Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Rostami, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2022;43(6):543-553
doi: 10.34172/mj.2022.007
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

The effects of combined training and activity in an enriched environment on the brain BDNF and VEGF protein levels in the pre-pubertal male rats

Samira Rostami, Milad Esmailyanmaleki, Parham Kargarfard, Rana Fayazmilani*

Department of Biological Sciences in Sport, Faculty of Sport Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 2 Mar 2021
Accepted: 11 Apr 2021
ePublished: 12 Jan 2022

Keywords:
Enriched Environment, Pre-Pubertal Period, Neurotrophic Factors, Combined Training, Brain Plasticity

Abstract

Background. Neurotrophic factors play an important role in the brain plasticity. The brain developmental processes remarkably occur in the pre-pubertal period, and training interventions during this sensitive period may lead to specific effects. The purpose of this study was to investigate the effects of combined training and activity in an enriched environment on the brain BDNF and VEGF protein levels in the pre-pubertal male rats.

Methods. The pre-pubertal male Wistar rats (n=18) were randomly divided into three groups of combined training (CT), enriched environment (EE), and control (C) at postnatal day 22. The combined training included endurance and resistance physical exercises, which performed six days a week. A large cage with various rich stimuli (wheel running, ladder, toys, tunnels) was provided for voluntary physical activity in an enriched environment. The interventions lasted for three weeks, and the brain tissue (right hemisphere) was removed for biochemical evaluations. The BDNF and VEGF protein levels of the brain were measured by the western blotting method.

Results. Significant differences found in the BDNF and VEGF levels in this study ($P<0.01$). The neurotrophic factors were significantly increased in the CT and EE groups. Although VEGF protein level increased in both groups, only enriched rats showed a significant difference.

Conclusion. It can be concluded that combined training and voluntary physical activity in an enriched environment in the pre-pubertal period can effective in brain plasticity by increasing the neurotrophic factors.

How to cite this article: Rostami S, Esmailyanmaleki M, Kargarfard P, Fayazmilani R. The effects of combined training and activity in an enriched environment on the brain BDNF and VEGF protein levels in the pre-pubertal male rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2022;43(6):543-553. doi: 10.34172/mj.2022.007. Persian.

Extended Abstract

Background

Brain development occurs significantly after birth. In this regard, the pre-pubertal period has been suggested as a key time point in brain development. During this time, the weight of the brain increases rapidly, and important processes of brain development are evident. In particular, the brain structure and function can change well as a

*Corresponding author; Email: r_milani@sbu.ac.ir
© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

result of interacting with the environment. The role of physical exercise in stimulating structural and functional changes in multiple areas of the brain has been demonstrated. Exercise may provide a rich and supportive nerve bed by increasing blood flow, and growth factors. Several molecular systems potentially contribute to the benefits of physical exercise on the brain and neurotrophic factors play a role by stimulating several messaging systems. The effect of various training interventions on the developing brain has been less studied. Combined exercise training and enriched environment through physical fitness development and comprehensive activation of the brain can lead to special plasticity effects.

Methods

In the present study, 18 healthy Wistar neonatal male rats aged 15 days were used. The animals were exposed to an environment with a temperature of 22°C and a humidity of 54±4. After one week of adaptation to the environment, rats were weaned at postnatal day (PND) 22 and randomly divided into three groups of combined exercise (CT), enriched environment (EE), and control (C) (n=6). The animals then familiarized how to run on a treadmill and climb a ladder (23-25 PND). After a rest day, maximum running and load-carrying capacity were determined (27 PND) and interventions were performed for three weeks (28-48 PND). Combined training included endurance and resistance training performed on even and odd days (six days a week), respectively. An enriched environment was designed for voluntary physical activity. The environment consisted of a large cage on three floors with water and food containers for the animals on each floor. Wheel running, ladders, and staircases connecting the floors provided opportunities for physical activity. The animals also had access to various toys including balls, tunnels, and rings. In order to maintain environmental stimuli, objects were removed from the environment and new objects were added every week. Rats were not forced to perform any activity throughout their pre-pubertal period. Three weeks after the intervention, the animals were anesthetized with carbon dioxide and the right hemisphere of the brain was isolated for biochemical evaluation. Western blot was used to measure BDNF and VEGF proteins. GAPDH was also used as a reference or control protein. The observed bands were quantified using Image J software. For this purpose, the BDNF or VEGF band density relative to GAPDH was measured. One-way ANOVA test was used to examine the significant differences between the three groups.

Result

In the present study, no significant difference was observed in the body weight of the animals at the beginning [F(2,15)=13.1] and end of three weeks of interventions [F(215)=23.1] between the groups. On the other hand, significant differences in BDNF protein levels were found between the groups [F(2,15)=74.13]. Using the Tukey post hoc test, it was observed that BDNF protein levels after three weeks of combined training (1.05±0.03) and voluntary physical activity in the enriched environment (1.12±0.01) were significantly higher compared to the control group (0.94±0.06) (P<0.01 and P<0.05, respectively). Similarly, a significant difference in VEGF protein levels was found [F(2,15)=74.13]. In this way, the enriched rats showed more significant levels (P<0.01). Although VEGF protein levels were higher in trained rats (1.07±0.06), no remarkable difference was observed in this group compared to the control group (0.94±0.04).

Conclusion

The type of exercise training used seems to be one of the reasons for the increase in BDNF. Six days of training per week, including aerobic and resistance training may have contributed to the increase in brain neurotrophic factors. In addition, training intensity has been suggested as one of the important variables involved in exercise adaptations. In the

present study, moderate intensity training was performed. Therefore, training with optimal intensity may have led to HPA axis adaptation, and the lack of significant difference in VEGF does not seem to be related to high intensity training. Overall, adequate time, load, and intensity of exercise are key factors in making the difference. On the other hand, animals in an enriched environment had access to several wheels running, ladders, and stairs for doing physical activities. Social interactions, cognitive and sensory stimulation are also important components that may have played a role in increasing neurotrophic factors.

