Journal of Animal Biology, Summer 2024; 16(4):235-246

Research Article

The effect of Nerolidol on the Superoxide Dismutase Enzyme Levels and mRNA Expression of CREB-1 Gene in Alzheimer's Model of Male Wistar Rats

Peyman Taheri[1], Zahra Hajebrahimi[2*], Parichehreh Yaghmaei [1], Kazem Parivar[1]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran
*Corresponding author: hajebrahimi@ari.ac.ir

Received: 16 December 2023 Accepted: 31 January 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.4011587

Abstract

Alzheimer's is the most important cause of neurological deterioration among elderly people, which is accompanied by the formation of amyloid plaques in the hippocampus region of the brain. One of the most important factors causing and progressing the disease is inflammation and oxidative stress. Nerolidol with antioxidant and anti-inflammatory properties is one of the secondary metabolites in some plants. CREB is one of the gene transcription factors that play a significant role in hippocampal neurons. The present study aimed to study the effect of nerolidol on the expression changes of the CREB-1 gene and superoxide dismutase enzyme in Alzheimer's model induced by beta-amyloid in male Wistar rats. The number of 48 male Wistar rats were divided into 8 groups including control, sham, Alzheimer's model, drug solvent, Alzheimer's with donepezil, Alzheimer's with nerolidol dose 50 and 100 mg/kg and protective group (treatment with nerolidol before induction of Alzheimer's). Biochemical analysis of the hippocampus, Real-Time PCR, and statistical analysis of data were performed using one-way analysis of variance and Tukey's test. Alzheimer's disease decreased CREB-1 gene expression and superoxide dismutase enzyme levels in the hippocampus. Donepezil and nerolidol, especially in the 100 dose and protective group, reduced Alzheimer's symptoms by increasing CREB-1 gene expression and superoxide dismutase enzyme levels. These findings indicate the antioxidant properties of nerolidol. Therefore, nerolidol may be effective in improving Alzheimer's disease and the damage caused by it, and it can probably be effective in preventing Alzheimer's in susceptible people with a family history of Alzheimer's.

Keywords: Alzheimer's disease, Nerolidol, CREB-1 gene, Superoxide dismutase enzyme.

زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۲۴۶-۲۳۵

مقاله پژوهشی

تاثیر نرولیدول بر میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز و بیان mRNAی ژن CREB-1 در مدل آلزایمر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

پیمان طاهری[۱]، زهرا حاج ابراهیمی[۲*]، پریچهره یغمایی[۱]، کاظم پریور[۱]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه ازاد اسلامی، تهران، ایران

۲- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hajebrahimi@ari.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

DOI: 10.60833/ascij.2024.4011587

چکیده

آلزایمر مهمترین عامل زوال عصبی در بین افراد سالمند می‌باشد که همراه با تشکیل پلاک های آمیلوئیدی در ناحیه هیپوکامپ مغز می‌باشد. از مهمترین عوامل ایجاد کننده و پیشرفت بیماری، التهاب و استرس اکسیداتیو است. نرولیدول با آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی جزء متابولیت های ثانویه در برخی گیاهان است. پروتئین CREB یکی از عوامل نسخه برداری ژنی می‌باشد که نقش بسزایی در نورون‌های هیپوکامپ دارد. هدف از پژوهش حاضر مطالعه تاثیر نرولیدول بر تغییرات بیانیmRNAی ژن CREB-1 و آنزیم سوپراکسید دسموتاز در مدل آلزایمر تالقا شده با بتا آمیلوئید موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود. تعداد ۴۸ سر رت نر ویستار به ۸ گروه شامل کنترل، شم، مدل آلزایمری، حلال دارو، آلزایمر و تیمار با دونپزیل، آلزایمر و تیمار با نرولیدول دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه محافظتی (تیمار با نرولیدول قبل از القای آلزایمر) تقسیم شدند. سنجش بیوشیمیایی هیپوکامپ، واکنش ریل تایم PCR و آنالیز آماری داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و تست *Tukey* انجام شد. آلزایمر موجب کاهش بیان ژن CREB-1 و آنزیم سوپراکسید دسموتاز در هیپوکامپ شد. دونپزیل و نرولیدول به ویژه در دوز ۱۰۰ و گروه محافظتی، موجب کاهش علایم آلزایمر ازطریق افزایش بیان ژن CREB-1 و میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز شد. این یافته ها بیانگر خواص آنتی اکسیدانتی نرولیدول می‌باشد. بنابراین نرولیدول ممکن است در بهبود بیماری آلزایمر و آسیب های ناشی از آن موثر باشد و احتمالا می‌تواند در پیشگیری آلزایمر در افراد مستعد و با سابقه فامیلی آلزایمر موثر باشد.

کلمات کلیدی: آلزایمر، نرولیدول، **ژن CREB-1**، **آنزیم سوپراکسید دسموتاز**.

