

مقاله پژوهشی

تاثیر بورنیل استات بر روی موش نر نژاد ویستار آلزایمری شده و فیبریل‌های آمیلوئید در شرایط

in vitro و بررسی استرس بی حرکتیحمیدرضا علیپور^۱، پریچهره یغمایی^{۱*}، شهین احمدیان^۲، مریم قبه^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: yaghmaei_p@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1952089.1361

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

چکیده

بیماری آلزایمر یک اختلال تخریبی نورونی است که باعث مرگ نورون و از دست دادن حافظه می‌شود و موجب تولید رادیکال‌های آزاد و فاکتورهای التهابی بروز می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد بورنیل استات به عنوان یک مونوترپن دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد. بنابراین در این مطالعه اثرات بورنیل استات با دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در موش آلزایمری شده نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. برای ایجاد مدل آلزایمری از تزریق دو طرفه A β 1-42 درون هیپوکامپ رت‌های نر استفاده شد. در این مطالعه آنزیم‌های بیوشیمیایی SOD و MDA، تست رفتاری شاتل باکس، بررسی‌های هیستولوژیکی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و تیوفیلوین S جهت بررسی نوروزن و پلاک‌های آمیلوئیدی و اثرات استرس بی حرکتی کوتاه مدت بر موش‌های آلزایمری و همچنین اثرات ترکیب ذکر شده در محیط *in vitro* نیز مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای بیوشیمیایی، تصاویر بافت‌شناسی و آزمون رفتاری گروه آلزایمری در مقایسه با گروه‌های کنترل به طور معناداری متفاوت بود. به طوریکه شاخص‌های یادگیری و حافظه در گروه آلزایمری شده در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. همچنین دریافت ترکیب بورنیل استات باعث افزایش معنادار نوروزن و کاهش معنادار تراکم پلاک‌ها و همچنین تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی و آزمون رفتاری شد. علاوه بر این، دریافت ترکیب بورنیل استات توام با استرس بی حرکتی باعث افزایش سرعت یادگیری و بهبود حافظه نسبت به گروه آلزایمری شد. قابل ذکر است که ترکیب فوق در محیط *in vitro* باعث کاهش فیبریل‌های آمیلوئیدی شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و گزارش‌های قبلی مبنی بر اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدان بورنیل استات به نظر می‌رسد این ترکیب می‌تواند اختلالات و عارضه‌های ایجاد شده در حافظه را بهبود ببخشد.

کلمات کلیدی: پلاک‌های آمیلوئید، بورنیل استات، A β 42، حافظه، استرس بی حرکتی.

مقدمه

بیماری آلزایمر منجر به از دست دادن توانایی انجام فعالیت‌های اساسی روزمره زندگی و همچنین پریشانی و احتیاج به مراقبت‌های ویژه نگهداری می‌شود (۵). هر سه ثانیه یک مورد جدید از زوال

آلزایمر می‌باشد. از آنجا که استرس بی‌حرکتی نیز به عنوان یک مولفه در اختلالات حافظه می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت. اثرات بورنیل استات در دو روش پیشگیری و درمان بررسی شد. علاوه بر این یک آزمایش در شرایط *in vitro* به منظور بررسی اثر بورنیل استات روی فیبریل‌های ساخته شده Aβ42 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برای مطالعه تجربی از ۹۲ سر موش نژاد ویستار به وزن تجربی 50 ± 200 گرم که از انیستور پاستور ایران خریداری شده است استفاده گردید. موش‌ها در شش قفس (42×26 سانتیمتر) در دمای 20 ± 0.5 درجه سانتیگراد تحت چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات در طول آزمایش مورد بازدید بودند و در طول آزمایش آب و غذای کافی در اختیارشان بود. حیوانات به مدت یک هفته قبل از آزمایش با شرایط آزمایش و محیط سازش پیدا کردند تا استرس نداشته باشند. بورنیل استات و Aβ1-42 از سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری شد. ویال ۱ میلی گرمی Aβ1-42 در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل حل و به مدت یک هفته در دستگاه انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شد (۲۰، ۴۵). این دارو بسیار فرار بوده و برای احتیاط در آن پوشانده میشد و حجم محلول تا تمام تزریقات مورد سنجش قرار میگرفت. بورنیل استات در دوز ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم در ۰/۵ سی سی آب مقطر دوبار استریل حل شد و از طریق سرنگ انسولین بصورت تزریق درون صفاقی به رت تزریق شد. ۱- گروه کنترل ۱: حیواناتی که آب و غذای معمولی دریافت می‌کنند و تحت جراحی آلزایمری قرار نگرفته‌اند (Ctr).