رستمی و همکاران. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. بهمن و اسفند ۱۴۰۰؛ ۴۳(۶):۵۴۳-۵۵۳
doi: 10.34172/mj.2022.007
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثرات تمرین ترکیبی و فعالیت در محیط غنی‌شده بر سطوح مغزی پروتئین BDNF و VEGF موش‌های صحرایی نر نابالغ

سمیرا رستمی، میلاد اسمعیل‌یان ملکی، پرهام کارگرفرد، رعنا فیاض میلانی*

گروه علوم زیستی در ورزش، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۲
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

کلید واژه‌ها:
محیط غنی‌شده، دوره پیش از بلوغ، عوامل نوروتروفیک، تمرین ترکیبی، شکل‌پذیری مغز

چکیده

زمینه. عوامل نوروتروفیک نقش کلیدی در شکل‌پذیری مغز دارند. در دوره پیش از بلوغ، فرآیندهای توسعه مغزی به‌طور قابل توجهی رخ می‌دهند و مداخله‌های تمرینی طی این دوره حساس، ممکن است به اثرات ویژه‌ای منجر شوند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین ترکیبی و فعالیت در محیط غنی شده بر سطوح مغزی پروتئین BDNF و VEGF موش‌های صحرایی نر نابالغ بود.

روش کار. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سالم (n=18) در سن ۲۲ روزگی به صورت تصادفی به سه گروه تمرین ترکیبی (CT)، محیط غنی‌شده (EE) و کنترل (C) تقسیم شدند. تمرین ترکیبی شامل فعالیت‌های ورزشی استقامتی و مقاومتی بود که شش روز در هفته انجام شدند. جهت فعالیت بدنی اختیاری در محیط غنی شده، قفس بزرگی با محرک‌های غنی مختلف (چرخ گردان، نردبان، اسباب بازی، تونل) فراهم شد. مداخله‌ها به مدت سه هفته ادامه یافتند و در پایان، بافت مغز (نیمکره راست) برای ارزیابی‌های بیوشیمیایی جدا شد. سطوح مغزی پروتئین BDNF وVEGF با استفاده از روش وسترن بلات سنجیده شدند.

یافته‌ها. نتایج مطالعه، تفاوت معناداری را در میزان پروتئین BDNF وVEGF نشان دادند ($P< ۰/۰۱$).این عوامل نوروتروفیک به طور معناداری در گروه‌های CT و EE افزایش داشتند. اگرچه سطوح پروتئین VEGF در هر دو گروه بیشتر بود اما فقط موش‌های غنی تفاوت معناداری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که تمرین ورزشی ترکیبی و فعالیت بدنی اختیاری در محیط غنی‌شده در دوره پیش از بلوغ از طریق افزایش عوامل نوروتروفیک می‌توانند بر شکل‌پذیری مغز موثر باشند.

مقدمه

حفظ سلامت مغز در طول زندگی از اهداف مهم سلامت عمومی است.[۱] در بسیاری از گونه‌های پستانداران، توسعه مغزی به میزان قابل توجهی پس از تولد رخ می‌دهد. در این خصوص، دوره پیش از بلوغ به عنوان نقطه زمانی کلیدی در رشد مغزی مطرح شده است. این دوره در جوندگان از ۲۱ روز پس از تولد شروع می‌شود و تقریبا تا ۴۹-۴۲ روز پس از تولد ادامه دارد. همچنین در انسان این دوره از ۳-۲ سالگی شروع شده و تا ۱۴-۱۲ سالگی ادامه دارد. در این بازه زمانی، وزن مغز به میزان ۹۵-۹۰ درصد بزرگسالی افزایش می‌یابد و همزمان فرآیندهای مهمی از جمله نورون‌زایی (Neurogenesis)، رگ‌زایی (Angiogenesis)، سیناپتوژنز، میلینه‌شدن و توسعه سد خونی‌مغزی رخ می‌دهند.[۲] به‌طور ویژه، مدارهای عصبی شکل‌پذیری عصبی بالایی نشان می‌دهند و مغز می‌تواند به خوبی ساختار و عملکرد خود را در نتیجه تعامل با محیط تغییر دهد. نقش فعالیت ورزشی در تحریک تغییرات ساختاری و عملکردی در مناطق چندگانه مغز به خوبی نشان داده شده است.[۳] فعالیت ورزشی ممکن است از طریق افزایش عروق، جریان خون و عوامل رشدی، بستر عصبی غنی و حمایتی مناسبی را فراهم سازد. چندین سیستم مولکولی به طور بالقوه در فواید فعالیت ورزشی روی مغز مشارکت دارند که در این میان، عوامل رشد عصبی با تحریک چندین سیستم پیام‌رسانی، نقش ویژه‌ای دارند. در آبشار عوامل نوروتروفیک در مغز، عامل نوروتروفیک مشتق از مغز (Brian derived neurotrophic factor, BDNF) به

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: r_milani@sbu.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

