

## تأثیر لینالول، سینائول، بتا بوربونین و تمرینات هوازی به عنوان رویکردهای محافظتی در موش‌های مبتلا به آلزایمر

زینب علیمردی<sup>۱</sup>، فرزانه تقیان<sup>۲</sup>، خسرو جلالی دهکردی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** بیماری آلزایمر، یک اختلال عصبی پیشرونده مرتبط با افزایش سن است. هدف از این مطالعه، تأثیر هشت هفته تمرین هوازی و مصرف لینالول، سینائول و بتا بوربونین بر پیشگیری و بهبود روند شناختی موش‌های مبتلا به آلزایمر می‌باشد.

**روش‌ها:** ۴۸ سر موش ماده با نژاد C57BL/6 میانگین سنی ۱۵ ماه بصورت تصادفی به ۸ گروه عتایی تقسیم شدند. ترکیبات زیست فعال شامل لینالول با غلظت ۵/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، سینائول با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، بتا بوربونین با غلظت ۲۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، به صورت گاواژ و تمرین هوازی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته انجام شد. آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های Bdnf, Ngf, Creb را انتخاب و با qPCR-Real Time اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** بیان Bdnf, Ngf و Creb در گروه آلزایمر+ترکیبات زیست فعال، گروه آلزایمر+تمرین هوازی و آلزایمر+ترکیبات زیست فعال + تمرین هوازی نسبت به گروه آلزایمر افزایش یافت. انجام تمرینات هوازی و مصرف ترکیبات زیست فعال قبل از القای آلزایمر سبب افزایش Bdnf, Ngf و Creb شد و نشان‌دهنده اثر محافظتی در ابتلا به آلزایمر می‌باشد. تأثیر سینرژیک در گروه ترکیبات زیست فعال+تمرین هوازی+آلزایمر بر بیان ژن‌ها نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد. میزان شناسایی شیء جدید در آلزایمر+ترکیبات زیست فعال+تمرین هوازی نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** کاهش بیان ژن Bdnf, Ngf و Creb در گروه ترکیبات زیست فعال+تمرین هوازی+آلزایمر نسبت به سایر گروه‌ها کمتر رخ داده است که این نتایج حاکی از تأثیر محافظتی بر روند آلزایمری شدن می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** بیماری آلزایمر؛ بیوانفورماتیک؛ تمرین؛ Bdnf؛ ترکیبات زیست فعال

**ارجاع:** علیمردی زینب، تقیان فرزانه، جلالی دهکردی خسرو. تأثیر لینالول، سینائول، بتا بوربونین و تمرینات هوازی به عنوان رویکردهای محافظتی

در موش‌های مبتلا به آلزایمر. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۱۱): ۱۵۸-۱۴۸

همگام‌سازی داروهای ترکیبی و سبک زندگی ممکن است با جبران مسیرهای سیگنالینگ و بهبود کیفیت زندگی، علائم آلزایمر را معکوس کند (۴). مشخصه‌ی بیماری آلزایمر، تجمع پلاک‌های پروتئین Senile خارج سلولی در نتیجه بیان بیش از حد آمیلوئید بتا  $A\beta$  (Amyloid beta) و تجمع پروتئین‌های تائو (Tau protein) در بافت مغز افراد بالای ۶۵ سال است که منجر به اختلال روانی، کاهش توانایی در مهارت‌های حرکتی و سایر اختلالات می‌شود (۵). در نتیجه، مطالعه‌ی شاخص‌های بیوشیمیایی و مولکولی بیماری آلزایمر برای پایش پیری حیاتی است، که ممکن است منجر به توسعه‌ی استراتژی‌ها و درمان‌های جدید شود (۶، ۷).

## مقدمه

آلزایمر، یک نگرانی اصلی در سراسر جهان است. گزارشات اتیولوژی سرویس بهداشت ملی (NHS (National Health Service نشان می‌دهد که از هر ۱۴ نفر بالای ۶۵ سال، ۱ نفر و از هر ۶ نفر بالای ۸۰ سال، ۱ نفر به آلزایمر یا نوع دیگری از زوال عقل مبتلا می‌شوند (۱). نشانگرهای مولکولی و بیولوژیکی پیری مانند کوتاه شدن تلومر، بی‌ثباتی ژنومی، اختلال عملکرد میتوکندری، تغییرات اپی‌ژنتیکی، اختلال در اتصالات بین سلولی، کمبود هموستاز پروتئین، تحلیل رفتن سلولی و کاهش سن سلول‌های بنیادی به منظور تشخیص شروع زوال و مرگ ناشی از افزایش سن بررسی می‌شوند (۲، ۳).

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فرزانه تقیان؛ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

Email: ft.taghian@gmail.com

پروتکل‌های نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) تأیید شده است (IR.IAU.KHUISF.REC.1401.010).

جهت اجرای این مطالعه، ۴۸ موش ماده با نژاد C57BL/6 در محدوده‌ی وزن ۲۵-۲۸ گرم و میانگین سنی ۱۵ ماه خریداری و به آزمایشگاه منتقل شد. موش‌های C57BL/6 در لانه‌ی حیوانات در شرایط استاندارد دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت  $5 \pm 65$  درصد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت نور / ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین، حیوانات با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند.

ابتدا گروهی از موش‌ها مبتلا به آلزایمر شده و سپس به مدت ۸ هفته تحت تیمار تمرینات ورزشی هوازی و مصرف ترکیبات زیست فعال (لینالول، سینائول، بتا بوربونین) قرار گرفتند و گروهی دیگر، ابتدا به مدت ۸ هفته تحت تیمار تمرینات ورزشی هوازی و مصرف ترکیبات زیست فعال (لینالول، سینائول، بتا بوربونین) قرار گرفته‌اند و سپس مبتلا به آلزایمر شدند.