مقدمه

آلزایمر یکی از شایع ترین و مهم‌ترین بیماری‌های سیستم عصبی است و به عنوان یکی از اختلالات پیش رونده و غیرقابل بازگشت مغز شناخته می‌شود که باعث از بین رفتن حافظه و دیگر عملکردهای مغز می‌شود (۲). در این بیماری مرگ نورون‌های قشر مغز و هیپوکامپ هدف اصلی دژنراسیون نورونی هستند. از آنجا که بیماری‌های مرتبط با سن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند بنابراین آلزایمر که یکی از این

بیماری‌ها است اهمیت زیادی دارد (۱۶). بیش از ٤٤ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به آلزایمر هستند که براساس برآوردهای انجام شده، تخمین زده شده است که این میزان در سال ۲۰۳۰ و ۲۰۵۰ به ترتیب دو و سه برابر خواهد شد (٦). از اصلی‌ترین عوامل ایجاد این بیماری می‌توان به پروتیئن بتا آمیلوییید (β-amyloid) و پروتیئن تائو(tau) اشاره کرد (۹). تجمعات غیر طبیعی بتا آمیلویئد در بخش خارج سلول و از طرفی فولدینگ اشتباه پرویتئن ساختاری تائو در قسمت آکسون نورون‌ها در بخش داخل سلول می‌تواند سبب اختلال در ارتباطات شبکه نورونی شود که در نهایت سبب از کار افتادگی نورون‌ها و ارتباط آنها می–شود (۵، ۱۹). با بررسی‌های بافتی مغز افراد مبتلا به آلزایمر مشخص شده است که التهاب در سلول‌های عصبی و استرس اکسیداتیو به عنوان دو عامل خطر در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر می‌باشد (۸). تاماگنو و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که استرس اکسیداتیو می‌تواند بیان آنزیم مسئول شکستن پروتئین پیش ساز بتا آمیلوئید ۱ (BACE1) را افزایش دهد و برش BACE1 توسط آنزیم بتا سکرتاز و گاما سکرتاز می‌تواند تولید بتا آمیلوئید را در مغز افراد مبتلا به آلزایمر افزایش دهد (۲۲). پروتئین CREB (cAMP-response element binding protein) یکی از عوامل نسخه‌برداری ژنی می‌باشد که نقش به سزایی در نورون‌های هیپوکامپ دارد. مشخص شده است که با اشکال در بیان ژن CREB، حافظه بلند مدت دچار اشکال خواهد شد چرا که CREB سبب تنظیم فعالیت پروتئینی بسیاری از پروتئین های درگیر در سیناپس و انتقال عصبی می‌شود و در واقع یک پروتئین دخیل در تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلند مدت است (۲۵).

یکی از داروهایی که امروزه برای درمان بیماری آلزایمر استفاده می‌شود داروی دونپزیل (Donepezil) می‌باشد که مهار کننده کولین استرازی است و با مهار استیل کولین استراز موجب کاهش علایم بیماری تاحدودی می گردد (۱۵). ازآنجا که تاکنون دارویی که به طور کامل بیماری آلزایمر را درمان کند معرفی نشده است تلاش برای یافتن داروهای جدید و موثرتر ادامه دارد. نرولیدول (Nerolidol) که با نام های پرویول (peruviol) و پنترول (penetrol) نیز شناخته می‌شود؛ یک روغن زرد رنگ است که در گیاهانی از جمله زنجبیل، نارنج و گل لوندر و یاسمن یافت می گردد (۱۲). به لحاظ خواص شیمیایی، نرولیدول درگروه خانواده ترپن ها و در واقع سزکوئی ترپن می‌باشد (۲۰). امروزه مشخص شده است که نرولیدول دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضد درد، ضد التهابی وهمچنین آنتی کولین استرازی است که می‌تواند در درمان بیماری های نورودژنرتیو بسیار کار آمد باشد (٤). با توجه به موارد ذکر شده، در مطالعه حاضر، اثرات نرولیدول بر بیان mRNAی ژن CREB-1 و میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD) در ناحیه هیپوکامپ مدل آلزایمر موش‌های نر نژاد ویستار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ٤٨ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. تمامی حیوانات از انیسیتو پاستور تهران خریداری شد و در حیوان خانه آزمایشگاه زیست شناسی و فیزولوژی جانوری دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و آب و غذا بصورت آزادانه در دسترس حیوانات قرار گرفت. پژوهش حاضر همچنین به تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی وابسته به

دانشگاه علوم و تحقیقات، با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.185 مصوب گردید.

