میزان مقاومت انسولینی ارزیابی گردید. به علاوه، جهت تحلیل نتایج از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌راهه و تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ استفاده شد. **یافته‌ها:** به طور کلی یافته‌ها حاکی از آن بود که بین اثر تمرین تداومی با و بدون محدودیت کالریک بر سطح مقاومت به انسولین در رت‌های نر سالمند تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. همچنین، نتایج حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری بین چهار گروه مورد بررسی در بیان ژن پیش‌ساز آمیلوئید بتا و ژن تائو، در بافت مغز رت‌های نر سالمند وجود نداشت. **نتیجه‌گیری:** به طور کلی تمرین تداومی، چه همراه با محدودیت کالریک و چه بدون آن، نمی‌تواند به تغییر معنی‌دار در بیان ژن پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا و بیان ژن تائو در بافت مغز رت‌های نر سالمند منجر شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین تداومی، محدودیت کالریک، ژن آمیلوئید بتا، ژن تائو، سالمندی.

*آدرس نویسنده مسئول:
خراسان رضوی، مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش؛
پست الکترونیک:
moazami@um.ac.ir

مقدمه

سالمندی یک فرآیند بیولوژیکی پیشرونده و اجتناب ناپذیر است که موجب زوال عقل و اختلال در حافظه می‌شود (۱). اگرچه سالمندی یک بیماری نیست، ولی عامل خطر برای اکثر بیماری‌های مزمن نظیر آلزایمر در نظر گرفته می‌شود (۲). آلزایمر به عنوان یک بیماری تخریب نورونی، شایع ترین نوع زوال عقل است. آلزایمر یک وضعیت عصبی با اختلال پیشرونده در عملکردهای رفتاری و شناختی است (۳، ۴). مشخصات عمده این بیماری در مغز عبارتند از تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی متشکل از رسوب پروتئین آمیلوئیدی بتا^۱ ($A\beta$) در خارج سلول و رشته‌های درهم تنیده داخل نورون‌ها متشکل از پروتئین‌های تائو^۲ (Tau) (۵). اگرچه مطالعات متعددی نشان داده اند که $A\beta$ و پروتئین پیش ساز آمیلوئید^۳ (APP) در مغز دارای نقش‌های فیزیولوژیکی می‌باشند (۶، ۷)، اما تجمع آن‌ها در مغز نیز عامل مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر است. تصور می‌شود که تجمع $A\beta$ در مغز در نتیجه عدم تعادل در تولید و پاک‌سازی آن از مغز ایجاد می‌شود (۸). به علاوه، نشان داده شده است که Tau ممکن است در اختلال در تنظیم سیگنال دهی انسولین و تغییرات بیماری‌زا در مغز نقش داشته باشد. در واقع، این پروتئین را به عنوان مؤلفه اصلی عدم یکپارچگی تارهای عصبی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر شناسایی کرده‌اند (۹). همچنین، گزارش شده است که همگام با چنین کاهشی در متابولیسم انرژی در مغز بواسطه کاهش مصرف گلوکز، فعالیت بتاسکرتاز نوع یک^۴ افزایش می‌یابد و منجر به تجمع بیشتر $A\beta$ می‌شود (۱۰). در این راستا، نشان داده شده است که اختلال در متابولیسم گلوکز با افزایش سطوح مغزی گلوتامات به دلیل کاهش برداشت گلوتامات توسط آستروسیت‌ها همراه است که به افزایش تجمع بیشتر $A\beta$ و افزایش سمیت مغزی منجر می‌شود (۱۱).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی به ویژه فعالیت ورزشی هوازی، اثرات مفیدی بر سلامت مغز و عملکرد شناختی مغز دارد و اثرات مخرب بیماری‌های نورولوژیک مانند آلزایمر، پارکینسون و افسردگی را کاهش

می‌دهد (۱۲). یکی از عناصر مهمی که اثرات مفید فعالیت ورزشی را بر مغز القاء می‌کند، کاهش بار Tau می‌باشد. نتایج مطالعات درباره تغییرات پروتئین Tau و عوامل دخیل در پاک سازی آن به دنبال تمرین ورزشی، متناقض است (۱۳). به علاوه، دویدن روی نوارگردان با افزایش یوبیکوئیتین لیگاز $E3^5$ ، باعث کاهش $A\beta$ و کاهش هایپرفسپوریلایسون Tau از طریق فعالیت مسیر پیام‌رسانی فسفوانیزیتول ۳-کیناز^۶ ($PI3K/Akt$) می‌گردد (۱۴). همچنین، بیان شده است که فعالیت ورزشی، روزه داری و محدودیت کالریک^۷، اثرات مفید مشترکی بر متابولیسم انرژی و مسیرهای سیگنالینگ دارند؛ به طوری که هر سه می‌توانند تغییر متابولیسمی از گلوکز به اجسام کتونی به عنوان منبع سوخت سلولی طی هایپوگلیسمی را القاء کنند (۱۵، ۱۶). به علاوه، گزارش شده است مصرف کالریک بالا ممکن است منجر به تخریب عصبی ناشی از بیماری آلزایمر شود (۱۷) و در عین حال، شواهد تجربی به شدت از این فرضیه حمایت می‌کند که محدودیت کالریک از آن جلوگیری می‌نماید (۱۸). در همین راستا گزارش شده است که محدودیت کالریک، رسوب $A\beta$ را در چندین مدل رت مبتلا به آلزایمر کاهش داده است (۱۹). همچنین بیان شده است علاوه بر کاهش حجم و اندازه پلاک، وسعت واکنش ایمنی اطراف پلاک‌های $A\beta$ به طور قابل توجهی طی محدودیت کالریک کاهش می‌یابد و با کاهش تعداد آستروسیت‌ها (سلول‌های پروتئین اسیدی فیبریلاری گلیال^۸ یا GFAP مثبت) همراه است (۲۰). با این وجود، در یک مطالعه نشان داده شده است که مدت زمان محدودیت کالریک در بازه زمانی چهار یا ۳۶ هفته، اثر متفاوتی بر وسعت پلاک‌های $A\beta$ دارد (۱۹). همچنین، کانگ و چو^۹ (۲۰۱۴) نشان دادند شش هفته دویدن روی نوارگردان می‌تواند سطوح APP در مغز رت‌های آلزایمری را کاهش دهد (۲۱). لیو^{۱۰} و دیگران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که پنج ماه دویدن روی نوارگردان، اثر مهاری بر $A\beta$ دارد (۲۲) و کانگ و دیگران (۲۰۱۳) نیز اثر مشابهی بر $A\beta$ را طی ۱۲ هفته دویدن روی نوارگردان نشان داده‌اند (۲۳). به علاوه، یعقوبی و دیگران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تمرین تداومی بدون توجه به