پس از یک هفته سازگاری با محیط لانه‌ی حیوانات، موش‌های C57BL/6 به صورت تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۶ سر موش)، شامل ۱. گروه شاهد، ۲. موش‌های مبتلا به آلزایمر تحت تیمار با بتا آمیلوئید (آلزایمر)، ۳. موش‌های آلزایمری تحت تیمار ترکیبات زیست فعال (لینالول با غلظت ۵/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، سینائول با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، بتا بوربونین با غلظت ۷۲ میلی‌گرم/کیلوگرم) بصورت گاوآژ به مدت ۸ هفته داده شد (آلزایمر+ ترکیبات زیست فعال)، ۴. موش‌های آلزایمری تحت تیمار با تمرین هوازی به وسیله‌ی تردمیل با شدت متوسط به مدت ۸ هفته (آلزایمر+تمرین هوازی)، ۵. موش‌های آلزایمری تحت تیمار با ترکیبات زیست فعال و تمرین هوازی به مدت ۸ هفته (آلزایمر+ ترکیبات زیست فعال+تمرین هوازی)، ۶. موش‌های سالم ابتدا تحت تیمار ترکیبات زیست فعال بصورت گاوآژ به مدت ۸ هفته قرار گرفتند و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (ترکیبات زیست فعال+آلزایمر)، ۷. موش‌های سالم ابتدا تحت تیمار با تمرین هوازی به وسیله‌ی تردمیل با شدت متوسط به مدت ۸ هفته و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (تمرین هوازی+آلزایمر)، ۸. موش‌های سالم ابتدا تحت تیمار با ترکیبات زیست فعال و تمرین هوازی به مدت ۸ هفته و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (ترکیبات زیست فعال+تمرین هوازی+آلزایمر).

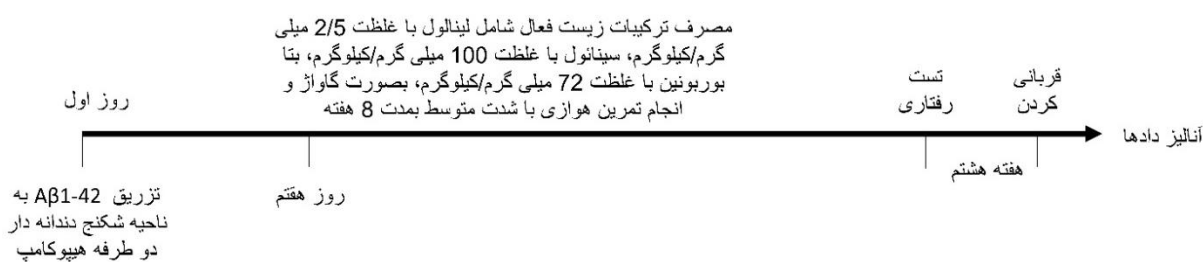
در نهایت، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و تیمار، موش‌ها با داروهای شیمیایی کتامین و زایلازین بیهوش شدند و بافت مغز برای آزمایش‌های بیشتر جدا شد و در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  سانتی‌گراد ذخیره شد (شکل ۱).

نقش فعالیت‌های ورزشی بر عملکرد مغز همچون تقویت حافظه و بهبود یادگیری به خوبی مشخص شده است و مطالعات عنوان کرده‌اند که اثرات مفید انجام فعالیت ورزشی بر عملکرد مغز تا حدی به واسطه‌ی تقویت عملکرد و افزایش سطوح نوروتروفین‌ها است (۸، ۹). اگرچه داروهایی برای کاهش عوارض بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند با این وجود یا اثرات کمی در بیماری آلزایمر دارند و یا دارای عوارض جانبی هستند (۴). از این رو استفاده از گیاهان دارویی به دلیل توانایی آن‌ها در اعمال اثرات محافظت نورونی از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز و یا از طریق مهار استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گرفته است. سه ترکیب زیست فعال گیاهی لینالول (Linalool)، سینائول (Cineole) و  $\beta$  بوربونین ( $\beta$ -Bourbonene Amyloid beta) با فعالیت ضدسرطانی، فعالیت ضد میکروبی، اثرات ضد التهابی، تعدیل‌کننده‌ی ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، استفاده به عنوان یک عامل پیشگیری‌کننده، کاهش‌دهنده‌ی قابل توجه در سطح بتا آمیلوئید خارج سلولی، تائوپاتی، آستروگلیوز و میکروگلیوز و همچنین کاهش قابل توجهی در سطح نشانگرهای پیش‌التهابی دارند (۱۰-۱۴). همچنین اثرات قابل توجهی بر روی سیستم عصبی مرکزی دارد. لینالول همچنین انتقال عصبی گلوتاماترژیک را هم در *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* احتمالاً از طریق فعل و انفعالات گیرنده‌ی NMDA تعدیل می‌کند. BDNF در مغز، عمدتاً در سلول‌های گلیال سنتز و سپس به پایانه‌های پیش سیناپسی و دندریت‌های پس سیناپسی منتقل می‌شود (۱۵). مطالعات نشان داده است که در آلزایمر، کاهش BDNF سبب التهاب عصبی و آپوپتوز عصبی می‌گردد (۱۶). نقص حافظه‌ی ناشی از التهاب عصبی به فعال شدن سیگنال‌دهی TLR4/NF-kB و مهار بیان CREB/BDNF در مدل‌های آلزایمری نسبت داده شده است (۱۷). NGF برای بقای نورون‌های کولینرژیک ضروری است و یک هدف درمانی بالقوه برای آلزایمر است (۱۸، ۱۹).