گروه بندی حیوانات: حیوانات بصورت تصادفی در ۸ گروه قرار گرفتند: گروه کنترل (Control): حیواناتی که آب و غذای معمولی دریافت کردند و تحت جراحی یا تیمار دارو قرار نگرفتند. گروه شم (PBS): حیواناتی که تحت جراحی قرار گرفتند اما به جای بتا آمیلوئید، حلال بتا آمیلوئید یعنی بافر فسفات (PBS) را به میزان ۲ میکرولیتر دریافت کردند. گروه مدل آلزایمر (AD): حیواناتی که تحت جراحی قرار گرفتند و بتا آمیلوئید را به میزان ۲ میکرولیتر و به صورت دو طرفه (تزریق داخل هیپوکمپی) دریافت کردند. گروه حلال دارو (Solv): حیواناتی که تحت جراحی قرار گرفتند و بتا آمیلوئید را به میزان ۲ میکرولیتر و به صورت دو طرفه (تزریق داخل هیپوکمپی) دریافت کردند، سپس به مدت ٤ هفته حلال نرولیدول (توئین) دریافت کردند. گروه دونپزیل (DNPZ): حیوانات آلزایمری شده که به مدت ٤ هفته دونپزیل را با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. گروه نرولیدول-۵۰ (NRD-50): حیوانات آلزایمری شده که به مدت ٤ هفته نرولیدول را با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. گروه نرولیدول-۱۰۰ (NRD-100): حیوانات آلزایمری شده که به مدت ٤ هفته نرولیدول را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. گروه محافظتی (Prot): حیواناتی که در ابتدا و برای ٤ هفته نرولیدول را در دوز بالا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) دریافت کردند و سپس تحت جراحی بتا آمیلوئید قرار گرفتند و آلزایمر در آنها القا شد. جهت ایجاد مدل آلزایمر، ابتدا تمام رت‌ها وزن شدند، سپس برای بیهوشی از کتامین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و تزریق درون صفاقی استفاده شد. پس از سوار کردن استریوتاکس، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون در ناحیه CA1 هیپوکامپ با مختصات قدامی-خلفی ۳/۸، طرفی ۲/٤ و پشتی ۳/۹-۳/۲. میلی متر (۱۳) تزریق ۲ میکرولیتر بتا آمیلویید با غلظت ۱ میکروگرم در هر میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه به صورت دوطرفی (تزریق ۲ میکرو لیتر بتا آمیلویید به هر سمت از هیپوکامپ) انجام شد(۲۱). بعد از یک هفته ریکاوری، حیوانات آماده دریافت تیمار به مدت ٤ هفته بودند. پس از اتمام تیمار حیوانات بیهوش شدند و مغز آنها خارج شد و بافت ناحیه هیپوکامپ جدا شد و به منظور مطالعات مولکولی برای بیان ژن CREB-1 به روش ریل تایم RT-PCR و بررسی میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز بررسی گردید.

استخراج RNA: استخراج RNA کل سلولی توسط کیت RNXپلاس شرکت پارس توس و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام گرفت. به ازای هر ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت، ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX به ویال حاوی نمونه اضافه شد و با کمک هموژنایزر، بافت کاملا هموژن شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به ازای هر ۱ میلی لیتر ازمحلول RNX، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد و پس از ۱۵ ثانیه تکان شدید جهت مخلوط شدن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤ ^{o}C سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ فاز آبی بالایی و حاوی مولکول های RNA جدا و به ویال جدید منتقل می شد. هم حجم فاز رویی انتقال یافته، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و بعد از خوب مخلوط کردن، به مدت ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. مجدد نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و دردمای ٤ ^{o}C سانتریفیوژ شد و به رسوب ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد ب اضافه شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها به

مدت ۸ دقیقه در دور ۷۵۰۰g و خشک شدن رسوب در دمای محیط، رسوب در آب تیمارشده با DEPC (۰/۱ درصد) حل شد و در دمای منفی ۷۰ تا زمان ساخت cDNA نگهداری شد. برای بررس کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. جهت حذف هرگونه باقیمانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، به هر نمونه یک واحدآنزیم DNase I، یک میکرولیتر بافر DNase I و۱۰ واحد آنزیم RNase inhabitor اضافه گردید. ۱/۷۵ میکرولیتر آب تیمارشده با DEPC تا رسیدن به حجم ۹ میکرولیتر به هر ویال اضافه شد. در ادامه، ویال‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس یک میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی‌مولار به هر ویال اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

سنتز cDNA: ۱۰۰۰ نانوگرم از کل RNA به دست آمده که با آب فاقد RNAase تیمار شده بود مطابق پروتکل کیت ساخت cDNA شرکت پارس توس و توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس مورد رونوشت برداری معکوس قرار گرفت. سپس cDNA های سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

واکنش Real Time PCR: تکثیر ژن با هدف اندازه-گیری بیان ژن توسط واکنش ریل تایم PCR کمی و با استفاده از دستگاه Rotator gene QIAGEN و سایبرگرین BioFact™ 2X Real-Time PCR Smart mixصورت گرفت. اجزای واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت ۱۰ میکرولیتر مستر سایبر گرین بایوفکت، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمرReverse، ۱ میکرولیتر نمونه cDNA، ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز تهیه و با استفاده از دستگاه ریل تایم PCR و چرخه تکثیر ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، و ٤٠ سیکل به صورت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۲۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد تکثیر شد، میزان بیان هر ژن سنجیده شد. محصولات PCRدر ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و باندهای موردنظر، بعد از اضافه کـردن اتیدیوم بروماید جهت رنگ کردن، زیر نور فرابنفش قابل مشاهده و بررسی شدند. بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. تمام واکنش ها سه بار تکرار انجام شد. منحنی ذوب جهت اطمینان از اختصاصیت محصول PCR (تک قله ای بودن؛ شکل ۱) رسم شد. از بتا اکتین برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد (۱۲). پرایمـــر مربوط به ژن CREB-1 و بتا اکتین (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزارهای ویژه Primer3 و Gene Runner طراحی شدند.