عقل تشخیص داده می‌شود. و به طور کلی بین سه تا نه سال بیماری آلزایمر منجر به مرگ می‌شود (۱۲). بیماری آلزایمر شایع‌ترین نوع پیشرونده بیماری نورودژنراتیو است که همراه با اختلال در یادگیری و حافظه که ناشی از عملکرد غیرطبیعی عصبی می‌شود (۲۹). با این حال مراحل خاموش و بدون علامت اولیه آغاز می‌شود (۱۲). ضایعات بیماری آلزایمر شامل تغییرات پاتولوژیک در مغز مانند تجمع پروتئین‌های آمیلوئید و پروتئین تائو که منجر به انحطاط کردن نورون‌ها و سیناپس‌ها در نئوکورتکس و هیپوکامپ می‌شود (۱۲). از طرف دیگر نشانهای از استرس اکسیداتیو و نقش التهابی در پاتوژنز بیماری آلزایمر مشخص شده است (۴۰). بر اساس مطالعات گذشته مشخص شده است استرس بی‌حرکتی می‌تواند بر اختلال در حافظه و یادگیری نقش داشته باشد (۲۶). استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزین برای حفاظت عصبی رو به افزایش است (۲۵). مونوترپن‌ها متعلق به یک مشتق و بزرگ از ترکیبات شیمیایی به نام ترپن‌ها هستند که جزء اصلی اسانس‌های روغنی گیاهان دارویی با خواص درمانی می‌باشند (۱). بورنیل استات به عنوان یک مونوترپن دو حلقوی در بسیاری از گیاهان از جمله *Abies sibirica*, *Abiesbalsamea*, *pinus densiflora* و دارای *Valeriana officinalis* می‌باشد (۴۱) و بسیاری رفتارهای فارماکولوژی شامل ضد دردی، ضد التهابی، و اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. (۲۸، ۳۹). بیماری آلزایمر یک بیماری ناهمگن و چند عاملی است. متاسفانه تمام داروهای مورد استفاده در آزمایشات بالینی که رسوبات Aβ را مورد هدف قرار می‌دهد تقریباً شکست خورده است (۱۱). با وجود گذشت زمان طولانی بسیاری از مکانیسم‌های بیماری آلزایمر هنوز کامل فهمیده نشده است. در مطالعه حاضر هدف ما بررسی تاثیر بورنیل استات در درمان

روند کلی آزمایش به این صورت بود که آزمایش ۲۱ روز طول کشید و حیوانات در روز ۲۲ آزمایش اوت شدند. به منظور القا آلزایمر موش‌ها ابتدا با تزریق کتامین و زایلزین بیهوش شدند (۴۲) و سپس در دستگاه استریوتاگس قرار گرفتند. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون سال ۱۹۸۶ مشخصات هیپوکامپ تعیین می‌شود (۳۱). برای تزریق آمیلوئید بتا به درون مغز مکان دقیق آن به دقت محاسبه و با مختصات قدامی - خلفی ۴/۸ و داخلی جانبی ۳/۵ و پشتی - شکمی ۴ میلی‌متر علامتگذاری شد. سپس توسط سرنگ همپلتون به آرامی ۲ میکرولیتر محلول Aβ42 در بطن مغز حیوان در منطقه (CA1) در دو طرف هیپوکامپ تزریق شد. پلاک‌های آمیلوئیدی پس از یک هفته در مغز موش ایجاد شدند که با استفاده از روش‌های بافت‌شناسی قابل مشاهده است. گروه‌های درمانی و پیشگیری و استرس بی حرکتی از روز هشتم به مدت دو هفته مورد تزریق و مطالعه قرار گرفتند که این کار تا روز ۲۱ ادامه داشت. در گروه‌های محافظت (پیشگیری) یک هفته قبل از تزریق بتا آمیلوئید مورد تزریق بورنیل استات قرار گرفتند. برای آزمایش شاتل باکس از جعبه که دو محفظه تاریک و روشن با اندازه برابر (۲۶ × ۲۶ سانتیمتر) تشکیل شده بود و توسط یک درب کشوی (۸ × ۸ سانتیمتر) جدا شده بود استفاده شد. روش اجتنابی مهارتی برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام می‌شود. روز اول آموزش و روز دوم آزمون با تست کردن میزان حافظه حیوانهای آموزش دیده است. در این آزمایش حیوانات به مدت ۵ ثانیه در بخش روشن دستگاه قرار می‌گیرند. بعد از گذشت ۵ ثانیه درب گیوتین باز و به حیوان اجازه داده می‌شود وارد قسمت تاریک شوند و ۱۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شود و بعد از آشنایی با محیط روشن و تاریک به قفس

۲- گروه کنترل ۲: حیواناتی که تحت جراحی آلزایمری قرار گرفته اند ولی به جای بتا آمیلوئید، آب مقطر درون هیپوکامپ مغز تزریق می‌شد (S+W).