1. Amyloid beta

2. Tau proteins

3. Amyloid-beta precursor protein

4. Beta secretase 1

5. Ubiquitin-protein ligase E3

6. Phosphatidylinositol 3-kinase (AKT/ PI3K)

7. Calorie restriction

8. Serum glial fibrillary acidic protein

9. Kang & Cho

10. Liu

۱۲ ساعته با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته و سازگاری با محیط آزمایشگاه، وزن بدن توسط ترازوی آزمایشگاهی دیجیتال سانلی^۲ (مدل 8p، ایران) به منظور دریافت دوز مناسب تغذیه روزانه ثبت می‌شد. این مطالعه طبق مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد با کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1402.058 IR.IAU.BOJNOURD. REC.1401.006 انجام شد.

نحوه اعمال محدودیت کالریک: رت‌ها با غذای ویژه حیوانات (شرکت جوانه خراسان) و آب مورد نیاز، به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی تغذیه شدند. روزانه به ازای هر سر رت، ۱۰ گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن حیوان، غذای مخصوص در نظر گرفته شد؛ به گونه ای که در گروه محدودیت کالریک، روزانه ۳۰ درصد این مقدار از حجم غذای دریافتی کسر گردید (جدول یک). به عبارت دیگر، محدودیت کالریک بعد از بررسی تغذیه رت‌ها به مدت چهار هفته، ابتدا با کاهش ۳۰ درصد و سپس ۲۰ درصد در غذای مصرفی اعمال شد.

شدت تمرین (پایین و بالا)، باعث کاهش سطوح $A\beta_{42}$ در هیپوکامپ رت‌های آلزایمری می‌گردد (۲۴). با این حال، با توجه به روند رو به رشد سالمندی و ارتباط کم تحرکی با ابتلای به بیماری آلزایمر، و این موضوع که تاکنون پژوهشی به مقایسه اثر توام تمرین تداومی با و بدون محدودیت کالریک، بر بیان ژن‌های Tau و APP در رت‌های نر سالمند نپرداخته است؛ پژوهش حاضر به اجرا درآمد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، ۳۶ سررت نر سالمند نژاد ویستار با ۲۶ ماه سن (سنگوپتا، ۲۰۱۳) و میانگین وزنی $41/3 \pm$ گرم، مورد مطالعه قرار گرفتند. رت‌ها در چهار گروه مستقل با تعداد برابر نه سر تقسیم شدند؛ اما در انتهای تحقیق تعداد نمونه گروه کنترل ($n=9$)، گروه تمرین تداومی ($n=8$)، گروه تمرین تداومی با محدودیت کالریک ($n=9$) و گروه محدودیت کالریک ($n=7$) بود. حیوانات در قفس‌های مخصوص (پلی کربنات به ابعاد $47 \times 27 \times 20$ سانتی متر) و ساخته شده توسط شرکت دارستان صنعت نیکان-ایران و شرایط آزمایشگاهی یکسان و تحت چرخه روشنایی-تاریکی

جدول ۱. ترکیب شیمیایی خوراک رت شرکت جوانه خراسان

واحد	غلظت	ترکیب شیمیایی
ماده خشک (درصد)	۱۹/۶	پروتئین
کیلوکالریک/کیلوگرم	۲۵۰۰	انرژی قابل متابولیسم
ماده خشک (درصد)	۵/۴۸	فیبر خام
ماده خشک (درصد)	۳/۰۵	چربی خام
ماده خشک (درصد)	۰/۴۸	کلسیم
ماده خشک (درصد)	۰/۳۸	فسفر
ماده خشک (درصد)	۰/۳۹	متیونین
ماده خشک (درصد)	۱/۱۴	لیزین

در هفته و به مدت پنج دقیقه در هر جلسه (در مجموع ۶۰ دقیقه طی دو هفته) با سرعت پایین (کمتر از شش متر بر دقیقه) اجرا شد. پروتکل تمرینی شامل گرم کردن به مدت پنج دقیقه به شکل دویدن بر روی نوارگردان با شدت ۱۰ متر بر دقیقه، و ۵ دقیقه سرد کردن با همین شدت بود (جدول دو) (۲۶). تمرین اصلی با ۱۰ دقیقه دویدن با سرعت ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول شروع و با زمان ۴۰ دقیقه با سرعت ۶۰ درصد سرعت

نحوه اجرای پروتکل تمرینی: پروتکل تمرینی برای گروه‌های تمرینی، به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته اجرا شد. مدت زمان اجرای جلسات تمرینی در هفته اول، ۱۰ دقیقه؛ در هفته‌های دوم الی چهارم، ۱۵ دقیقه؛ و در هفته‌های پنجم الی ششم، ۴۰ دقیقه بود. همچنین، جهت آشنایی با پروتکل تمرینی و خارج کردن رت‌هایی که قادر به انجام تمرین نبودند، یک فرآیند آماده سازی اولیه دو هفته‌ای پیش از اجرای پروتکل اصلی، پنج جلسه

بیشینه جدید اندازه گیری شده در هفته سوم، پایان یافت. گروه کنترل نیز روزانه و همزمان با گروه تمرین به مدت ده دقیقه روی نوارگردان بدون حرکت قرار گرفتند. تمرین در چرخه تاریکی رت‌ها انجام شد (پروتکل تمرینی در جدول دو ارائه شده است).