هدف از مطالعه‌ی حاضر، تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی همراه با مصرف ۳ ترکیب زیست فعال لینالول، سینائول و بتا بوربونین بر روند پیشگیری (تیمار قبل از القای آلزایمر) و بهبود (تیمار بعد از القای آلزایمر) موش‌های مبتلا به آلزایمر می‌باشد. از سویی، بررسی اثر ترکیبات زیست فعال در فازهای قبل و بعد از ابتلا به آلزایمر است که دو رویکرد پیشگیرانه و درمانی را مدنظر قرار داده است.

## روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی با هدف بررسی تأثیر انجام تمرینات ورزشی هوازی و مصرف ترکیبات زیست فعال (لینالول، سینائول، بتا بوربونین) به صورت گاوآژ به مدت ۸ هفته، قبل و بعد از مبتلا شدن موش‌ها به آلزایمر، انجام شد. این تحقیق با رعایت کلیه‌ی



شکل ۱. مراحل انجام مطالعه

دستگاه استریوتاکسیک (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) قرار گرفتند. الیگومر  $A\beta 1-42$  در غلظت ۵۰ میکرومولار یا ۰/۹ درصد سالین استریل با غلظت ۱ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر در سمت، با سرعت ۰/۲ میکرولیتر در دقیقه) به ناحیه شکنج دندانه‌دار دو طرفه هیپوکامپ پشتی موش‌های C57BL/6 تزریق شد. با استفاده از مختصات زیر که با کمک اطلس مشخص شد، حفره‌ای ایجاد گردید:

1.  $-2.3 \pm 0.1$  mm AP from bregma
2.  $\pm 2.0$  mm ML from midline
3.  $-2.1 \pm 0.2$  mm DV from pia mater

در گروه‌های آلزایمر، ۴ میکرولیتر از محلول  $A\beta 1-42$  آماده شده را با استفاده از سرنگ همیلتون به صورت دو طرفه در مدت زمان ۱۲ دقیقه تزریق شد (۲۰).

پروتکل تمرین هوازی: تمرینات هوازی با استفاده از تردمیل مخصوص موش انجام شد. تمرین متوسط با تردمیل به وسیله راه رفتن آرام به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸/۱ متر در دقیقه آغاز شده و پس از آن هر ۳ دقیقه سرعت افزایش یافته تا به شدت فعالیت متوسط ۴۵ درصد توان هوازی برسد. تعداد تکرارها در تمرینات شدت متوسط در هفته‌ی اول با ۱ تکرار شدت ۴۵ درصد و با سرعت ۱۰-۱۵ متر در دقیقه و ۲ تکرار ریکاوری با شدت ۲۵ درصد آغاز شده و تا هفته‌ی هشتم با ۶ تکرار با شدت ۴۵ درصد توان هوازی با سرعت ۱۵ متر در دقیقه و ۳ تکرار ریکاوری با شدت ۲۰ درصد توان هوازی و ۷ متر در دقیقه و زمان کل یک جلسه‌ی ۴۵ دقیقه انجام شد (۸، ۲۱).

**تهیه‌ی ترکیبات زیست فعال لینالول، سینانول،  $\beta$ -بوربونین:** ترکیبات لینالول و سناتول از کمپانی Sigma-Aldrich (ایالات متحده آمریکا) و  $\beta$ -بوربونین از (J&H Product) خریداری شد. دوز ایمن مورد استفاده از هر ترکیب بر اساس مقالات مشخص گردید و به صورت لینالول با غلظت ۵/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، سینانول با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، بتا بوربونین با غلظت ۷۲ میلی‌گرم/کیلوگرم است (۲۲-۲۴).

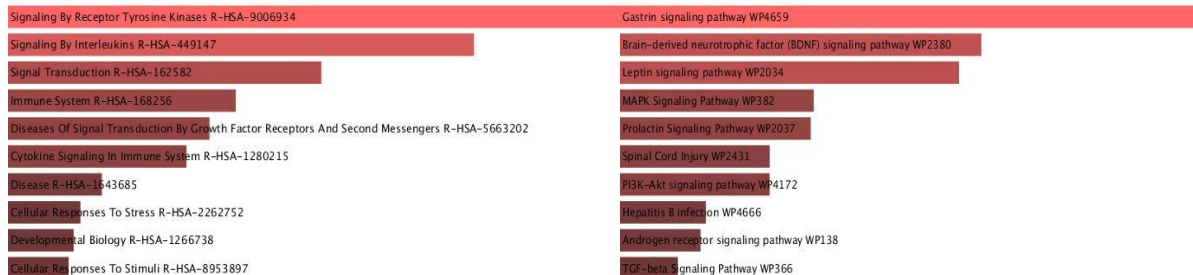
**تست تشخیص شیء جدید:** یک جعبه مربع پلاستیکی سفید (L × W × H, 52 × 51 × 30 cm) به عنوان محیطی برای آزمایش

**تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی:** در این مطالعه از الگوریتم‌های مختلف بیوانفورماتیکی و شبکه‌ی میانکشی‌های پروتئین-پروتئین برای شناسایی مهم‌ترین ژن‌های دخیل در پاتوژنز آلزایمر استفاده شده است. بدین منظور از پایگاه داده DisGeNET برای بدست آوردن لیست ژن‌های مرتبط با آلزایمر (C0002395) با  $\text{score} \text{ gda} < 0.1$  بهره گرفتیم. شبکه‌ی میانکشی‌های پروتئین-پروتئین در پایگاه داده STRING 11.0 رسم شد و آنالیز شبکه بر اساس پارامترهای درجه و مرکزیت انجام گرفت. مسیرهای مولکولی و کلیدی در ارتباط با ژن‌ها بر اساس الگوریتم داده کاوی مشخص شدند. از میان ۵۷ پروتئین کلیدی جمع‌آوری شده بر اساس آنالیز داده‌های بیوانفورماتیکی، سه پروتئین NGF و BDNF و CREB مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت. ژن‌های هاب در شبکه‌ی پروتئینی به عنوان پروتئین‌های با قابلیت طراحی دارو در پیری و آلزایمر از طریق روش‌های *In-silico* شناسایی شدند.