۳- گروه آلزایمری: حیواناتی که جراحی می‌شوند و بتا آمیلوئید به میزان ۲ میکرولیتر در داخل هیپوکامپ مغز به صورت دوطرفه تزریق می‌شد (Aβ).

۴- گروه شم: حیوانات این گروه آلزایمری می‌شوند و پس از یک هفته به مدت ۱۴ روز آب مقطر را از طریق تزریق درون صفاقی دریافت کردند (Aβ+W).

۵- گروه بی‌حرکتی: حیوانات این گروه بدون عمل جراحی آلزایمری، تحت استرس بی حرکتی پنج ساعت در روز درون لوله مخصوص به مدت ۲۱ روز، قرار گرفتند (R).

۶- گروه آلزایمری توام با بی‌حرکتی: حیوانات آلزایمری، که تحت استرس بی حرکتی قرار می‌گرفته‌اند (Aβ+R).

۷- گروه تجربی ۱ و ۲: حیوانات این گروه آلزایمری می‌شوند و پس از یک هفته، میرسن را با دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۴ روز، بصورت تزریق درون صفاقی دریافت می‌کردند. (درمانی) (Aβ + T + 20 و Aβ + T + 50).

۸- گروه تجربی ۳ و ۴: حیوانات این گروه ابتدا یک هفته قبل از آلزایمری شدن، میرسن را با دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۴ روز، بصورت تزریق درون صفاقی دریافت می‌کردند (پیشگیری) (Aβ + P + 20).

۹- گروه تجربی ۵ و ۶: حیوانات این گروه آلزایمری می‌شوند و پس از یک هفته، میرسن را با دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۴ روز، بصورت تزریق درون صفاقی دریافت می‌کردند و همزمان تحت استرس بی حرکتی قرار می‌گرفتند. Aβ + R + 20 and 50.

حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفته است.

پس از تهیه سرم خون، پارامترهای سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و مالوندیآلدئید (MDA) را از طریق تهیه کیت‌های آلمانی (ZELLBIO) آزمایشگاهی مطابق با پروتوکل موجود در کیت مورد سنجش قرار گرفت. به منظور بررسی فیبریلها ابتدا پپتید A β 42 ابتداء در آب دیونیزه شده (Deionized Water) (DW) به غلظتهایی ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر رسید. برای ساخت فیبریل های بالغ، لوله هایی حاوی مونومرهای A β 42 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۲ و ۴ روز انکوبه شدند. در حالیکه لوله‌ها با یک نوار مغناطیسی تفلون به آرامی در هم آمیخته می‌شد، سپس عصاره ۱ میلی گرم در میلی لیتر (۱۰۰ میکرومولار) بورنیل استات با فیبریل چهار روزه Preformed در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ و ۳ هفته در انکوباتور قرار گرفت (۱۵).

۱۵-۱۰ ماکرولیتر از نمونه‌های ۱ میلی‌گرم در میلی-لیتر بر روی شبکه‌های مس ۴۰۰ F-C قرار گرفت. بعد از ۲ دقیقه، مایع اضافی با یک فیلتر کاغذی برداشته شد و سپس ۵ میلی لیتر از اورانیلاستات ۱ درصد به داخل شبکه اضافه شد. رنگ اضافی بعد از ۲ دقیقه حذف شد. پس از خشک شدن کامل، نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی (Hitachi HU-12A ، Japan) در ۷۵ کیلوولت عمل می‌کردند. به منظور شمارش نورونها و پلاک‌ها از نرم افزار Image J استفاده شد. در این تحقیق از نرم افزار SPSS 21 استفاده شده و برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون واریانس ANOVA و TUKEY استفاده شد. داده‌ها به صورت $MEAN \pm SEM$ با سطح معنی‌دار $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ ، $p < 0/001$ برای گروه‌ها در تمام مراحل در نظر گرفته شد.