جدول ۲. پروتکل تمرینی گروه‌های تجربی

هفته‌ها	تواتر تمرین (جلسه در هفته)	مدت زمان هر جلسه	شدت تمرین
اول	۵	۱۰ دقیقه (هر جلسه یک دقیقه اضافه شد)	۲۰ متر بر دقیقه (معادل ۶۰ درصد سرعت بیشینه)
دوم	۵	۱۵ دقیقه (هر جلسه یک دقیقه اضافه شد)	۲۰ متر بر دقیقه (معادل ۶۰ درصد سرعت بیشینه)
سوم	۵	۲۰ دقیقه	۶۰ درصد سرعت بیشینه جدید
چهارم	۵	۲۰ دقیقه (هر جلسه یک دقیقه اضافه شد)	۶۰ درصد سرعت بیشینه جدید
پنجم	۵	۲۵ دقیقه (هر جلسه یک دقیقه اضافه شد)	۶۰ درصد سرعت بیشینه جدید
ششم	۵	۴۰ دقیقه (هر جلسه دو دقیقه اضافه شد)	۶۰ درصد سرعت بیشینه جدید

دستگاه ترموسایکلر^۲ تحت چرخه‌های حرارتی به ترتیب در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت و دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه قرار گرفت. **اجرای روش Real-time PCR:** پس از ساخت cDNA، روش زمان واقعی PCR مطابق روش سایبرگرین^۴ انجام پذیرفت. روش زمان واقعی PCR برای ژن هدف به صورت دوتایی انجام شد. ساخت میکس لازم جهت انجام روش زمان واقعی PCR با حجمی برابر ۲۰ میکرو لیتر برای هر نمونه در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها جهت انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر MICPCR (مدل MIC، کشور استرالیا) قرار داده شدند. به علاوه، از RNA پلیمراز به عنوان ژن کنترل جهت تعیین بیان ژن هدف استفاده شد. CT‌های مربوط با روش RT-PCR توسط نرم افزار دستگاه ثبت گردید و جهت کمی‌سازی بیان ژن مورد نظر از روش مقایسه ای استفاده شد. پرایمر ژن‌های مورد استفاده در جدول سه آورده شده است. به علاوه، سطوح انسولین با استفاده از کیت تجاری مقادیر انسولین اندازه گیری شد و توسط مدل هموستازی میزان مقاومت انسولین ارزیابی گردید.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS ورژن ۲۲ انجام گرفت. بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها با توجه به

نمونه برداری و ارزیابی آزمایشگاهی: در این مطالعه، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، حیوانات با ترکیبی از ۹۰ میلی گرم کتامین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و ۱۰ میلی گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، بی‌هوش شدند. سپس، سر حیوان توسط گیوتین جدا گردید و استخوان جمجمه شکافته شد. پس از آن، بخش مناسبی از بافت مغز جدا و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و برای تجزیه و تحلیل آتی، به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد، برای اجرای سنجش آزمایشگاهی مورد نظر منتقل شد. برای سنجش میزان بیان ژن‌های APP و Tau از روش زمان واقعی PCR^۱ استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: در تحقیق حاضر، طبق راهنمای کیت استخراج RNA شرکت پارس توس، با استفاده از ۲۰ الی ۴۰ میلی گرم از بافت مغز رت‌ها استخراج انجام شد. همچنین، جهت ساخت cDNA از کیت Easy™ cDNA Synthesis Kit (#A101161) مربوط به شرکت پارس توس استفاده شد که از روی RNA استخراج شده، با استفاده از روش هگزامر پرایمر تصادفی^۲، cDNA نمونه‌های بافتی ایجاد شد. پروتکل ساخت cDNA بدین صورت بود که نمونه مورد نظر مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس در

1. Real time- polymerase chain reaction

3. Thermocycler

2. Random hexamer primer

4. SYBR Green

جدول ۳. پرایمرهای ژن مورد مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر
APP	Forward primer: 5-AACATGTGCGCATGGTGA-3 Reverse primer: 5-CACGGCAGGGACGTTGTAGA-3
TAu	Forward primer: 5-CCTGAGCAAGGTGACCTCCAAG-3 Reverse primer: 5-CAAGGAGCCAATCTTCGACTGG-3
GAPDH	Forward primer: 5-GTTGTGGATCTGACATGCCG-3 Reverse primer: 5-CCTCAGTGTAGCCAGGATG-3

اندازه نمونه توسط آزمون شاپیرو - ویلک^۱ انجام شد. برای

تحلیل نتایج بین گروهی از آزمون آنالیز واریانس یکراهه (ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی^۲ در سطح معنی داری $p \leq 0.05$ استفاده گردید.

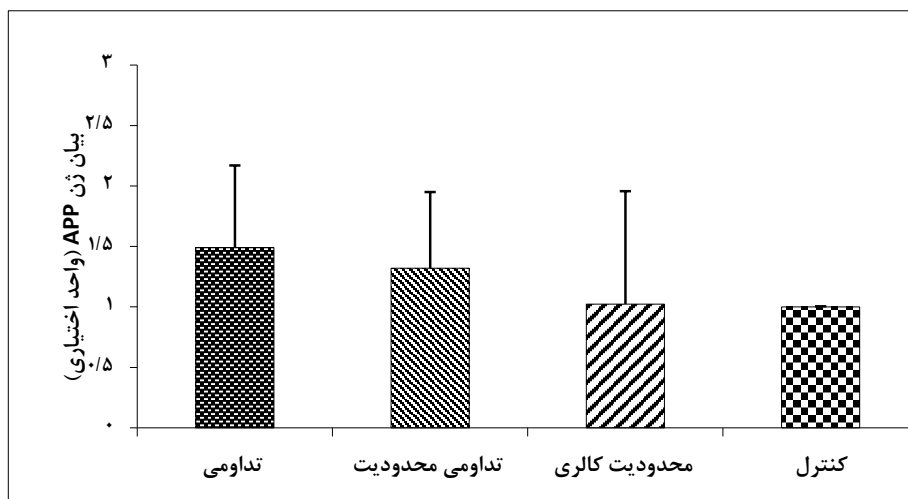
جدول ۴. تغییرات بیان ژن پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا (APP) و ژن تائو (Tau) و مقاومت انسولین رت‌های سالمند نر پس از مداخله