عنوان میانجی کلیدی در تنظیم جنبه‌های مختلف شکل‌پذیری عصبی پیشنهاد شده است. همچنین عامل رشدی اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor, VEGF) در ترویج اثرات نورون‌زایی و رگ‌زایی ناشی از فعالیت ورزشی موثر است. این تاثیر به ویژه در مناطقی که در عملکرد شناختی و حرکتی اهمیت دارند مانند هیپوکامپ، استراتیوم، قشر حرکتی و مخچه گزارش شده است.[۴] مطالعات انسانی، افزایش عملکردهای شناختی، اجرایی و پیشرفت تحصیلی ناشی از انجام تمرین‌های ورزشی در دوران کودکی را نشان داده‌اند.[۵] اثرات مثبت فعالیت ورزشی بر شکل‌پذیری مغز در مطالعات حیوانی نیز مشاهده است. به عنوان مثال، میزان بیشتر VEGF وBDNF، تکثیر سلولی و بهبود عملکردهای شناختی پس از تمرین‌های ورزشی اجباری روی نوارگردان در موش‌های صحرایی نابالغ گزارش شده است.[۶-۸] در میان پژوهش‌های انجام شده، به تمرین‌های هوازی توجه ویژه‌ای شده است. با این حال، اطلاعات محدودی در خصوص تاثیر تمرین‌های مقاومتی موجود است. همچنین طبق دانش ما، مطالعه‌ای در خصوص تاثیر تمرین‌های ترکیبی استقامتی و مقاومتی صورت نگرفته است. این مدل تمرینی به بهبود قابل توجه آمادگی جسمانی در مقایسه با انجام این تمرین‌ها به تنهایی منجر شده است.[۹] همچنین، ارتباط مثبت بین آمادگی قلبی‌عروقی و قدرت عضلانی با افزایش عملکردهای شناختی و افزایش حجم ساختارهای مغزی گزارش شده است. طبق این فرضیه، استفاده از تمرین‌های ترکیبی می‌تواند به تغییرات ساختاری و عملکردی مغز منجر شود که در این خصوص یکی از مکانیسم‌های پایین دست مهم، افزایش تنظیم عوامل رشد مغزی مانند BDNF وVEGF است.[۱۰] با وجود اثرات مثبت فعالیت ورزشی، تمرین‌های اجباری ممکن است با افزایش میزان کورتیکواسترون (هورمون استرسی در جوندگان) به کاهش بیان BDNF وVEGF منجر شوند. این نکته از این جهت اهمیت دارد که فعالیت بیشتر محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی (hypothalamic–pituitary–adrenal axis, HPA) در دوره پیش از بلوغ نشان داده شده است.[۱۱] در مقابل تمرین‌های اختیاری با سازگاری در این محور و کاهش میزان استرس همراه بوده‌اند. استفاده از چرخ‌گردان، مدل تمرینی رایجی برای انجام تمرین‌های اختیاری در جوندگان است. همچنین اخیرا به‌عنوان قسمتی اساسی در محیط‌های غنی (Enriched Environment) معرفی شده است. محیط غنی شامل قفس‌های بزرگ و جذابی است که در آن حیوانات در گروه‌های بزرگ اجتماعی در معرض اشیا مختلف و تحریک‌های متنوع قرار می‌گیرند که به فعال‌سازی همه جانبه مغز (تحریک مناطق حسی، بصری، شناختی و حرکتی) منجر می‌شود.

نکات کاربردی

مداخله‌های تمرینی مختلف در دوره‌های حساس رشدی مانند دوره پیش از بلوغ با افزایش عوامل نوروتروفیک احتمالا به تاثیرات مثبتی در مغز در حال توسعه منجر می‌شوند.

از این رو محرک‌های غنی موجود، ریخت‌شناسی، شیمی، و فیزیولوژی مغز را تحت تاثیر قرار می‌دهند و پاسخ‌های شکل‌پذیری مهمی ایجاد می‌کنند.[۱۲] با این حال، در مطالعات پیشین به طور عمده از محرک‌های شناختی برای بررسی شکل‌پذیری عصبی استفاده شده است و محیط‌های غنی با فراهم سازی محرک‌های حرکتی کمتر ارزیابی شده‌اند. در مطالعه‌ای، موش‌های صحرایی نر ۲۱ روزه با منتژیت تا دوره نوجوانی (۶۰روزگی) در معرض محیط غنی‌شده قرار گرفتند. حیوانات از طریق نردبان و چرخ‌گردان به فعالیت‌های اختیاری دسترسی داشتند. همچنین مجموعه‌ای از تونل‌ها و اشیا مختلف برای تحریک شناختی موجود بودند. در پایان، سطوح بیشتر BDNF در هیپوکامپ و مایع مغزی نخاعی مشاهده شد.[۱۳]فعالیت بدنی در دوره‌های حساس رشدی می‌تواند به اثرات قابل توجهی بر ساختار مغز در حال توسعه منجر شود. با این حال، تاثیر مداخله‌های تمرینی مختلف کمتر بررسی شده است. در مجموع، بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص تاثیر تمرین‌های ورزشی اجباری بر ساختار و عملکرد مغز در دوره پیش از بلوغ با محور تمرین‌های ورزشی هوازی انجام شده‌اند و مطالعه‌ای در خصوص تمرین ترکیبی انجام نشده است.همچنین در خصوص فعالیت بدنی داوطلبانه در محیط غنی شده نیز اطلاعات محدودی وجود دارد. از این رو در پژوهش حاضر، تاثیر تمرین ورزشی ترکیبی و فعالیت در محیط غنی‌شده در دوره پیش از بلوغ بر سطح مغزی BDNF وVEGF موش‌های صحرایی بررسی شد. در این خصوص، مطالعات حیوانی می‌توانند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص سازوکارهای سلولی و مولکولی مهم مانند عوامل نوروتروفیک فراهم کنند.

روش کار

۲/۱. حیوانات

در پژوهش حاضر، تعداد ۱۸ سر موش صحرایی نر نوزاد نژاد ویستار سالم با وزن ۲/۲±۱۸/۵۴ گرم و سن ۱۵ روز استفاده شدند. موش‌های نابالغ از موسسه تحقیقاتی رازی خریداری و به محیط آزمایشگاه دانشکده علوم ورزشی و تندرستی دانشگاه شهید

بهشتی منتقل شدند. حیوانات در محیطی با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٤±٥٤ قرار گرفتند. چرخه شبانه‌روزی نیز به‌صورت ۱۲ ساعت شب و ۱۲ ساعت روز تنظیم شد. پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط، موش‌ها در سن ۲۲ روزگی از مادر جدا شدند و به صورت تصادفی به سه گروه تمرین ترکیبی (CT)، محیط غنی‌شده (EE) و کنترل (C) (n=6) تقسیم شدند. در ادامه و طی سه روز، با نحوه دویدن روی نوارگردان و بالارفتن از نردبان آشناسازی شد (۲۳ تا ۲۵ روزگی). پس از یک روز استراحت، حداکثر سرعت دویدن و بار بیشینه تعیین شدند (۲۷ روزگی) و مداخله‌ها به مدت سه هفته انجام شدند (۴۸-۲۸ روزگی).