**القای آلزایمر:** الیگومر  $A\beta 1-42$  از کمپانی سیگما آلدریچ خریداری شد. به طور خلاصه،  $A\beta 1-42$  مصنوعی (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا) به مدت ۲۰ دقیقه در هگزافلوروایزوپروپانول (HFIP) سرد (Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا) حل شد و سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه برای تشکیل مونومرهای  $A\beta 1-42$  ورتکس شد. مونومرهای  $A\beta 1-42$  با اسپین خلاء، رسوب‌دهی و در نهایت در محلول HFIP ۱۰ درصد حل شدند. محلول  $A\beta 1-42$  پس از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت تحت هم زدن مداوم در دمای اتاق، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت‌ها جدا و به لوله‌های از قبل سرد شده منتقل شدند. ۵۰ میکرومولار الیگومرهای محلول  $A\beta 1-42$  پس از تبخیر کامل HFIP جمع‌آوری شد. محلول الیگومر  $A\beta 1-42$  تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

موش‌های ماده C57BL/6 عموماً با تجویز داخل صفاقی پتوباریتال سدیم ۰/۲ درصد (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند و سپس در





الف

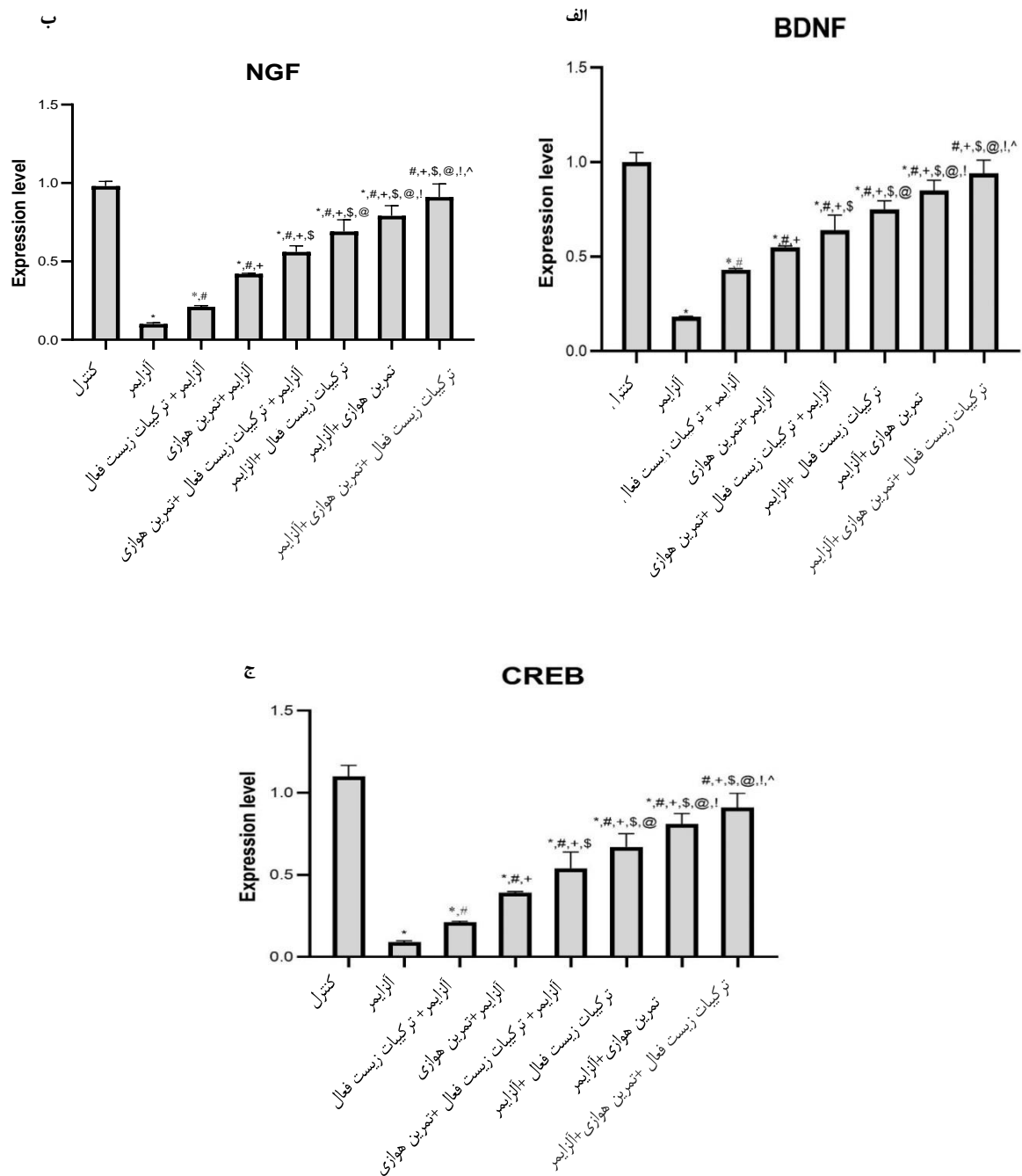
ب

شکل ۳. داده‌کاوای ژن‌های کلیدی بر اساس پایگاه داده KEGG

در گروه ترکیبات زیست فعال + تمرین هوازی + آلزایمر نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد (شکل ۴ الف-ج). نتایج نشان داده است که افزایش میزان بیان ژن *Creb* و *Bdnf*, *Ngf* در گروه ترکیبات زیست فعال + تمرین هوازی + آلزایمر نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر رخ داده است. نتایج اخیر حاکی از تأثیر حفاظتی تمرینات هوازی و ترکیبات لینالول، سنثول و  $\beta$ -بوربونین بر روند آلزایمری شدن می‌باشد (شکل ۴ الف-ج). موش‌های گروه سالم شئ جدید را برای مدت طولانی‌تری در مقایسه با شئ آشنا کاوش کردند ( $P < 0/01$ ). علاوه بر این، موش‌های شاهد، کاوش ( $P < 0/01$ ) بیشتری را برای شئ جدید در مقایسه با شئ آشنا نشان دادند که نشان می‌دهد این موش‌ها زمان بیشتری را صرف کاوش شئ جدید می‌کنند در حالی که گروه آلزایمر، این کار را انجام ندادند است، که نشان می‌دهد گروه آلزایمر دارای یک اختلال حافظه، نسبت به سایر گروه‌های تجربی بود. از سویی، میزان کاوش و شناسایی شئ جدید در موش‌های آلزایمری تحت تیمار ترکیبات زیست فعال (گروه آلزایمر + ترکیبات زیست فعال) نسبت به گروه تحت تیمار با بتا آمیلوئید (گروه آلزایمر) افزایش یافته است (شکل ۵). همچنین، میزان کاوش و شناسایی شئ جدید موش‌های گروه آلزایمر + تمرین هوازی نسبت به گروه آلزایمر افزایش یافته است (شکل ۵). علاوه بر این، میزان کاوش و شناسایی شئ جدید در گروه آلزایمر + ترکیبات زیست فعال + تمرین هوازی نسبت به گروه آلزایمر، آلزایمر + ترکیبات زیست فعال، نسبت به گروه آلزایمر + تمرین هوازی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل ۵). در این مطالعه مشاهده شد که موش‌های