متغیرها	گروه‌ها	میانگین $\pm$ انحراف معیار	آماره F	سطح معنی داری
APP (واحد اختیاری)	تداومی	$1/49 \pm 0/70$	1/15	0/35
	تداومی محدودیت	$1/32 \pm 0/64$		
	محدودیت کالریک	$1/02 \pm 0/93$		
	کنترل	$1/00 \pm 0/01$		
Tau (واحد اختیاری)	تداومی	$2/65 \pm 1/89$	3/75	0/02*
	تداومی محدودیت	$2/48 \pm 1/19$		
	محدودیت کالریک	$1/21 \pm 1/32$		
	کنترل	$1/00 \pm 0/01$		
گلوکز خون (میلی گرم بر دسی لیتر)	گروه تداومی	$287/2 \pm 37/5$	0/19	0/89
	تداومی محدودیت	$275/6 \pm 36/6$		
	محدودیت کالریک	$275/5 \pm 60/3$		
	کنترل	$291/7 \pm 68/2$		
انسولین خون (پیکو مول / لیتر)	تداومی	$289/44 \pm 35/72$	0/46	0/68
	تداومی محدودیت	$275/66 \pm 36/80$		
	محدودیت کالریک	$287/66 \pm 59/60$		
	کنترل	$291/22 \pm 68/24$		
مقاومت به انسولین	تداومی	$9/51 \pm 0/8$	1/24	0/29
	تداومی محدودیت	$9/37 \pm 0/6$		
	محدودیت کالریک	$8/77 \pm 0/79$		
	کنترل	$8/85 \pm 1/3$		

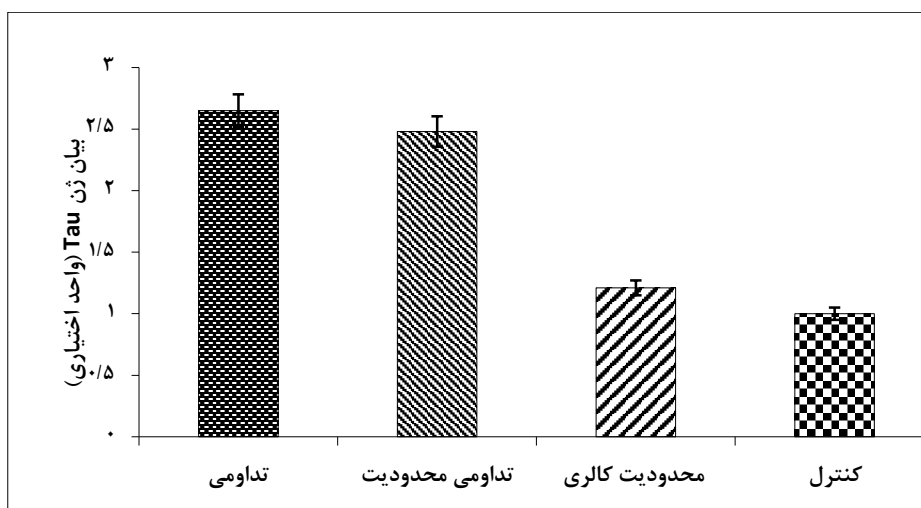
*نشانه تفاوت معنی دار بین گروه‌ها در سطح $p < 0.05$.

بصورت دو به دو، تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p = 0/99$) بین گروه‌های تمرین تداومی - محدودیت کالریک؛ $p = 0/14$ بین گروه‌های تمرین تداومی و محدودیت کالریک؛ $p = 0/06$ بین گروه‌های تمرین تداومی و کنترل؛ $p = 0/2$ بین گروه تداومی-محدودیت کالریک و محدودیت کالریک؛ $p = 0/08$

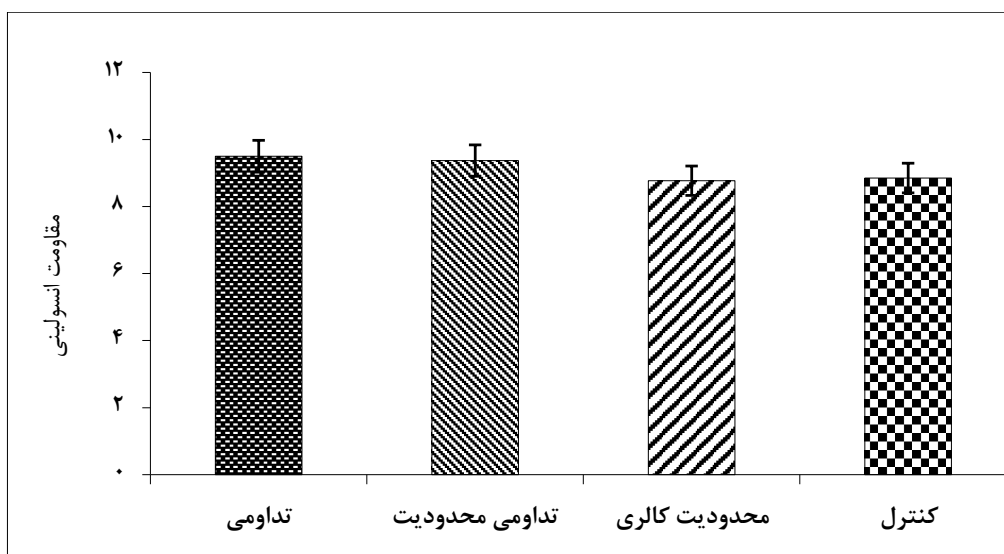
با توجه به جدول چهار، نتایج حاکی از آن است که تفاوت معنی داری بین چهار گروه مورد بررسی در بیان ژن APP در بافت مغز رت‌های نر سالمند وجود ندارد ($F = 0/83$ ، $p = 0/48$)؛ اما بیان ژن Tau بین گروه‌های مطالعه تفاوت معنی داری داشت ($p = 0/02$). با این حال، بین گروه‌ها