۲٫۲ مداخلات تمرینی

تمرین ترکیبی شامل تمرین‌های استقامتی و مقاومتی بود که به ترتیب در روزهای زوج و فرد (شش روز در هفته) انجام شدند. ابتدا جلسات آشناسازی و آزمون‌های تعیین حداکثر سرعت و بار بیشینه مطابق با پروتکل‌های از پیش تعریف شده انجام شدند. پس از پنج دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه، تمرین استقامتی با ۷۰ درصد سرعت دویدن بیشینه انجام شد. در پایان نیز سرد کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و به مدت پنج دقیقه اجرا شد. پروتکل کامل تمرین استقامتی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.[۱۴] در جلسات ابتدایی تمرین، برای تحریک دویدن حیوانات از شوکر بادی استفاده شد.

جدول ۱. پروتکل تمرین استقامتی

هفته	روزهای تمرین	مدت زمان و سرعت تمرین
	شنبه	۲۰ دقیقه، ۱۴ متر/ دقیقه
اول	دوشنبه	۲۳ دقیقه، ۱۴ متر/ دقیقه
	چهارشنبه	۲۶ دقیقه، ۱۴ متر/ دقیقه
	شنبه	۲۹ دقیقه، ۱۵ متر/ دقیقه
دوم	دوشنبه	۳۲ دقیقه، ۱۵ متر/ دقیقه
	چهارشنبه	۳٦ دقیقه، ۱۵ متر/ دقیقه
	شنبه	۳۹ دقیقه، ۱٦ متر/ دقیقه
سوم	دوشنبه	٤۲ دقیقه، ۱٦ متر/ دقیقه
	چهارشنبه	٤٥ دقیقه، ۱٦ متر/ دقیقه

تمرین مقاومتی شامل هشت حرکت بالارفتن از نردبان با استراحت‌های دو دقیقه‌ای بین حرکات بود. حرکات اول تا چهارم به ترتیب با ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد بار بیشینه انجام شدند. سپس وزنه‌های هفت گرمی اضافه شدند تا زمانی که موش‌ها قادر به صعود موفق نبودند (رسیدن به محفظه استراحت بالای نردبان).[۱۵] برای فعالیت بدنی اختیاری، محیطی غنی شده طراحی شد.[۱۲] این محیط شامل قفس بزرگی (۹۰ × ۶۰ × ۴۰ سانتی‌متر) در سه طبقه بود که در هر طبقه ظروف آب و غذا در اختیار حیوانات قرار داشتند. چرخ‌گردان، نردبان و پله‌هایی که ارتباط بین طبقات را برقرار می‌کردند، موقعیت‌هایی را برای انجام فعالیت بدنی فراهم می‌کردند. همچنین حیوانات به اسباب بازی‌های مختلف شامل توپ، تونل و حلقه دسترسی داشتند. برای حفظ تحریک‌های محیطی، هر هفته اشیایی از محیط خارج و اشیا جدیدی اضافه می‌شدند. موش‌ها نسبت به گروه‌های دیگر در اجرای فعالیت‌های خود آزاد بودند و در سراسر دوران پیش از بلوغ وادار به اجرای هیچ فعالیتی نشدند.

۲٫۳ . روش وسترن بلات

سه هفته پس از اجرای مداخله‌ها، حیوانات توسط گاز دی‌اکسید کربن بیهوش شده و نیمکره راست مغز برای ارزیابی‌های بیوشیمیایی جدا شد. نمونه‌ها در نیتروژن مایع قرار گرفتند و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آزمایش وسترن بلات برای سنجش پروتئین‌های BDNF و VEGF مغز استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها توسط بافر ریپا (Radio immune precipitation assay buffer, RIPA) لیز شدند. در ادامه به مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای به دست آمدن محلول‌های مورد نظر، سانتریفیوژ انجام شد (شرکت اپندورف آلمان، 5415R). سپس غلظت پروتئین تعیین شد و مراحل وسترن بلات طبق پروتکل شرکت سازنده کیت‌ها اجرا شد. برای این کار، نمونه‌ها (۲۵ میکروگرم) در چاهک‌های ژل SDS-PAGE(٪ ۸) اضافه شدند و الکتروفورز به مدت یک تا دو ساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. سپس از بافر انتقال برای انتقال پروتئین از ژل به کاغذ استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی، بلاکینگ از طریق محلول بلاکینگ انجام شد و پس از آن، کاغذ با آنتی‌بادی‌های اولیه (ضد BDNF با شماره کاتالوگ ab203573 و ضد VEGF با شماره کاتالوگ ab32152 در غلظت ۱:۱۵۰۰، هر دو از شرکت اَبکم آمریکا) در طول شب انکوبه شد. سپس کاغذ در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موش HRP (شرکت بیوتکنولوژی سانتاکروز آمریکا با شماره کاتالوگ sc-516102) قرار گرفت. همچنین از پروتئین GAPDH به‌عنوان پروتئین مرجع یا کنترل استفاده شد (آنتی‌بادی اولیه با شماره کاتالوگ Rabbit Anti-GAPDH antibody [EPR16884] - Loading Control (ab181603) و آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوش HRP با شماره کاتالوگ Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718)، هر دو از شرکت اَبکم آمریکا). در پایان از طریق محلول ECL آشکارسازی انجام شد و باندهای مشاهده شده روی فیلم با استفاده از نرم‌افزار ایمیجی

ImageJ کمی شدند و چگالی باند BDNF نسبت به GAPDH سنجیده شد.