سالم که ابتدا تحت تیمار ترکیبات زیست فعال و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (گروه ترکیبات زیست فعال + آلزایمر) میزان کاوش و شناسایی شئ جدید نسبت به گروه آلزایمر و گروه آلزایمر + ترکیبات زیست فعال افزایش یافته است. علاوه بر این، موش‌های سالم که ابتدا تحت تیمار با تمرین هوازی بودند و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (گروه تمرین هوازی + آلزایمر) زمان بیشتری جهت کاوش و شناسایی شئ جدید نسبت به گروه آلزایمر صرف کرده بودند (شکل ۵).

با توجه به نمودار (۴ الف-ج) نتایج به دست آمده مشخص شده است که میزان بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* در گروه آلزایمر تحت تیمار با بتا آمیلوئید (گروه آلزایمر) نسبت به سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری کاهش یافته است ( $P < 0/01$ ). از سویی، میزان بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* در موش‌های آلزایمری تحت تیمار ترکیبات زیست فعال (گروه آلزایمر + ترکیبات زیست فعال) نسبت به گروه تحت تیمار با بتا آمیلوئید (گروه آلزایمر) افزایش یافته است (شکل ۴ الف-ج). همچنین، موش‌های آلزایمری تحت تیمار با تمرین هوازی به وسیله‌ی تردمیل با شدت متوسط به مدت ۸ هفته (گروه آلزایمر + تمرین هوازی) نسبت به گروه تحت تیمار با بتا آمیلوئید (گروه آلزایمر) افزایش یافته است (شکل ۴ الف-ج). قابل توجه است که، بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* در موش‌های آلزایمری تحت تیمار با ترکیبات زیست فعال و تمرین هوازی به مدت ۸ هفته (آلزایمر + ترکیبات زیست فعال + تمرین هوازی) نسبت به گروه آلزایمر، آلزایمر + ترکیبات زیست فعال، آلزایمر + تمرین هوازی افزایش معنی‌داری یافته است (شکل ۴ الف-ج).

در این مطالعه مشاهده شد که موش‌های سالم که ابتدا تحت تیمار ترکیبات زیست فعال قرار گرفتند میزان بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* نسبت به گروه آلزایمر و آلزایمر + ترکیبات زیست فعال افزایش یافته است. علاوه بر این، موش‌های سالم که ابتدا تحت تیمار با تمرین هوازی بودند و سپس مبتلا به آلزایمر شدند (گروه تمرین هوازی + آلزایمر) میزان بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* نسبت به گروه آلزایمر افزایش یافته است (شکل ۴ الف-ج). از سویی، نتایج نشان داده است که انجام تمرینات ورزشی هوازی می‌تواند از کاهش بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* در زمان ابتلا به آلزایمر جلوگیری کند (شکل ۴ الف-ج). بر این اساس، داده‌ها نشان داد که افزایش بیان ژن‌های *Bdnf*, *Ngf* و *Creb* در گروه تمرین هوازی + آلزایمر نسبت به گروه آلزایمر + تمرین هوازی بیشتر است. از نکات برجسته‌ی این مطالعه، تأثیر معنی‌دار و سینرژیک تمرین هوازی و ترکیبات زیست فعال بر میزان بیان ژن *Bdnf*, *Ngf* و *Creb*



شکل ۴. میزان تغییرات بیان mRNA در بافت مغز. الف، میزان بیان نسبی ژن BDNF. ب، میزان بیان نسبی ژن Ngf. میزان بیان نسبی ژن Creb.

\* نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها می‌باشد. # نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه آلزایمر و سایر گروه‌ها می‌باشد. + نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه آلزایمر+داروی گیاهی و سایر گروه‌ها می‌باشد. \$ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه آلزایمر+تمرین هوازی و سایر گروه‌ها می‌باشد. @ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه آلزایمر+داروی گیاهی+تمرین هوازی و سایر گروه‌ها می‌باشد. ^ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه داروی گیاهی+آلزایمر و سایر گروه‌ها می‌باشد. ^ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه تمرین هوازی+آلزایمر و سایر گروه‌ها می‌باشد.

اختلالات شناختی در موش‌های مبتلا به آلزایمر دارند. بیان Bdnf، Ngf و Creb در گروه آلزایمر نسبت به سایر گروه‌ها بطور معنی داری کاهش یافته است. علاوه بر این، انجام تمرینات هوازی، و

### بحث

در این مطالعه بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، مشخص گردید که ژن‌های Ngf، Bdnf و Creb دارای نقش مهمی در



حوازی A $\beta$  25-35 برای ۲۴ ساعت دیگر جایگزین کردند (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر خدادادی و همکاران به بررسی تأثیر پیش‌آماده‌سازی تمرینات ورزشی به مدت ۴ هفته بر روی حافظه و سطح آمیلوئید بتای پلاسما و هیپوکامپ رت‌های القا شده با A $\beta$ 1-42 پرداختند. نتایج آن‌ها حاکی از کاهش سطح آمیلوئید بتا در هیپوکامپ و افزایش آن در پلاسما در گروه ورزش-آلزایمر نسبت به گروه بی‌تحرك-آلزایمر بود. همچنین سطح حافظه و یادگیری فضایی رت‌های گروه ورزش-آلزایمر نسبت به گروه بی‌تحرك-آلزایمر افزایش معنی‌نشان داده است (۳۰). یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی ما با خدادادی و همکاران (۳۰) همسو بود و ما نشان دادیم نه تنها فعالیت بدنی منظم از عوارض شدید ناشی از تریقی آمیلوئید بتا در موش‌های ماده جلوگیری می‌کند، بلکه تمرینات ورزشی پس از القای آلزایمر می‌تواند عوارض آلزایمر را در هیپوکامپ کاهش داده و معکوس کند.

از طرفی Sabogal-Guáqueta و همکاران به بررسی اثرات تجویز خوراکی لینالول (۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم)، هر ۴۸ ساعت به مدت ۳ ماه، در موش‌های سالخورده (۲۱-۲۴ ماهه) و یک مدل تراریخته‌ی سه‌گانه‌ی موش‌های AD پرداختند. موش‌های تراریخته‌ی سه‌گانه‌ی آلزایمر تحت درمان با لینالول، یادگیری و حافظه‌ی مکانی و رفتار ارزیابی خطر بیشتر را در طول پیچ و خم بالا نشان دادند. هیپوکامپ و آمیگدال از موش‌های تراریخته‌ی سه‌گانه‌ی آلزایمر تحت درمان با لینالول، کاهش قابل توجهی در  $\beta$ -آمیلوئیدوز خارج سلولی، تائوپاتی، آستروگلیوز و میکروگلیوز و همچنین کاهش قابل توجهی در سطح نشانگرهای التهابی MAPK، P38، NOS2، COX2 و IL-1 $\beta$  نشان دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که لینالول نشانه‌های بافت‌شناسی بیماری آلزایمر را معکوس می‌کند و عملکردهای شناختی و عاطفی را از طریق یک اثر ضدالتهابی بازیابی می‌نماید. بنابراین، لینالول ممکن است کاندیدای پیشگیری از بیماری آلزایمر برای مطالعات بالینی باشد (۱۰).

### نتیجه‌گیری

این مطالعه، پروتئین‌های کاندیدای جدید را برای پیش‌آگهی، تشخیص و رویکردهای درمانی آلزایمر بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک و مطالعات آزمایشگاهی مشخص کرد. بر اساس نتایج بدست آمده، تمرین هوازی با شدت متوسط به همراه مصرف ترکیبات زیست فعال را می‌توان به عنوان رویکرد جدیدی جهت بهبودی بر عملکرد حافظه و کاهش علائم آلزایمر و روند پیری پیشنهاد نمود.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)

غشاء می‌شود که به نام Ras شناخته می‌شود. عامل تبادل نوکلئوتید گوانین فعال‌سازی Ras را از طریق فرایند تبادل GDP-GTP واسطه می‌کند. پروتئین فعال Ras چندین پروتئین را به همراه سرین/ترئونین کیناز Raf فسفریله می‌کند. Raf به نوبه‌ی خود آبشار MAPK را برای تسهیل فعال‌سازی ریبوزومی RSK کیناز و تنظیم رونویسی فعال می‌کند. هر دو Akt و RSK اجزای مسیره‌ای PI3K-Akt و MAPK به ترتیب، برای فسفریله کردن فاکتور رونویسی پیونددهنده‌ی پروتئین پاسخ AMP حلقوی (CREB) عمل می‌کنند. CREB فسفریله شده به هسته منتقل می‌شود و باعث افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز می‌گردد، بنابراین بقای سلولی با واسطه‌ی NGF را افزایش می‌دهد. با این حال، در غیاب NGF، بیان پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک زمانی افزایش می‌یابد که فعال شدن فاکتورهای رونویسی محرک مرگ سلولی مانند c-Jun توسط مسیره‌های بقای سلولی با واسطه‌ی NGF سرکوب نشود. Tuszynski و گزارش دادند که ژن‌درمانی BDNF ممکن است بهتر از ژن‌درمانی NFG در درمان AD باشد (۱۸، ۱۹).