شکل ۱. مقایسه بیان ژن APP در گروه‌های مورد مطالعه



شکل ۲. مقایسه بیان Tau در گروه‌های مورد مطالعه



شکل ۳. مقایسه تغییرات مقاومت به انسولین در گروه‌های مورد مطالعه

می‌تواند فعالیت mTORC1 را کاهش دهد. این کاهش در فعالیت mTORC1 پس از دویدن ممکن است نتیجه فعال شدن AMPK باشد (۲۸). بنابراین، می‌توان گفت که در حال حاضر شواهدی وجود دارند مبنی بر اینکه تمرینات ورزشی، یک عامل مهم در برابر روند سالمندی و بیماری‌های تحلیل برنده عصبی ناشی از آن می‌باشد (۲۹). به علاوه، در خصوص مکانیسم اثرگذاری محدودیت کالریک بر بیماری آلزایمر، بیان شده است که این محدودیت قادر به القای اتوفازی به عنوان یک مکانیسم کاتابولیکی است که به تجزیه پروتئین‌های انباشته شده، از جمله $A\beta$ منجر می‌گردد. این مسیر پردازش با انتقال پروتئین وابسته به اتوفازی^۶ (Atg LC3BII) همراه با سکوستوزوم^۷ (p62) به غشای اتوفازوزوم مشخص می‌شود که معمولاً به عنوان نشانگر تشکیل اتوفازوزوم از آن یاد می‌شود (۱۹). به علاوه، نتایج پژوهش حاضر در رابطه با APP با یافته‌های ژو^۸ و دیگران (۲۰۱۳) همخوانی دارد. آنها نشان دادند که شش هفته دویدن آزادانه به صورت روزانه و به مدت دو ساعت روی دستگاه چرخ آزمون اختیاری، اثری بر $A\beta$ ، بتاسکرتاز و گاماسکرتاز موش‌های دارای آلزایمر خفیف تا متوسط ندارد (۱۴). با این حال، نتایج تحقیق با یافته‌های کانگ و چو (۲۰۱۴)، لیو و دیگران (۲۰۱۳)، کانگ و دیگران (۲۰۱۳) و یعقوبی و دیگران (۲۰۱۶) ناهمخوان است (۲۱-۲۴). به طور کلی به نظر می‌رسد مدت پروتکل تمرینی و بویژه مدت زمان اعمال محدودیت کالریک، جزء عوامل اصلی وجود تفاوت در مطالعه حاضر و مطالعات پیشین است. در این راستا، کانگ و چو (۲۰۱۴) نشان دادند شش هفته دویدن روی نوارگردان به مدت ۳۰ دقیقه و پنج جلسه در هفته، سطح APP در مغز رت‌های آلزایمری را کاهش می‌دهد (۲۱). هم‌چنین لیو و دیگران (۲۰۱۳) نشان دادند که تمرین می‌تواند از طریق اثر مهار بر سطح $A\beta$ ، به عنوان راهکار درمانی برای آلزایمر مطرح باشد (۲۲). کانگ و دیگران (۲۰۱۳) نیز بیان داشتند که ۱۲ هفته دویدن روی نوارگردان، تجمع $A\beta$ را از طریق مهار فعالیت بتاسکرتاز و فراورده‌های آن، کاهش می‌دهد (۲۳). هم‌چنین یعقوبی

بین گروه‌های تمرین تداومی-محدودیت کالریک و کنترل؛ و نهایتاً $p=0/98$ بین گروه‌های محدودیت کالریک و کنترل (شکل دو). سایر نتایج نشان داد که بین اثر تمرین تداومی با و بدون محدودیت کالریک، بر سطح مقاومت به انسولین در رت‌های نر سالمند تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p=0/9$ ، $F=3/67$ ، شکل سه).

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تمرین تداومی با و بدون محدودیت کالریک بر بیان ژن APP در رت‌های نر سالمند اثر معنی داری ندارد. به طور کلی، انجام فعالیت جسمانی و تغییرات در رژیم غذایی می‌تواند به کاهش تاثیر منفی سالمندی بر عملکرد شناختی کمک کند. داده‌های اخیر نشان می‌دهد که فعالیت جسمانی و محدودیت کالریک می‌تواند تغییرات مربوط به سالمندی در انتقال سیناپسی را بهبود بخشد و کاهش وابسته به سن در شکل‌پذیری سیناپسی در نورون‌های نئوکورتیکال^۹ را کاهش دهد (۲۰). در خصوص مکانیسم اثربخشی فعالیت ورزشی می‌توان به دو مسیر ویژه نظیر کاهش استرس اکسایشی از طریق بهبود ظرفیت ضد اکسایشی و هم‌چنین بقای سلولی، از طریق اتوفازی و آپوپتوزیس اشاره کرد (۱۶). در این راستا، می‌توان ادعان داشت که فعالیت ورزشی هوازی با شدت بالا نیز می‌تواند فوایدی را به همراه داشته باشد. این مزایا شامل فعال شدن پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات^{۱۵} (AMPK)، سیرتوئین‌ها^۲ (SIRT) و افزایش در عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز^۳ (BDNF) است (۱۶، ۲۷). در خصوص اثر فعالیت ورزشی بر جلوگیری از افزایش پلاک‌های آمیلوئیدی، بیان شده است که مسیر پیام‌رسانی هدف پستانداران راپامایسین^۴ (mTOR) به دلیل تاثیر بر AMPK توسط فعالیت ورزشی، محدودیت کالریک و روزه‌داری مهار می‌شود. در حالی که فعالیت ورزشی پتانسیل افزایش فعال سازی mTOR را به دلیل فعال شدن Akt دارد، جدای از افزایش فعالیت مجموعه هدف پستانداران راپامایسین نوع یک^۵ (mTORC1)، در حین دویدن، مقادیر بالای استرس متابولیک ناشی از فعالیت ورزشی استقامتی