۲/۴. آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل شدند. بر این اساس، ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها بر اساس آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تایید شد. سپس از آزمون آنوا یک طرفه برای بررسی اختلاف معناداری بین سه گروه استفاده شد. سطح معناداری نیز $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

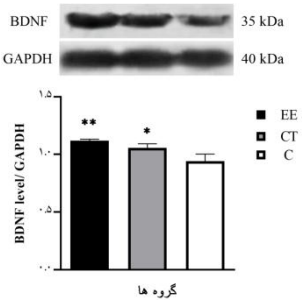
در پژوهش حاضر، تفاوت معناداری در وزن بدن حیوانات در شروع {F (۲و۱۵) =۱/۱۳} و در پایان سه هفته مداخله‌ها {F (۲و۱۵)=۱/۲۳} بین گروه‌ها مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: وزن بدن حیوانات در شروع و پایان مداخله‌ها (میانگین ± انحراف‌معیار)

گروه‌ها	C	CT	EE
۲۸روزگی	۵۶/۵۲±۱/۲۰	۶۴/۲۸±۳/۰۱	۶۰/۱۰±۲/۱۲
۵۴ روزگی	۱۴۶/۹۰±۳/۲۲	۱۴۷/۰±۲/۸۱	۱۴۹/۲۱±۲/۸۷

C: کنترل؛ CT: تمرین ترکیبی؛ EE: محیط غنی شده

از سویی، تفاوت معناداری در سطوح پروتئین BDNF بین سه گروه یافت شد{F (۲و۱۵) = ۱۳/۷۴}. با استفاده آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که سطوح پروتئین BDNF پس از سه هفته تمرین ترکیبی (۰/۰۳ ± ۱/۰۵) و فعالیت بدنی اختیاری در محیط غنی شده (۰/۰۱ ± ۱/۱۲) به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۶ ± ۰/۹۴) بیشتر بود (به ترتیب $P<0/01$ و $P<0/05$) (نمودار ۱).

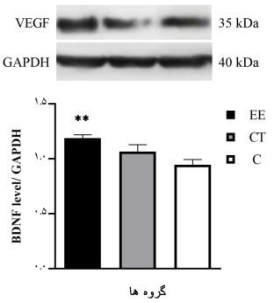


نمودار ۱. نتایج آزمایش وسترن بلات و تغییرات سطوح پروتئین *BDNF* بافت مغز

**, * تفاوت معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهند ($P<0/05$).

kDa: کیلو دالتون؛ C: کنترل، CT: تمرین ترکیبی، EE: محیط غنی شده

به‌طور مشابهی، تفاوت معناداری در میزان پروتئین VEGF بین گروه‌ها مشاهده شد{F (۲و۱۵)=۱۳/۷۴} به صورتی که موش‌های گروه غنی شده (۰/۰۳±۱/۱۹) سطوح معنادار بیشتری را نشان دادند ($P<0/01$). سطوح پروتئین VEGF اگرچه در موش‌های تمرین کرده (۰/۰۶±۱/۰۷) بیشتر بود اما تفاوت معناداری در این گروه نسبت به گروه کنترل (۰/۰۴±۰/۹۴) یافت نشد (نمودار ۲).



نمودار ۲. نتایج آزمایش وسترن بلات و تغییرات سطوح پروتئین VEGF بافت مغز

** تفاوت معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهند ($P<0/05$).

kDa: کیلودالتون؛ C: کنترل، CT: تمرین ترکیبی، EE: محیط غنی شده

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر تمرین ورزشی ترکیبی و فعالیت بدنی اختیاری در محیط غنی‌شده در دوره پیش از بلوغ بر سطح مغزی BDNF و VEGF موش‌های صحرایی نر بود. سه هفته پس از انجام مداخله‌ها، سطوح معنادار بیشتر پروتئین BDNF یافت شد. همچنین میزان بیشتر پروتئین VEGF در هر دو گروه مشاهده شد. با این حال فقط موش‌های غنی‌شده تفاوت معناداری را نشان دادند. در میان عوامل نوروتروفیک، بیشتر مطالعات در دوره پیش از بلوغ با تمرکز بر تغییرات BDNF ناشی از فعالیت ورزشی انجام شده‌اند. سطوح بیشتر پروتئین BDNF هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر که به مدت پنج هفته (۲۱ تا ۶۰ روزگی) روی نوارگردان دویدند، نشان داده شده است.[۸] طبق دانش ما تحقیقی در خصوص تاثیر تمرین‌های مقاومتی در دوره پیش از بلوغ انجام نشده است و نتایج متناقضی نیز در حیوانات بزرگسال به دست آمده است. در مطالعه کاسیلاس، میزان بیشتر BDNF به دنبال تمرین مقاومتی (بالا رفتن از نردبان) مشاهده نشد.[۱۶] در پژوهش دیگری، تمرین مقاومتی به سطوح سرمی بیشتر BDNF منجر شده است.[۱۷] تغییرات VEGF ناشی از فعالیت ورزشی در دوره پیش از بلوغ کمتر ارزیابی شده است. در یک مطالعه، تاثیر فعالیت‌های ورزشی داوطلبانه و اجباری بر