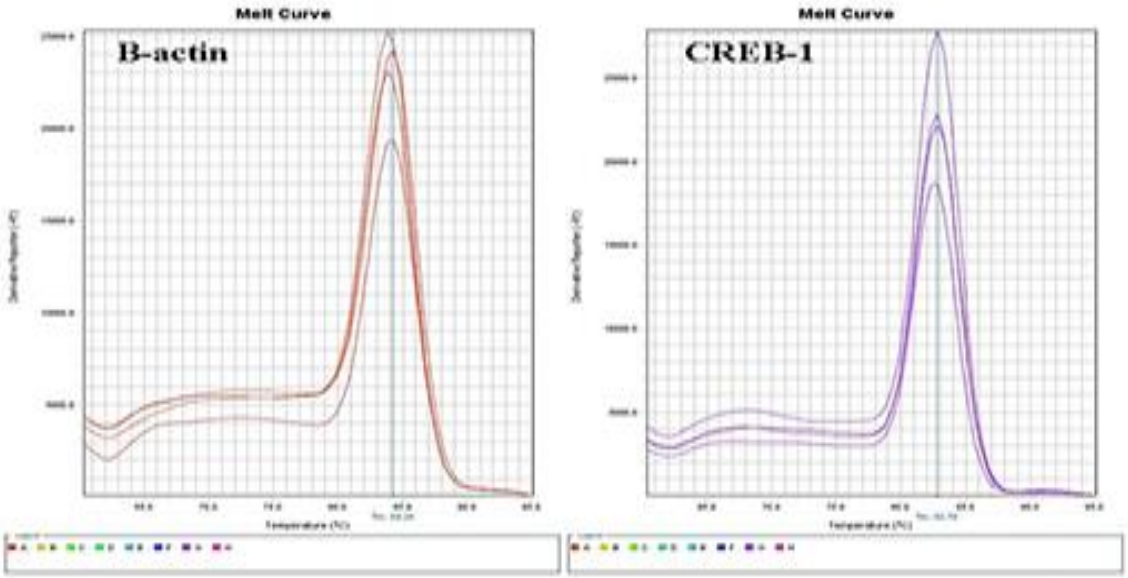
سنجش استرس اکسیداتیو: سنجش آنزیم سوپراکسید دسموتاز مطابق روش کار کیت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز ساخت شرکت نوند سلامت (ارومیه، ایران) انجام شد. ابرای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت مغزی در ناحیه هیپوکامپ جدا شد و با استفاده از بافر فسفات به طور کامل شسته شد. سپس میزان ۱ میلی لیتر بافر لیز کننده (*Lysing*) به آن اضافه شد و هموژن شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ قرار داده شد و مایع رویی به منظور انجام ادامه مراحل جدا شد. پس از انجام مراحل کیت و طبق روش کار مندرج در دفترچه، نهایتا تغییرات جذب در دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ٥٤٠ نانومتر به مدت ۲ دقیقه صورت گرفت،

آنالیز آماری: تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way-ANOVA) و تست Tukey بررسی گردید. نتایج به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده است. ملاک استنتاج آماری (۰/۰۵ > P) می‌باشد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش ریل تایم پی سی آر

Table 1. Sequence of primers used in Real-time PCR reaction

Name	Primer sequence (5'-3')	PCR product size
CREB-F	5'- AGTGACTGAGGAGCTTGTAC -3'	128
CREB-R	5'- TGTGGCTGGGCTTGAAC -3'	
β-actin-F	5'- GCCATGGATGACGATATCGCTG-3'	146
β-actin-R	5'- CCCATACCCACCATCACACC-3'	



شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌های بتا اکتین و *CREB-1*

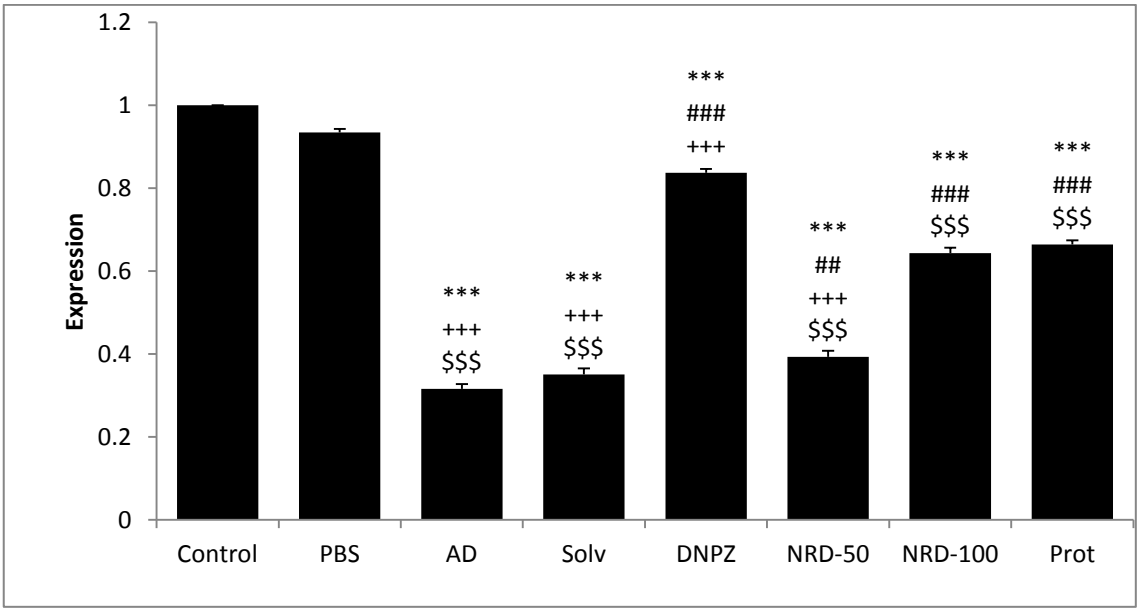
Figure 1. Melting curve of *β-actin* and *CREB-1* genes