1. 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase

2. Sirtuin

3. Brain-derived neurotrophic factor

4. Mammalian target of rapamycin

5. Mammalian target of rapamycin complex 1

6. Autophagy-related (ATG) protein LC3BII

7. Sequestosom-1

8. Xu

9. Ubiquitin-proteasome

فسفوریل‌اسیون گلیکوژن سنتتاز^۵ (GS) و نهایتاً غیرفعال کردن آن بیان شده بود، با این حال، بعدها، تعداد زیادی از مطالعات نشان داد GSK-3 نیز می‌تواند پروتئین Tau را فسفریله کند (۳۸، ۳۹). GSK-3 β در تغییرات پاتولوژیک پروتئین Tau در بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد (۴۰-۴۲). با این حال، اختلال عملکرد این مسیر سیگنالینگ، فعالیت GSK-3 β را افزایش می‌دهد و به فسفوریل‌اسیون بیش از حد پروتئین Tau منجر می‌شود. احتمالاً ترکیبی از فعالیت ورزشی و محدودیت کالریک که بتواند باعث کاهش در انسولین گردد، و در پیشگیری از بیماری آلزایمر نقش مثبتی را ایفا نماید، هر چند که به مطالعات بیشتری جهت تایید این فرضیه نیاز است (۱۶). همچنین، در خصوص ارتباط بین ژن‌های منتخب و تغییرات انسولین به عنوان یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر بیماری آلزایمر، لیو^۶ و دیگران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای با انجام کالبد شکافی در بیماران مبتلا به دیابت و آلزایمر نشان دادند که سطح و فعالیت مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt^۷ در قشر پیشانی آنها به مقدار زیادی کاهش یافته بود و مقدار زیادی از GSK-3 β فسفریله شده و پروتئین‌های هایپرفسفریله Tau غیرطبیعی زیادی قابل مشاهده شده است (۴۳). جالب توجه است که نقایص این مسیر سیگنال در افرادی که از هر دو بیماری دیابت و آلزایمر رنج می‌برند، شدیدتر بود. آنها نتیجه گرفتند که فعال شدن بیش از حد GSK-3 β با هایپر فسفوریل‌اسیون Tau ارتباط نزدیکی دارد و مهار بیان آن، هایپر فسفوریل‌اسیون Tau و در نتیجه پیشرفت بیماری آلزایمر را کاهش می‌دهد. یکی از مکانیزم‌هایی که باعث هایپرفسفریله شدن پروتئین Tau می‌شود کاهش سوخت و ساز گلوکز در مغز به دلیل کمبود انتقال دهنده گلوکز نوع ۳^۸ (Glut3) می‌باشد که خود منجر به کاهش جریان مسیر بیوسنتز هگزوز آمین^۹ و سپس کاهش تولید اوریدین دی فسفات β -N استیل گلوکز آمین^{۱۰} (Glc-NAC) در نورون می‌شود. این روش باعث کاهش پروتئین Tau می‌شود که به وسیله آنزیم N-استیل گلوکز آمین ترانسفراز متصل به O^{۱۱} (OGT) کاتالیز می‌شود. تنظیم فعالیت این مسیر به وسیله یوریدین دی فسفات-ان

و دیگران (۲۰۱۶) با بررسی تأثیر هشت هفته دویدن روی نوارگردان با دو شدت پایین و بالا به مدت ۶۰ دقیقه در هر جلسه و پنج جلسه در هفته بر رت‌های صحرایی آلزایمری شده، عنوان داشتند که تمرین مداومی فارغ از شدت تمرین (پایین و بالا)؛ باعث کاهش سطح A β 42 هیپوکامپ رت‌های آلزایمری، می‌گردد. در خصوص سازوکار اثرگذاری دویدن بر تغییرات ژن‌های Tau و A β ، نشان داده شده است که دویدن از طریق افزایش فعالیت مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt همراه با افزایش سطوح فسفوریل‌اسیون PI3K و Akt، و تنظیم افزایشی بیان HSP70، منجر به افزایش محافظت عصبی می‌گردد (۲۴). در این راستا، از جمله محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم محاسبه اکسیژن مصرفی و تعیین شدت تمرین بر اساس آن را عنوان نمود. به علاوه، طی بیماری آلزایمر افزایش در تجمع پروتئین‌های Tau و A β با اختلال در سیستم یوبیکوتین-پروتئازوم^{۱۲} همراه است و گزارش شده است دویدن از طریق افزایش یوبیکوتین لیزاز E3 و کاهش بتاسکرتاز نوع یک، باعث بهبود عملکرد سیستم یوبیکوتین-پروتئازوم و در نتیجه کاهش بیان ژن‌های Tau و A β می‌گردد (۱۴). یکی از عوامل اصلی ایجادکننده آلزایمر، تشکیل پلاک‌های متشکل از پپتید A β می‌باشد (۳۰). علاوه بر این، سوجکوا^{۱۳} و دیگران (۲۰۱۱) در یک مطالعه طولی به مدت یک و نیم سال نشان دادند که رسوب پلاک‌های A β مغز به صورت وابسته به سن، در طی دوره تحقیق، حتی در سالمندان بدون علامت آلزایمر نیز افزایش می‌یابد (۳۱).