سطوح BDNF و VEGF هیپوکامپ موش‌های صحرایی نوجوان بررسی شد و سطوح بیشتر این عوامل نوروتروفیک پس از هر دو مداخله ورزشی نشان داده شد.[۶] همسو با این نتایج، در مطالعه حاضر نیز سطوح بیشتر پروتئین BDNF و VEGF پس از سه هفته تمرین ترکیبی یافت شد. به نظر می‌رسد که نوع تمرین‌های ورزشی استفاده شده، یکی از دلایل افزایش میزان BDNF باشد. شش روز تمرین ورزشی در هفته شامل تمرین هوازی در روزهای زوج و تمرین مقاومتی در روزهای فرد احتمالا روی میزان عوامل نوروتروفیک مغز موثر بوده است.[۱۶] بر پایه مطالعات پیشین، فواید ناشی از تمرین‌های ورزشی ممکن است به علت افزایش عروق و جریان خون مغزی افزایش یافته و از این رو افزایش اکسیژن رسانی در مناطق چندگانه مغز باشد.[۱۰] همچنین، ایجاد هایپوکسی، فشار برشی و تولید نیتریک اکساید از عوامل کلیدی موثر در میزان بیشتر VEGF بودند.[۱۸] اگرچه سطوح پروتئین VEGF در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود، اما تفاوت معناداری در این گروه مشاهده نشد. همچنین شواهد مربوط به تفاوت VEGF ناشی از تمرین‌های مقاومتی دوگانه است. در مطالعه‌ای، عدم تغییر پروتئین VEGF پس از شش هفته تمرین مقاومتی در موش‌های مبتلا به سرطان سینه مشاهده شد.[۱۹] شماری از تحقیقات نیز اثرات مثبت را در آزمودنی‌های سالمند نشان داده‌اند.[۲۰] مطالعات محدودی، نقش تمرین مقاومتی در ترویج سلامت مغز و عملکرد شناختی در کودکان را بررسی کرده‌اند. فقدان پژوهش‌ها تا حدودی ناشی از این تصور غلط رایج است که این نوع تمرین‌ها برای کودکان ایمن نیستند. در صورتی که مطالعات زیادی نشان داده‌اند که تمرین‌های مقاومتی در سنین پایین موثر و بی خطر هستند. همچنین از آنجا که سال‌های ابتدایی زندگی با پیشرفت سریع در رشد عصبی‌عضلانی همراه است و افزایش قدرت در این دوره بیشتر حاصل سازگاری‌های عصبی‌عضلانی است، استفاده از تمرین‌های مقاومتی می‌تواند در توسعه قدرت نقش مهمی داشته باشد. این موضوع از این نظر اهمیت دارد که ارتباط مثبت بین عوامل مرتبط با آمادگی جسمانی و توسعه عملکردهای شناختی نشان داده شده است.[۲۱] در این راستا، بهبود قدرت پنجه و سطوح بیشتر عوامل نوروتروفیک در موش‌های صحرایی بزرگسالی که در دوره پیش از بلوغ در معرض مداخله‌های تمرینی قرار گرفته بودند، نشان داده شده است.[۲۲] در کنار نوع فعالیت ورزشی، شدت تمرین‌ها نیز به عنوان یکی از متغیرهای مهم درگیر در سازگاری‌های ورزشی مطرح شده است. در این خصوص، یک هفته دویدن اجباری با شدت پایین روی نوارگردان به بیان بیشتر BDNF هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر نوجوان منجر شده است.[۲۳] همچنین سطوح BDNF بیشتر پس از دویدن اجباری با شدت بالا در موش‌های صحرایی نر نوجوان مشاهده شده است. اگرچه شواهدی وجود دارند که شدت‌های ورزشی بالا با بالا بردن میزان کورتیکواسترون به کاهش بیان BDNF هیپوکامپ موش‌های صحرایی منجر شده‌اند.

اخیرا فرضیه‌ای به نام هورمسیس (Hormesis) مطرح شده است که بسیاری از واسطه‌های مولکولی ناشی از فعالیت ورزشی عملکرد دوگانه‌ای را نشان می‌دهند. به عنوان مثال نشان داده شده است که میزان بالا VEGF به کاهش تنظیم گیرنده‌های آن منجر می‌شود (با افزایش تمایز نورونی و کاهش تکثیر سلولی) در حالی که میزان کم آن باعث افزایش تنظیم گیرنده‌های VEGF می‌شود. پیشنهاد شده است که این پاسخ‌های دوگانه به فعالیت ورزشی برای بسیاری از عوامل درگیر در فرآیندهای شکل‌پذیری عصبی وجود دارند.[۲۴] در مطالعه حاضر، حیوانات برای تمرین استقامتی با شدت متوسط روی نوارگردان دویدند. همچنین پژوهش پیشین ما، سطوح بیشتر کورتیکواسترون سرم را پس از تمرین‌های ترکیبی نشان نداد.[۲۵] بنابراین، تمرین با شدت مطلوب ممکن است به سازگاری محور HPA منجر شده باشد و با توجه به تفاوت معنادار BDNF، به نظر نمی‌رسد عدم تفاوت معنادار VEGF با شدت بالا تمرین و استرس منفی ناشی از آن مرتبط باشد.[۲۶] مدت زمان مداخله تمرینی می‌تواند یکی از توضیحات احتمالی در این خصوص باشد. به صورتی که سه هفته مداخله تمرینی ممکن است برای ایجاد تفاوت معنادار VEGF کافی نبوده باشد. در مجموع، زمان کافی، بار و شدت تمرین‌ها، عوامل کلیدی برای بروز تفاوت‌ها هستند که با توجه به کمبود مطالعات در دوره پیش از بلوغ، بررسی بیشتر این عوامل ضروری به نظر می‌رسد.[۱۰] از سوی دیگر، تغییرات بیشتر معنادار در سطوح پروتئین BDNF وVEGF مغز به دنبال سه هفته قرارگیری در محیط غنی شده مشاهده شد. تاثیر محیط‌های غنی بر عوامل نوروتروفیک در دوره پیش از بلوغ در مطالعات کمی ارزیابی شده است. شواهد موجود پیشنهاد می‌کنند که بسیاری از فواید ناشی از محیط‌های غنی به علت فعالیت بدنی است که نقش ضروری را در این محیط ایفا می‌کند.[۴] در این خصوص، ون پراگ و همکاران از فعالیت ورزشی به عنوان عامل حیاتی در محیط غنی شده یاد کرده‌اند. در پژوهش آنها موش‌های ماده پنج هفته‌ای به چهار گروه شامل گروه کنترل (در قفس‌های عادی)، گروهی که روی چرخ‌گردان می‌دویدند، گروه