نتایج

بیان ژن CREB-1: بررسی نتایج آماری حاصل از میزان بیان ژن CREB-1 (شکل ۲) در هیپوکامپ رت ها نشان داد که بیان آن در گروه آلزایمری و حلال دارو به میزان معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد($p < 0.001$). داروی دونپزیل به طور معناداری موجب افزایش بیان آن در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($p < 0.001$). داروی نرولیدول به ویژه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش بیان این ژن گردید. ($p < 0.001$). همچنین تیمار با نرولیدول قبل از القای آلزایمر در گروه محافظتی نیز موجب افزایش معنادار این ژن گردید ($p < 0.001$) و افزایش آن معادل با تیمار با نرولیدول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد ($p > 0.05$).

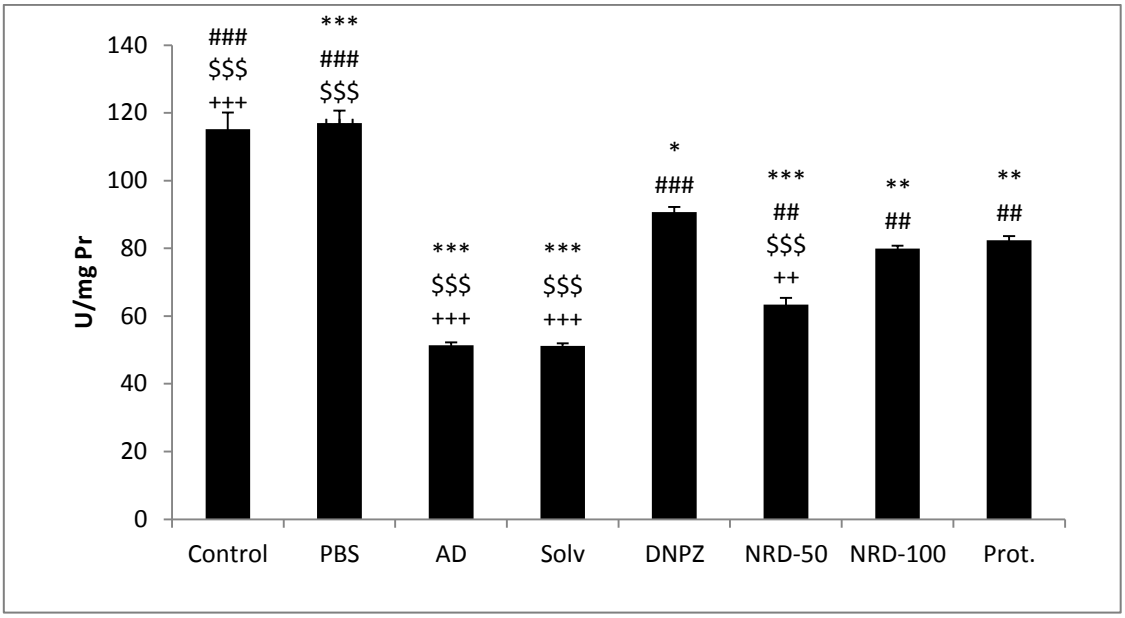
سنجش استرس اکسیداتیو: بررسی نتایج آماری حاصل از بررسی میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز (شکل ۳) در هیپوکامپ رت ها نشان داد که میزان آن در گروه آلزایمری و حلال دارو به میزان معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد($p < 0.001$). داروی دونپزیل به طور معناداری موجب افزایش میزان آن در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($P<0.001$).

داروی نرولیدول به ویژه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش بیان این آنزیم گردید. ($p < 0.001$) به طوری که در دوز ۱۰۰ موجب رسیدن میزان آن به سطح گروه دونپزیل شد. همچنین تیمار با نرولیدول قبل از القای آلزایمر در گروه محافظتی نیز موجب افزایش معنادار این آنزیم گردید ($p < 0.001$) و افزایش آن معادل با تیمار با نرولیدول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و مشابه با داروی دونپزیل بود ($p > 0.05$).