به علاوه، نتایج تحقیق حاضر در مورد مقایسه اثر تمرین مداومی با و بدون محدودیت کالریک بر بیان ژن Tau در رت‌های نر سالمند نشان داد که بین چهارگروه مورد مطالعه در بیان ژن Tau تفاوت معنی داری وجود ندارد. این نتایج با یافته‌های تحقیق فلاح محمدی و دیگران (۲۰۱۲) و لیانگ^{۱۴} و دیگران (۲۰۱۰) هم‌خوانی دارد (۳۲، ۳۳)؛ اما با نتایج کیم^{۱۵} و دیگران (۲۰۱۵)، کانگ و دیگران (۲۰۱۴)، کیم و دیگران (۲۰۱۴)، کیم و دیگران (۲۰۱۹) در تضاد است (۳۴-۳۷). در ابتدا عملکرد گلیکوژن سنتتاز کیناز نوع ۳ بتا^{۱۶} (GSK-3 β) تنها

1. Sojkova

2. Liang

3. Kim

4. Glycogen synthase kinase 3 β

5. Glycogen synthase

6. Liu

7. Akt strain transforming/ phosphatidylinositol

3-kinase

8. Glucose transporters 3

9. Hexosamine

10. N-acetyl glucosamine

11. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase

کاهش ۳۰ درصدی و سپس ۲۰ درصد کاهش در غذای مصرفی) همراه با تمرین تداومی به مدت شش هفته، سبب تغییر معنی‌دار در بیان ژن Tau بیان ژن APP و سطوح انسولین بافت مغز رت‌های نر سالمند نشد. برای درک بهتر سازوکار فعالیت ژن‌های درگیر در بروز بیماری آلزایمر بهتر است مطالعات بیشتری با در نظرگیری متغیرهای تمرینی و محدودیت کالریک و همچنین، بررسی ژن‌های مرتبط انجام گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافی در مقاله حاضر وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از رساله‌ی دکتری مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد است.

استیل گلوکوزامین^۱ (GlcNAc- UDP) درون سلولی انجام می‌گیرد. به دلیل این‌که فسفریله شدن پروتئین Tau به شکل معکوس به وسیله استیلاسیون GlcNAc تنظیم می‌شود، کاهش مولکول GlcNAc به همراه تنظیم کاهشی پروتئین فسفاتاز 2A^۲ (p-2A) باعث هاپر فسفریله شدن غیر طبیعی پروتئین Tau و در نهایت تحلیل عصبی و تشکیل تجمعات نوروفیبریلی می‌شود (۴۴). از سوی دیگر، فعالیت GSK-3 از راه کاهش انسولین یا افزایش تولید Aβ تنظیم افزایشی می‌شود. GSK-3β در هاپر فسفوریلایسیون غیر طبیعی پروتئین Tau در مغز بیماران با تخریب بافت عصبی از همه مهم‌تر است (۴۵). GSK-3β غیرطبیعی در بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات روانی، سکته‌های مغزی آسیب‌های ضربه‌ای به سر و به ویژه دیابت نوع دو مشارکت دارد (۴۶). نتیجه‌گیری: ترکیبی از محدودیت کالریک (در ابتدا با

منابع

1. Nisbet RM, Polanco J-C, Lttner LM, Götz J. Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. *Acta Neuropathologica*. 2015;129:207-20. <https://dx.doi.org/10.1007/s00401-014-1371-2>.
2. Goodarzi F, Nikbakht H, Abednatanzi H, Ebrahim K, Ghazaliyan F. Aerobic and resistance training on some oxidative markers and TGF-β in cardiac tissue of elderly rats. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2020; 27(3): 93-100. [In Persian].
3. Kumar A, Sidhu J, Lui F, Tsao JW. Alzheimer disease. *StatPearls* [internet]: StatPearls Publishing; 2024.
4. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(4):329-44. <https://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0909142>.
5. Abraki SB, Chavoshi-Nezhad S. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease. *Te Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2014;2(1):85-94. [In Persian].
6. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid-β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*. 2009;12(12):1567-76. <https://dx.doi.org/10.1038/nn.2433>
7. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid β-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43(5):658-77. <https://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037>
8. Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*. 2015;130:1-19. <https://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>

1. Uridine-diphosphate-N-acetylglucosamine

2. Protein phosphatase 2 A

9. Sędzikowska A, Szablewski L. Insulin and insulin resistance in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(18):9987. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22189987>.
10. Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012;414:171-8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.013>.
11. Cai H, Cong W-n, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Current Alzheimer Research*. 2012;9(1):5-17. <https://dx.doi.org/10.2174/156720512799015064>.
12. Van Dyck CH. Anti-amyloid- β monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: pitfalls and promise. *Biological Psychiatry*. 2018;83(4):311-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.010>.
13. Moazzami M, Yaghoubi A. Effect of Eight-Weeks of Resistance Training on Serum Levels of Neurofilament Light Chain and Tau Protein in Women with Multiple Sclerosis. *Medical Laboratory Journal*. 2021;15(4):33-8. [In Persian].
14. Xu L, Li M, Wei A, Yang M, Li C, Liu R, et al. Treadmill exercise promotes E3 ubiquitin ligase to remove amyloid β and P-Tau and improve cognitive ability in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2022;19(1):243. <https://dx.doi.org/10.1186/s12974-022-02607-7>.
15. Mattson MP, Moehl K, Ghena N, Schmaedick M, Cheng A. "Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health": Publisher Correction. 2020. <https://dx.doi.org/10.1038/s41583-020-0342-y>.
16. Mayor E. Neurotrophic effects of intermittent fasting, calorie restriction and exercise: a review and annotated bibliography. *Frontiers in Aging*. 2023;4:1161814. <https://dx.doi.org/10.3389/fragi.2023.1161814>.
17. Hu N, Yu J-T, Tan L, Wang Y-L, Sun L, Tan L. Nutrition and the Risk of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 2013;2013(1):524820. <https://doi.org/10.1155/2013/524820>.
18. de Carvalho TS. Calorie restriction or dietary restriction: how far they can protect the brain against neurodegenerative diseases? *Neural Regeneration Research*. 2022;17(8):1640-4. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332126>.
19. Müller L, Power Guerra N, Stenzel J, Rühlmann C, Lindner T, Krause BJ, et al. Long-term caloric restriction attenuates β -amyloid neuropathology and is accompanied by autophagy in APP^{swe}/PS1^{delta9} mice. *Nutrients*. 2021;13(3):985. <https://dx.doi.org/10.3390/nu13030985>.
20. Lalo U, Pankratov Y. Astrocytes as Perspective Targets of Exercise-and Caloric Restriction-Mimetics. *Neurochemical Research*. 2021;46(10):2746-59. <https://dx.doi.org/10.1007/s11064-021-03277-2>.
21. Kang EB, Cho JY. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and β -amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 2014;18(1):89. <https://dx.doi.org/10.5717/jenb.2014.18.1.89>.
22. Liu H-l, Zhao G, Zhang H, Shi L-d. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behavioural Brain Research*. 2013;256:261-72. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.008>.