غنی‌شده (بدون چرخ‌گردان) و گروه با محیط غنی شده شامل چرخ‌گردان تقسیم شدند. به طور جالب توجهی، سطوح بیشتر پروتئین BDNF فقط در گروه‌های فعالیت ورزشی مشاهده شد.[۲۷] در مطالعه حاضر، حیوانات برای انجام فعالیت‌های بدنی اختیاری به چندین چرخ‌گردان، نردبان و پله دسترسی داشتند. همچنین فضا بزرگ قفس امکان انجام حرکت‌های متعدد و مختلف را فراهم می‌کرد. با این حال، جنبه‌های دیگر محیط غنی را نمی‌توان نادیده گرفت. در پژوهشی، موش‌های صحرایی نر با منتژیت در ۲۱ روزگی در معرض محیط غنی شامل قفسی بزرگ با چرخ‌گردان و اسباب بازی‌های متنوع قرار گرفتند. مداخله تا ٦٠ روزگی ادامه داشت و در پایان، سطوح بیشتر BDNF هیپوکامپ یافت شد.[۱۳] همچنین سطوح بیشتر BDNF ناشی از محیط‌های غنی همراه با بهبود عملکردهای شناختی در حیوانات بزرگسال گزارش شده است. همچنین تحریک رگ‌زایی در قشر مغزی موش‌های مدل ایسکمی با غنی‌سازی محیط مشاهده شده است.[۲۸] خانه‌گزینی و تعاملات اجتماعی، تحریک شناختی از طریق وسایل بازی و اشیا مختلف و تحریک‌های حسی نیز مولفه‌های مهمی در محیط غنی هستند که احتمالا در افزایش عوامل نوروتروفیک نقش داشته‌اند.[۱۲] از سوی دیگر، مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که VEGF به‌عنوان میانجی مستقیم، عملکرد شناختی را در جوندگان بهبود می‌بخشد و باعث افزایش تقویت طولانی مدت (Long term potentiation, LTP) در نورون‌های هیپوکامپ می‌شود. VEGF با افزایش قدرت سیناپسی، حافظه وابسته به هیپوکامپ را مستقل از اثرات آن بر نورون‌زایی و رگ‌زایی تحریک می‌کند. LTP تسهیل شده ناشی از EE به گیرنده‌های ان متیل دی آسپارتات (NMDA, N-methyl-d-aspartate) وابسته است. تغییرات در شکل‌پذیری سیناپسی با سطوح افزایش یافته آدنوزین مونوفسفات حلقه‌ای (cAMP response element binding protein, CREB) وVEGFs رخ می‌دهند.[۲۹] از سوی دیگر، محیط غنی ممکن است فضای آزاد چالشی را برای حیوانات فراهم کند تا در فضایی مشابه با زمین بازی مجهز فعالیت کنند. در دوره پیش از بلوغ و نوجوانی، موش‌های صحرایی تقریبا یک ساعت از چرخه ٢٤ ساعت شبانه‌روزی را به بازی کردن اختصاص می‌دهند. به نظر می‌رسد تجربه لذت و سرگرمی، حیوانات را به انجام رفتارهایی مانند بازی بیشتر سوق می‌دهد. شواهد تجربی در حال رشدی وجود دارند که بازی کردن در موش‌های صحرایی، نقش مهمی در توسعه عصبی ایفا می‌کند. همچنین بازی کردن بیان BDNF آمیگدال و قشر فرونتال در موش‌های نوجوان را افزایش داده است.[۳۰] به طور کلی، به‌نظر می‌رسد محیط غنی طراحی شده در پژوهش حاضر، موقعیت‌هایی برای بازی، فعالیت‌های بدنی و یادگیری حیوانات فراهم کرده و ترکیب فعالیت بدنی و عوامل شناختی به سطوح بیشتر عوامل نوروتروفیک شامل BDNF و VEGF مغز منجر شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که مداخله‌های تمرینی شامل فعالیت بدنی اختیاری در محیط غنی‌شده و ترکیبی از تمرین‌های استقامتی و مقاومتی در دوره پیش از بلوغ از طریق افزایش عوامل نوروتروفیک به عنوان سازوکارهای پایین دست کلیدی، احتمالا می‌توانند بر شکل‌پذیری مغز موثر باشند. با این حال به دلیل کمبود مطالعات در دوره پیش از بلوغ و نوجوانی و اهمیت توسعه مغزی در این دوران، استفاده از مدل‌های تمرینی گوناگون و مقایسه اثر مداخله‌ها برای ارزیابی‌های سلولی و الکتروفیزیولوژی ضروری به‌نظر می‌رسد. در این خصوص، بررسی جایگاه‌های مختلف مغزی نیز می‌تواند راه‌گشا باشد.

قدردانی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. از دانشکده علوم ورزشی و تندرستی دانشگاه شهید بهشتی که امکانات آزمایشگاهی را برای کمک به انجام این پژوهش فراهم کردند، تشکر می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، اصول اخلاقی مطابق با قوانین حمایت و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی، مصوبه کمیته ملي اخلاق در پژوهش‌هاي زيست پزشكي دانشگاه شهید بهشتی و با شناسه اخلاق IR.SBU.REC.1398.007 رعایت شدند.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق پژوهشگران و فناوران انجام شده است.