عصاره‌های گیاهی به عنوان یک داروی جایگزین برای به تأخیر انداختن پیشرفت AD پیشنهاد شده‌اند و برخی از عصاره‌ها از طریق تنظیم BDNF کار می‌کنند. درمان با رزوراترول با افزایش بیان BDNF هیپوکامپ، استرس اکسیداتیو و نقایص شناختی را در مدل موش زوال عقل عروقی بهبود می‌بخشد. تجویز مزمن کورکومین، ماده‌ی فعال اصلی زردچوبه، اختلالات شناختی مرتبط با AD را از طریق تنظیم مثبت سیگنال‌های BDNF/ERK و Akt/GSK3 $\beta$  در هیپوکامپ کاهش می‌دهد.

Hajibabaie و همکاران در یک مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی، یک کوکتل دارویی شامل ترکیبات مؤثره مشتق از سیر، فلفل سیاه، مریم گلی، زیره سیاه، سیاهدانه، انجیر، انگور فرنگی، شنبلیله، مرکبات، ترادیوم، زنجبیل، انواع توت‌ها، انگور قرمز، پیاز، چای سبز، سیب، بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات را به عنوان یک ترکیب مؤثر که به طور بالقوه پروتئین‌های هاب و مسیره‌های سیگنالینگ مولکولی را در آلزایمر تعدیل می‌کند، ارائه کردند. همچنین، آن‌ها به بررسی مجموعه داده‌های ژنومیکس در مورد تأثیر میزان فعالیت بدنی در سنین بالا و با شرایط آلزایمر پرداختند و نشان دادند که فعالیت بدنی با شدت بالا در مقایسه با بی‌تحركی می‌تواند سطح بیان ژن‌های هیپوکامپ را به طور قابل توجهی به شرایط نرمال نزدیک کند (۴).

مطالعه‌ی دیگری اثر پیش‌تیمار ۱/۸ سینتول را بر التهاب ناشی از A $\beta$  25-35 در سلول‌های PC۱۲ تمایز یافته نشان می‌دهد. در این مطالعه Khan و همکاران سلول‌ها را با دوزهای مختلف ۱/۸ سینتول به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار دادند و سپس با محیط‌های



قدردانی را داریم.

و جناب آقای نوید عابدپور در انجام این تحقیق کمال تشکر و

## References

- Sommerlad A, Perera G, Singh-Manoux A, Lewis G, Stewart R, Livingston G. Accuracy of general hospital dementia diagnoses in England: sensitivity, specificity, and predictors of diagnostic accuracy 2008-2016. *Alzheimers Dement* 2018; 14(7): 933-43.
- Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014; 76(Pt A): 27-50.
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7(1): 33.
- Hajibabaie F, Abedpoor N, Taghian F, Safavi K. A cocktail of polyherbal bioactive compounds and regular mobility training as senolytic approaches in age-dependent alzheimer's: the in silico analysis, lifestyle intervention in old age. *J Mol Neurosci* 2023; 73(2-3): 171-84.
- Liang YJ, Su QW, Sheng ZR, Weng QY, Niu YF, Zhou HD, et al. Effectiveness of physical activity interventions on cognition, neuropsychiatric symptoms, and quality of life of Alzheimer's disease: An update of a systematic review and meta-analysis. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 830824.
- Kivimäki M, Singh-Manoux A, Pentti J, Sabia S, Nyberg ST, Alfredsson L, et al. Physical inactivity, cardiometabolic disease, and risk of dementia: an individual-participant meta-analysis. *BMJ* 2019; 365: 11495.
- Lubitz I, Ricny J, Atrakchi-Baranes D, Shemesh C, Kravitz E, Liraz-Zaltsman S, et al. High dietary advanced glycation end products are associated with poorer spatial learning and accelerated A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model. *Aging Cell* 2016; 15(2): 309-16.
- Abedpoor N, Taghian F, Hajibabaie F. Physical activity ameliorates the function of organs via adipose tissue in metabolic diseases. *Acta Histochem* 2022; 124(2): 151844.
- Meng Q, Lin MS, Tzeng IS. Relationship between exercise and Alzheimer's disease: A narrative literature review. *Front Neurosci* 2020; 14: 131.
- Sabogal-Guáqueta AM, Osorio E, Cardona-Gómez GP. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology* 2016; 102: 111-20.
- Khameneh E, Yaghmaei P, Ghobeh M. The effect of cineole on biochemical, behavioral and histological parameters in Alzheimer's male wistar rat model [in Persian]. *J Anim Biol* 2022; 14(4): 119-33.
- An F, Bai Y, Xuan X, Bian M, Zhang G, Wei C. 1, 8-Cineole ameliorates advanced glycation end products-induced Alzheimer's disease-like pathology in vitro and in vivo. *Molecules* 2022; 27(12): 3913.
- Wang Z, Liu F, Yu JJ, Jin JZ.  $\beta$ -Bourbonene attenuates proliferation and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncol Lett* 2018; 16(4): 4519-25.
- Shim KH, Sharma N, An SSA. Mechanistic insights into the neuroprotective potential of sacred ficus trees. *Nutrients* 2022; 14(22): 4731.
- Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2000; 23(12): 639-45.
- Wang ZH, Xiang J, Liu X, Yu SP, Manfredsson FP, Sandoval IM, et al. Deficiency in BDNF/TrkB neurotrophic activity stimulates  $\delta$ -secretase by upregulating C/EBP $\beta$  in Alzheimer's disease. *Cell Rep* 2019; 28(3): 655-69.e5.
- Guo CC, Jiao CH, Gao ZM. Silencing of LncRNA BDNF-AS attenuates A $\beta$ 25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by suppressing cell apoptosis and oxidative stress. *Neurol Res* 2018; 40(9): 795-804.
- Wang H, Wang R, Thrimawithana T, Little PJ, Xu J, Feng ZP, et al. The nerve growth factor signaling and its potential as therapeutic target for glaucoma. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 759473.
- Tuszynski MH, Nagahara AH. NGF and BDNF gene therapy for Alzheimer's disease. In: Tuszynski MH, editor. *Translational neuroscience: fundamental approaches for neurological disorders*. New York, NY: Springer; 2016. p. 33-64.
- Mohammadpour JD, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Fathollahi Y, Motamedi F, Rohampour K. Non-selective NSAIDs improve the amyloid- $\beta$ -mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 132: 33-41.
- Abedpoor N, Taghian F, Ghaedi K, Niktab I, Safaeinejad Z, Rabiee F, et al. PPAR $\gamma$ /Pgc-1 $\alpha$ -Fndc5 pathway up-regulation in gastrocnemius and heart muscle of exercised, branched chain amino acid diet fed mice. *Nutr Metab (Lond)* 2018; 15(1): 59.
- Tian X, Liu H, Xiang F, Xu L, Dong Z.  $\beta$ -Caryophyllene protects against ischemic stroke by promoting polarization of microglia toward M2 phenotype via the TLR4 pathway. *Life Sci* 2019; 237: 116915.
- Bai C, Ma Q, Li Q, Yu L, Zhen D, Liu M, et al. Combination of 1, 8-cineole and beta-caryophyllene synergistically reverses cardiac hypertrophy in isoprenaline-induced mice and H9c2 cells. *Bioorg Chem* 2022; 124: 105823.
- Lee SC, Wang SY, Li CC, Liu CT. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool from the leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira in endotoxin-induced mice. *J Food Drug Anal* 2018; 26(1): 211-20.
- Mehla J, Lacoursiere SG, Lapointe V, McNaughton BL, Sutherland RJ, McDonald RJ, et al. Age-dependent behavioral and biochemical characterization of single APP knock-in mouse (APPNL-GF/NL-GF) model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2019; 75: 25-37.
- Edelmann E, Cepeda-Prado E, Franck M, Lichtenecker P, Brigadski T, Leßmann V. Theta burst firing recruits BDNF release and signaling in postsynaptic CA1 neurons in spike-timing-dependent