شکل ۲- میزان بیان ژن *CREB-1* در ناحیه هیپوکامپ رت. Control: گروه کنترل، PBS: گروه شم، AD: گروه آلزایمری شده توسط بتا آمیلوئید، Solv: گروه حلال بتا آمیلوئید، DNPZ: گروه تیمار شده با دونپزیل، NRD-50: گروه تیمار شده با نرولیدول با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، NRD-100: گروه تیمار شده با نرولیدول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن، Prot: گروه محافظتی که قبل از آلزایمری شدن به مدت ۲ هفته با نرولیدول ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. *** اختلاف معنی داری با گروه کنترل $p < 0.001$. ## اختلاف معنی داری با گروه آلزایمری شده $p < 0.01$. ### اختلاف معنی داری با گروه آلزایمری شده $p < 0.001$. $$$ اختلاف معنی دار با گروه تیمار شده با دونپزیل $p < 0.001$. +++ اختلاف معنی دار با گروه محافظت شده توسط نرولیدول $p < 0.001$

Figure 2- *CREB*-1 gene expression in the rat hippocampus. Control: control group, PBS: sham group, AD: Alzheimer's group using beta amyloid, Solv: beta-amyloid solvent group, DNPZ: group treated with donepezil, NRD-50: group treated with nerolidol at a dose of 50 mg/kg body weight, NRD-100: group treated with nerolidol at a dose of 100 mg/kg body weight body, Prot: protective group treated with nerolidol 100 mg/kg body weight for 2 weeks before Alzheimer's. *** Significant difference with control group $p < 0.001$. ## Significant difference with Alzheimer's group $p < 0.01$. ### Significant difference with Alzheimer's group $p < 0.001$. $$$ Significant difference with donepezil treated group $p < 0.001$. +++ Significant difference with the group protected by nerolidol $p < 0.001$.



شکل ۳- میزان آنزیم سوپراکسیددسموتاز در ناحیه هیپوکامپ رت. Control: گروه کنترل، PBS: گروه شم، AD: گروه آلزایمری شده توسط بتا آمیلوئید، Solv: گروه حلال بتا آمیلوئید، DNPZ: گروه تیمار شده با دونپزیل، NRD-50: گروه تیمار شده با نرولیدول با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، NRD-100: گروه تیمار شده با نرولیدول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن، Prot: گروه محافظتی که قبل از آلزایمری شدن به مدت ۲ هفته با نرولیدول ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. * اختلاف معنی داری با گروه کنترل $p < 0.05$ ** اختلاف معنی داری با گروه کنترل $p < 0.01$ *** اختلاف معنی داری با گروه کنترل $p < 0.001$ ## اختلاف معنی داری با گروه آلزایمری شده $p < 0.01$ ### اختلاف معنی داری با گروه آلزایمری شده $p < 0.001$ $$ اختلاف معنی دار با گروه تیمار شده با دونپزیل $p < 0.01$ $$$ اختلاف معنی دار با گروه تیمار شده با دونپزیل $p < 0.001$ ++ اختلاف معنی دار با گروه محافظت شده توسط نرولیدول $p < 0.01$ +++ اختلاف معنی دار با گروه محافظت شده توسط نرولیدول $p < 0.001$

Figure 3- The amount of superoxide desmutase enzyme in the rat hippocampus. Control: control group, PBS: sham group, AD: Alzheimer's group using beta amyloid, Solv: beta-amyloid solvent group, DNPZ: group treated with donepezil, NRD-50: group treated with nerolidol at a dose of 50 mg/kg body weight, NRD-100: group treated with nerolidol at a dose of 100 mg/kg body weight body, Prot: protective group treated with nerolidol 100 mg/kg body weight for 2 weeks before Alzheimer's. * Significant difference with control group $p < 0.05$. ** Significant difference with control group P<0.01. *** Significant difference with control group $p < 0.001$. ## Significant difference with Alzheimer's group P<0.01. ### Significant difference with Alzheimer's group P<0.001. $$ significant difference with donepezil treated group $p < 0.01$. $$$ Significant difference with donepezil treated group $p < 0.001$. ++ Significant difference with the group protected by nerolidol $p < 0.01$, +++ significant difference with the group protected by nerolidol $p < 0.001$

بحث

در پژوهش حاضر اثر نرولیدول بر بیان *mRNA* ژن *CREB-1* و میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز (*SOD*) در ناحیه هیپوکامپ مدل آلزایمر موش‌های نر نژاد ویستار بررسی شد. مطالعه ما نشان داد که در موش‌های آلزایمری بیان ژن *CREB-1* به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش می یابد و تیمار با دونپزیل و یا نرولیدول موجب جبران این کاهش در هیپوکامپ و افزایش بیان آن می گردد. پروتئین *CREB* جز تنظیم کننده های نسخه برداری در سلول‌ها شناخته می‌شود که نقش مهمی در ایجاد