منافع متقابل

محققان منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

میلاد اسمعیل‌یان ملکی و پرهام کارگرفرد مراحل اجرایی پژوهش و جمع‌آوری نتایج را عهده داشتند. سمیرا رستمی در اجرای پروتکل، مطالعه اولیه و نگارش مقاله مشارکت داشت. رعنا فیاض میلانی به عنوان استاد راهنما در طراحی پژوهش، تدوین و ویرایش نسخه نهایی نقش داشت. همچنین مولفان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Macpherson H, Teo W-P, Schneider LA, Smith AE. A life-long approach to physical activity for brain health. Frontiers in Aging Neuroscience. 2017;9:147. doi: 10.3389/fnagi.2017.00147
2. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Progress in Neurobiology. 2013;106:1-16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
3. Gomes da Silva S, Arida RM. Physical activity and brain development. Expert Review of Neurotherapeutics. 2015 Sep 2;15(9):1041-51.
4. Vivar C, Potter MC, van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. Neurogenesis and Neural Plasticity. 2012:189-210. doi: 10.1007/7854_2012_220
5. Mandolesi L, Polverino A, Montuori S, Foti F, Ferraioli G, Sorrentino P, et al. Effects of physical exercise on cognitive functioning and wellbeing: biological and psychological benefits. Frontiers in Psychology. 2018 Apr 27;9:509. doi: 10.3389/fpsyg.2018.00509
6. Uysal N, Kiray M, Sisman A, Camsari U, Gencoglu C, Baykara B, et al. Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats. Biotechnic & Histochemistry. 2015;90(1):55-68. doi: 10.3109/10520295.2014.946968
7. Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, et al. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. Neuroscience letters. 2005;383(3):241-5. doi: 10.1002/hipo.20903
8. Gomes da Silva S, Unsain N, Mascó DH, Toscano-Silva M, de Amorim HA, Silva Araujo BH, et al. Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. Hippocampus. 2012;22(2):347-58. doi: 10.1002/hipo.20903
9. Alves AR, Marta C, Neiva HP, Izquierdo M, Marques MC. Concurrent Training in Prepubertal Children: an Update. 2018. doi: 10.14198/jhse.2018.133.18
10. Voss MW, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T, Kramer AF. Exercise, brain, and cognition across the life span. Journal of Applied Physiology. 2011;111(5):1505-13. doi: 10.1152/japplphysiol.00210.2011
11. Eiland L, Romeo RD. Stress and the developing adolescent brain. Neuroscience. 2013;249:162-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.048
12. Sampedro-Piquero P, Begega A. Environmental enrichment as a positive behavioral intervention across the lifespan. Current Neuropharmacology. 2017;15(4):459-70. doi: 10.2174/1570159X14666160325115909
13. Barichello T, Fagundes GD, Generoso JS, Dagostin CS, Simões LR, Vilela MC, et al. Environmental enrichment restores cognitive deficits induced by experimental childhood meningitis. Revista Brasileira de Psiquiatria. 2014;36(4):322-9. doi: 10.1590/1516-4446-2014-1443
14. Huang A-M, Jen C, Chen H, Yu L, Kuo Y-M, Chen H-I. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. Journal of Neural Transmission. 2006;113(7):803-11. doi: 10.1007/s00702-005-0359-4
15. Hornberger Jr TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Canadian Journal of Applied Physiology. 2004;29(1):16-31. doi: 10.1139/h04-002
16. Cassilhas R, Lee K, Fernandes J, Oliveira M, Tufik S, Meeusen R, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. Neuroscience. 2012;202:309-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.029
17. Yarrow JF, White LJ, McCoy SC, Borst SE. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). Neuroscience letters. 2010;479(2):161-5. doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.058

18. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. European Journal of Neuroscience. 2003;18(10):2803-12. doi: 10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x
19. Nourshahi M, Babaei A, Bigdeli MR, Ghasemi Beyrami M. The effect of six weeks of resistance training on tumor tissue VEGF and endostatin in mice with breast cancer. Journal of Sport Biosciences. 2013;5(2):27-46. (persian). doi: 10.22059/jsb.2013.35038
20. Chang Y-K, Pan C-Y, Chen F-T, Tsai C-L, Huang C-C. Effect of resistance-exercise training on cognitive function in healthy older adults: a review. Journal Of Aging and Physical Activity. 2012;20(4):497-517. doi: 10.1123/japa.20.4.497
21. Myers AM, Beam NW, Fakhoury JD. Resistance training for children and adolescents. Translational Pediatrics. 2017;6(3):137. doi: 10.21037/tp.2017.04.01
22. Rostami S, Haghparast A, Fayazmilani R. The role of pre-pubertal training history on hippocampal neurotrophic factors and glucocorticoid receptor protein levels in adult male rats. Neuroscience Letters. 2021;752:135834. doi: 10.1016/j.neulet.2021.135834
23. Lou S-j, Liu J-y, Chang H, Chen P-j. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. Brain Research. 2008;1210:48-55. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.080
24. Gradari S, Pallé A, McGreevy KR, Fontán-Lozano Á, Trejo JL. Can exercise make you smarter, happier, and have more neurons? A hormetic perspective. Frontiers in Neuroscience. 2016;10:93. doi: 10.3389/fnins.2016.00093
25. Rostami S, Haghparast A, Fayazmilani R. The downstream effects of forced exercise training and voluntary physical activity in an enriched environment on hippocampal plasticity in preadolescent rats. Brain Research. 2021:147373. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147373
26. Leasure J, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. Neuroscience. 2008;156(3):456-65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.041
27. Kobilo T, Liu Q-R, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. Learning & Memory. 2011;18(9):605-9. doi: 10.1101/lm.2283011
28. Döbrössy MD, Dunnett SB. The influence of environment and experience on neural grafts. Nature Reviews Neuroscience. 2001;2(12):871. doi: 10.1038/35104055
29. Yu JH, Kim M, Seo JH, Cho S-R. Brain plasticity and neurorestoration by environmental enrichment. Brain & Neurorehabilitation. 2016;9(2). doi: 10.12786/bn.2016.9.e2
30. Gordon NS, Burke S, Akil H, Watson SJ, Panksepp J. Socially-induced brain 'fertilization': play promotes brain derived neurotrophic factor transcription in the amygdala and dorsolateral frontal cortex in juvenile rats. Neuroscience letters. 2003;341(1):17-20. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00158-7