- LTP. *Neuron* 2015; 86(4): 1041-54.
27. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, et al. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(23): E3067-74.
28. Castle MJ, Baltanás FC, Kovacs I, Nagahara AH, Barba D, Tuszynski MH. Postmortem analysis in a clinical trial of AAV2-NGF gene therapy for Alzheimer's disease identifies a need for improved vector delivery. *Hum Gene Ther* 2020; 31(7-8): 415-22.
29. Khan A, Vaibhav K, Javed H, Tabassum R, Ahmed ME, Khan MM, et al. 1, 8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2014; 39: 344-52.
30. Khodadadi D, Gharakhanlou R, Naghdi N, Salimi M, Azimi SM, Shahed A. The effect of 4 weeks of exercise preconditioning on soluble amyloid beta level and memory impairment in rats with Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 1-42 injection [in Persian]. *Razi J Med Sci* 2018; 24(165): 66-76.

## The Effect of Linalool, Cineole, Beta bourbonin and Aerobic Exercises as Protective Approaches in Mice with Alzheimer's Disease

Zainab Alimoradi<sup>1</sup>, Farzaneh Taghian<sup>2</sup>, Khosro Jalali Dehkordi<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Alzheimer's disease is a progressive neurological disorder associated with aging. The research aims to determine the effect of eight weeks of aerobic exercise and consumption of linalool, cineole and beta bourbonin on the prevention and improvement of the cognitive process of mice with Alzheimer's disease.

**Methods:** 48 C57BL/6 female mice with an average age of 15 months were randomly divided into 8 groups of 6 each. Bioactive compounds include linalool with a concentration of 5.2 mg/kg, cineole with 100 mg/kg, beta bourbonin with a concentration of 72 mg/kg, administered by gavage, and moderate-intensity aerobic exercise for 8 weeks. Bioinformatics analysis of Bdnf, Ngf and Creb genes selected and measured by qPCR-Real Time.

**Findings:** The expression of Bdnf, Ngf and Creb increased in Alzheimer+ bioactive compounds, Alzheimer+ aerobic exercise and Alzheimer+ bioactive compounds + aerobic exercise compared to Alzheimer group. Aerobic exercises and consumption of bioactive compounds before induction of Alzheimer's disease enhance Bdnf, Ngf, and Creb, indicating a protective effect in Alzheimer's disease. A synergistic effect was observed in the group of bioactive compounds + aerobic exercise + Alzheimer on the expression of genes compared to other groups. In addition, the rate of new object recognition in Alzheimer + bioactive compounds + aerobic exercise compared to other groups was increased.

**Conclusion:** The decrease in Bdnf, Ngf, and Creb gene expression in the bioactive compounds+aerobic exercise+Alzheimer group was slighter than in other groups, indicating a protective effect on the process of Alzheimer's.

**Keywords:** Alzheimer's disease; Bioinformatics; Exercise; Bdnf; Bioactive compounds

**Citation:** Alimoradi Z, Taghian F, Jalali Dehkordi K. **The Effect of Linalool, Cineole, Beta bourbonin and Aerobic Exercises as Protective Approaches in Mice with Alzheimer's Disease.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(711): 148-58.

1- PhD Candidate, Department of Sports Physiology, School of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Sports Physiology, School of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Farzaneh Taghian, Associate Professor, Department of Sports Physiology, School of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran; Email: ft.taghian@gmail.com