حافظه دارد و منجر به تنظیم رونویسی زن های بسیاری می‌شود که برای نورون‌های دوپامینرژیک مهم می‌باشد(۱). در سال ۲۰۲۳ یانگ (*Yang*) و همکارانش به مطالعه نقش فاکتور های رونویسی در فعال کردن ژن *CREB-1* پرداختند و متوجه شدند که این ژن نقش مهمی در هومستازی بیماری آلزایمر دارد. مطالعات آنها نشان داد که فاکتور های رونویسی که سبب فعال شدن *CREB-1* می‌شود می‌تواند در پاتوژنز *AD*، مانند ترمیم نورون، حفظ فعالیت سیناپسی، حفظ بقای سلول، مهار آپوپتوز و تنظیم پاسخ‌های استرس نقش مهمی را بازی کنند(۲۵). همچنین متقی نژاد و همکارانش در سال۲۰۲۱ دریافتند مسیرسیگنالینگ *CREB-BDNF* در میانجی-گری اثرات محافظتی نورون‌های عصبی در برابر تخریب عصبی ناشی از الکل نقش مهمی دارد(۱۳). مطالعات نشان داده است که *BDNF* در بخش های از مغز که مربوط به فرایندهای یادگیری و حافظه است به میزان زیادی بیان می‌شود و پروتئین *CREB* با اتصال به پروموتور ژن *BDNF* ، در تنظیم بیان و رونویسی آن نقش دارد (۲۳، ۲٤). نتایج مطالعه ما با داده های به دست آمده توسط پوگاژنتی (*Pugazhenthi*) و همکاران در سال ۲۰۱۱ همراستا می‌باشد. آنها نشان دادند که بعد از تزریق بتا آمیلوئید به مغز رت و ایجاد مدل آلزایمری در آنها، میزان بیان ژن *CREB-1* به شدت کاهش می یابد (۱۷). نرولیدول یک روغن زرد رنگ گیاهی است که در گیاهانی از جمله زنجبیل، نارنج و گل لوندر و یاسمن یافت می گردد (۱۲). به لحاظ خواص شیمیایی، نرولیدول جز خانواده ترپن‌ها و در واقع سزکوئی ترپن می‌باشد (۲۰). امروزه مشخص شده است که نرولیدول دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضد درد، ضد التهابی وهمچنین آنتی کولین استرازی است که می‌تواند در درمان بیماری های نورودژنرتیو بسیار کار آمد باشد (٤). نرولیدول ترکیبی است که سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های بدن می‌شود. با توجه به اینکه نرولیدول توانایی عبور از سد خونی–مغزی را داراست احتمالا این اثرات آنتی اکسیدانی و همچنین اثرات نسخه برداری از ژن‌های پایین دستی که موثر در افزایش حافظه هستند را می‌تواند در تمام نواحی مغز از جمله هیپوکامپ اعمال نماید (١٤). در مطالعه حاضر مشخص شد که نرولیدول سبب افزایش بیان ژن *CREB-1* به ویژه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌شود که ممکن است این موضوع را تایید کند که نرولیدول می‌تواند درمانی برای بیماری‌های تخریب عصبی باشد. نتایج مطالعه ما با یافته‌های به دست آمده توسط *Iqubal* و همکاران در سال ۲۰۲۰ مطابقت دارد(۱۰). همچنین کاروالو (*Carvalho*) و همکارانش نشان دادند که نرولیدول در هر دو فرم سیس و ترانس توانایی مهار آنزیم استیل کولین استراز را دارد (۳). درواقع یکی از دلایل ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر از بین رفتن نورون‌های کولینرژیک می‌باشد که استیل کولین تولید می کنند. استیل کولین یک نوروترانسمیتر مهم است که فعالیت آن برای اعمال شناختی و حافظه و یادگیری ضروری می‌باشد. مطالعات نشان داده است که میزان استیل کولین در مغز بیماران آلزایمری به شدت کاهش می یابد. استیل کولین استراز آنزیمی است که موجب غیرفعال شدن استیل کولین می‌شود. بنابراین امروزه یکی از استراتژی‌ها در درمان آلزایمر استفاده از ترکیباتی مانند دونپزیل می‌باشد مهار کننده آنزیم استیل کولین استرازها می‌باشند (۷، ۱۱، ۱۸). امروزه مشخص شده است که التهاب در سلول‌های عصبی و استرس اکسیداتیو به عنوان دو عامل خطر در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر می‌باشد (۸). تاماگنو (*Tamagno*) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که استرس اکسیداتیو می‌تواند بیان آنزیم مسئول شکستن

پروتئین پیش ساز بتا آمیلوئید ۱ (*BACE1*) را افزایش دهد و برش *BACE1* توسط آنزیم بتا سکرتاز (*β-secretase*) و گاما سکرتاز (*γ-secretase*) می‌تواند تولید بتا آمیلوئید را در مغز افراد مبتلا به آلزایمر افزایش دهد(۲۲). این امر موجب شده است که دانشمندان به دنبال یافتن داروی درمان الزایمر در بین ترکیباتی باشند که خواص آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی دارد. مطالعه ما نشان داد که نرولیدول دارای خواص آنتی اکسیدانتی نیز می‌باشد و منجر به افزایش میزان سوپراکسید دسموتاز در موش‌های آلزایمری به ویژه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌شود. به طوری که میزان آن به دنبال القای آلزایمر توسط بتاآمیلوئید در گروه آلزایمری به میزان معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد. داروی دونپزیل به طور معناداری موجب افزایش میزان آن در مقایسه با گروه آلزایمری شده و داروی نرولیدول به ویژه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش بیان این آنزیم می گردد به طوری که در دوز ۱۰۰ موجب رسیدن میزان آن به سطح گروه دونپزیل شد. همچنین تیمار با نرولیدول قبل از القای آلزایمر در گروه محافظتی نیز موجب افزایش معنادار این آنزیم گردید که نشان دهنده این می‌باشد که استفاده از نرولیدول در افرادمستعد به آلزایمر و افرادی که دارای سابقه فامیلی ابتلا به آلزایمر را دارند قبل از ایجاد آلزایمر ممکن است بروز آلزایمر و پیشرفت آن را به تاخیر بیندازد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن *CREB-1* و میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز در مطالعه حاضر نشان داد که نرولیدول با توجه به خواص عبور از سد خونی مغزی و همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در مغز احتمالا می‌تواند سبب افزایش بیان ژن *CREB-1* و به دنبال آن فعال شدن فاکتورهای رونویسی دخیل در ایجاد حافظه بلند مدت شود و به این ترتیب سبب بهبود تظاهرات بیماری آلزایمر از این طریق باشد و با توجه به اینکه بیماری آلزایمر یکی از انواع بیماری‌های التهاب عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو است امید است نرولیدول بتواند سبب بهبود بیماری آلزایمر باشد.