23. Kang E-B, Kwon I-S, Koo J-H, Kim E-J, Kim C-H, Lee J, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during A β -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis*. 2013;18:1332-47. <https://dx.doi.org/10.1007/s10495-013-0884-9>.
24. Yaghoubi A, Saghebjo M, Fallah Mohammadi Z, Hedayati M, Hajizadeh Moghaddam A. Effects of continuous training intensity on amyloid beta1-42 (A β 1-42) levels in hippocampus of homocysteine-induced Alzheimer's Model rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2016;18(11):83-93. [In Persian].
25. Farahpour MR, Sheikh S, Kafshdooz E, Sonboli A. Accelerative effect of topical Zataria multiflora essential oil against infected wound model by modulating inflammation, angiogenesis, and collagen biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*. 2021;59(1):1-10. <https://dx.doi.org/10.1080/13880209.2020.1861029>.
26. Salvatore MF, Soto I, Kasanga EA, James R, Shifflet MK, Doshier K, et al. Establishing equivalent aerobic exercise parameters between early-stage Parkinson's disease and Pink1 knockout rats. *Journal of Parkinson's Disease*. 2022;12(6):1897-915. <https://dx.doi.org/10.3233/JPD-223157>.
27. Radak Z, Suzuki K, Posa A, Petrovsky Z, Koltai E, Boldogh I. The systemic role of SIRT1 in exercise mediated adaptation. *Redox Biology*. 2020;35:101467. <https://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2020.101467>.
28. Zhao Y, Jia M, Chen W, Liu Z. The neuroprotective effects of intermittent fasting on brain aging and neurodegenerative diseases via regulating mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022;182:206-18. <https://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.021>.
29. Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a narrative review. *Journal of Clinical Neurology*. 2015;11(3):212-9. <https://dx.doi.org/10.3988/jcn.2015.11.3.212>.
30. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease--Genotypes, Phenotype, and Treatments. *Science*. 1997;275(5300):630-1. <https://dx.doi.org/10.1126/science.275.5300.630>.
31. Sojkova J, Zhou Y, An Y, Kraut MA, Ferrucci L, Wong DF, Resnick SM. Longitudinal patterns of β -amyloid deposition in nondemented older adults. *Archives of Neurology*. 2011;68(5):644-9. <https://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.77>.
32. Mohammadi ZF, Khezri A, Ebrahimzadeh M. The effects of voluntary exercise on a running wheel and allium paradoxum on Tau protein in the cerebellum of diabetic rats. *Journal of Isfahan Medical School*. 2012;30(185). [In Persian].
33. Liang KY, Mintun MA, Fagan AM, Goate AM, Bugg JM, Holtzman DM, et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Annals of Neurology*. 2010;68(3):311-8. <https://dx.doi.org/10.1002/ana.22096>.
34. Kim D-Y, Jung S-Y, Kim T-W, Lee K-S, Kim K. Treadmill exercise decreases incidence of Alzheimer's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3 β expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 2015;11(2):87. <https://dx.doi.org/10.12965/jer.150198>.
35. Kim B-K, Shin M-S, Kim C-J, Baek S-B, Ko Y-C, Kim Y-P. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 2014;10(1):2. <https://>

[dx.doi.org/10.12965/jer.140086](https://doi.org/10.12965/jer.140086).

36. Kim H-B, Jang M-H, Shin M-C, Lim B-V, Kim Y-P, Kim K-J, et al. Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2003;17(1):29-33. [https://dx.doi.org/10.1016/s1056-8727\(02\)00186-1](https://dx.doi.org/10.1016/s1056-8727(02)00186-1).
37. Kim T-W, Shin M-S, Park J-K, Shin M-A, Lee H-H, Lee S-J. Treadmill exercise alleviates prenatal noise stress-induced impairment of spatial learning ability through enhancing hippocampal neurogenesis in rat pups. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 2013;9(5):451. <https://doi.org/10.12965/jer.130064>.
38. Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;33(s1):S141-4. <https://doi.org/10.3233/jad-2012-129025>.
39. Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH. Brain proline-directed protein kinase phosphorylates Tau on sites that are abnormally phosphorylated in Tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(31):23512-8. [https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49492-1](https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49492-1).
40. Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(11):660-71. <https://dx.doi.org/10.1038/nrn4019>.
41. Pei J-J, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1999;58(9):1010-9. <https://dx.doi.org/10.1097/00005072-199909000-00011>.
42. Zhang Y, Zhang Z, Wang H, Cai N, Zhou S, Zhao Y, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment induced by isoflurane anesthesia in aged rats via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects mediated by the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(3):2778-84. <https://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5556>.
43. Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of Pathology*. 2011;225(1):54-62. <https://doi.org/10.1002/path.2912>.
44. Szablewski L. Brain glucose transporters: role in pathogenesis and potential targets for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(15):8142. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22158142>.
45. Liu SJ, Wang JZ. Alzheimer-like Tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2002;23(2):183-7.
46. Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry*. 2004;89(6):1313-7. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02422.x>.