منابع

1- Alberini C.M. 2009. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89:121–145.

2- Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:205-214.

3- Carvalho R.B.F. 2021. Technological development of an inclusion complex of nerolidol with cyclodextrin and evaluation of pharmacological properties. PhD. Post - Graduate Program in Biotechnology. Federal University of Piaui.

4- De Carvalho R.B.F., De Almeida A.A.C., Campelo N.B., Lellis D.R.O.D., Nunes L.C.C. 2018. Nerolidol and its pharmacological application in treating neurodegenerative diseases: A Review. *Recent Patent on Biotechnology*, 12(3):158-168.

5- Dinamarca M.C., Sagal J.P., Quintanilla R.A., Godoy J.A., Arrázola M.S., Inestrosa N.C. 2010. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Ab peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 5(4):1-12.

6- Faux N.G., Rembach A., Wiley J., Ellis K.A., Ames D., Fowler C.J., Martins R.N., Pertile K.K., Rumble R.L., Trounson B., Masters C.L. 2014. An anemia of Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 19(11):1227-1240.

7- Francis P.T. 2005. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *CNS Spectrums*, 10:6-9.

8- Galasko D., Montine T.J. 2010. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*, 4(1):27–36.

9- Gulisano W., Maugeri D., Baltrons M.A., Fà M., Amato A., Palmeri A., D'Adamio L., Grassi C., Devanand D.P., Honig L.S., Puzzo D., Ar ancio O. 2018. Role of Amyloid-β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1):S611-S631.

10- Iqubal A., Syed M.A., Najmi A.K., Azam F., Barreto G.E., Iqubal M.K., Ali J., Haque S.E. 2020. Nano-engineered nerolidol loaded lipid carrier delivery system attenuates cyclophosphamide neurotoxicity - Probable role of NLRP3 inflammasome and caspase-1. *Experimental Neurology*, 334:113464.

11- Kihara T., Shimohama S. 2004. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. Acta *Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*, 64(1):99-105.

12- Lapczynski A., Bhatia S.P., Letizia C.S., Api A.M. 2008. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*, 46(11): S247-S50.

13- Motaghinejad M., Mashayekh R., Motevalian M., Safari S. 2021. The possible role of CREB-BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of minocycline against alcohol induced neurodegeneration: Molecular and behavioral evidences. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 35(1):113–130.

14- Nogueira Neto J.D., Cardoso de Almeida A.A., Silva Oliveira J., Santos P.S., Pergentino de Sousa D., Mendes de Freitas R. 2013. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochemical Research*, 38:1861–1870.

15- Pepeu G., Giovannini M.G., Bracco L. 2013. Effect of cholinesterase inhibitors on attention. *Chemico-Biological Interactions*, 203:361–364.

16- Porsteinsson A., Grossberg G., Mintzer J., Olin J. 2008. Group MM-M-S. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease already receiving a cholinesterase inhibitor: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Current Alzheimer Resarch*, 5(1):83-89.

17- Pugazhenthi S., Wang M., Pham S., Sze C.I., Eckman C. B. 2011. Downregulation of CREB expression in alzheimer's brain and in Aβ-treated rat hippocampal neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1):60-81.

18- Sberna G., Sáez-Valero J., Beyreuther K., Masters C.L., Small D.H. 1997. The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *Journal of Neurochemistry*, 69(3):1177-84.

19- Serrano-Pozo A., Frosch M.P., Masliah E., Hyman B.T. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1:a006189.

20- Silva M.P.N., Oliveira G.L.S., de Carvalho R.B.F., de Sousa D.P., Freitas R.M. , Pinto P.L.S., de Moraes J . 2014. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*, 19(3):3793-3803.

21- Taheri P., Yaghmaei P., Hajebrahimi Z., Parivar K. 2022. Neuroprotective effects of nerolidol against Alzheimer's disease in Wistar rats. *Drug Development Research*, 83(8):1858-1866.

22- Tamagno E., Guglielmotto M., Aragno M., Borghi R., Autelli R., Giliberto L., Muraca G., Danni O., Zhu X., Smith M.A., Perry G., Jo D.G., Mattson M.P., Tabaton M. 2008. Oxidative stress activates a positive feedback between the γ- and β-secretase cleavages of the β-amyloid precursor

protein. *Journal of Neurochemistry*, 104(3): 683–695.

23- Wang H., Xu J., Lazarovici P., Quirion R., Zheng W. 2018. cAMP response element-binding protein (CREB): A possible signaling molecule link in the pathophysiology of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11:255-276.

24- Yamada K., Nabeshima T. 2003. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 91(4):267–70.

25- Yang T., Zhang Y., Chen L., Thomas E.R., Yu W., Cheng B., Li X. 2023. The potential roles of ATF family in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 161:114544.