بازگردانده می‌شوند. بعد از ۳۰ دقیقه موش در جعبه شاتل قرار گرفته و پس از ورود به منطقه تاریک در این ناحیه (5۰HZ, 1Ma) دچار ۵ ثانیه شوک قرار گرفته و سپس به قفس بازگردانده شد. پس از گذشت دو دقیقه موش در جعبه شاتل قرار گرفت. در این مرحله موش در قسمت روشن قرار گرفت و در ب گپوتین باز می‌شود و میزان تاخیر ورود به بخش تاریک ثبت می‌شود. حداکثر آزمون برای هر موش سه بار در نظر گرفته می‌شود. مرحله آزمون ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش است. در جلسه آزمون تحریک الکتریکی انجام نمی‌شود. بیشترین مقدار تاخیر برای ورود به بخش تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود (۱۷، ۱۹). در روش اجتنابی مهارتی تاخیر موش در ورود به بخش تاریک نسبت به آنچه در روز آموزش مشاهده شد نشان دهنده حافظه بهتری می‌باشد. در روز ۲۲ پس از آزمایش موش‌ها بیهوش شدند و مغزها جدا گردید و سپس در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت ذخیره شد و بعداً برای قالب گیری مورد پردازش پارافین قرار گرفتند. برای ارزیابی نورونز از رنگ آمیزی هماتوکسین ائوزین استفاده گردید. علاوه بر این از روش رنگ آمیزی تیوفلاوین S برای تشخیص پلاک‌های آمیلوئید استفاده شد و توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد (۱۴). موش‌ها تحت شرایط استاندارد مورد استرس بی-حرکتی قرار گرفتند. و یک روز قبل از آزمایش به جعبه شاتل باکس انتقال یافتند. برای ایجاد استرس بی حرکتی موش‌ها ۵ ساعت در لوله پلی-پروپیلین (3×3×10 cm) به مدت دو هفته مهار شدند (۴۷). در روز ۲۲ نمونه گیری انجام و جمع آوری شد و ابتدا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق لخته و سپس در ۳۰۰ دور در دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. تمام آزمایشات بر روی حیوانات مطابق با قوانین کمیته اخلاقی کار با

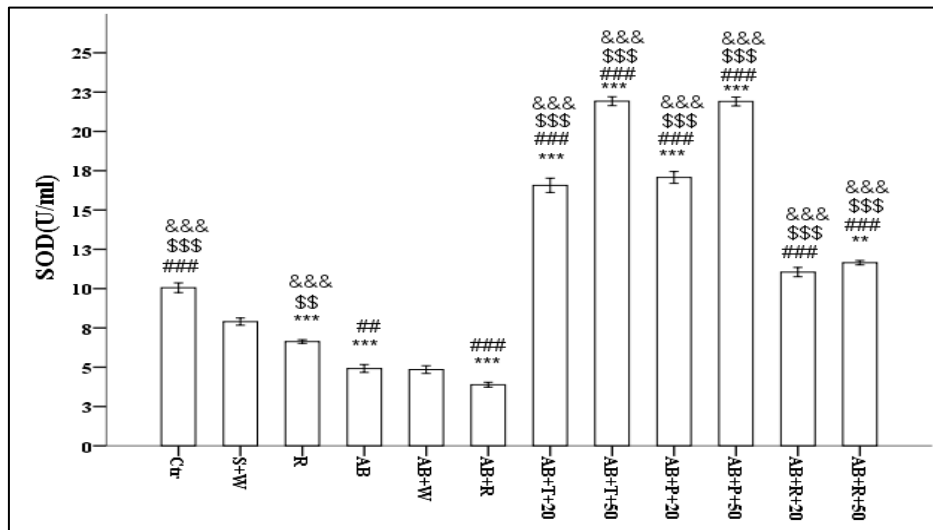
نتایج

حرکتی با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$) (نمودار ۴). بررسی‌های بافت‌شناسی ناحیه هیپوکامپ بافت مغز در گروه کنترل ۱ در تصویر (a) قابل رویت می‌باشد. بررسی‌های بافت‌شناسی ناحیه CA1 هیپوکامپ بافت مغز نشان داد که گروه‌های کنترل ۱، کنترل ۲ و بی حرکتی دارای تعداد زیادی سلول‌های پیرامیدال نرمال و طبیعی می‌باشند که در تصاویر b,c, d مشاهده می‌شود. در مقابل همانطور که در تصاویر (e, f, g) دیده می‌شود، کاهش تعداد سلول‌های پیرامیدال در گروه‌های آلزایمری، شم و آلزایمری توام با بی‌حرکتی، که آمیلوئید بتا دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم، کاملاً مشهود است. در بررسی میکروسکوپی بافت‌ها، در گروه‌های تجربی درمانی و پیشگیری که دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات را دریافت می‌کردند، با توجه به تصاویر (h, I, j, k)، مشخص شد که تعداد سلول‌های پیرامیدال تا حد زیادی به حالت نرمال و طبیعی بازگشته است ولی نسبت به گروه کنترل سالم کمتر است. در بررسی بافت‌شناسی گروه‌های تجربی دریافت‌کننده دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات توام با بی‌حرکتی، افزایش تعداد سلول‌های پیرامیدال نسبت به گروه‌های آلزایمری مشخص است. تصویر (l,m) (شکل ۱). مطالعات بافت‌شناسی پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان شمارش پلاک‌ها در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). مطالعات بافت‌شناسی پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان شمارش نورون‌ها در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). مطالعات بافت‌شناسی پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان شمارش نورون‌ها در گروه بی

تجزیه و تحلیل‌ها پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان SOD در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دریافت دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). تجزیه و تحلیل‌ها پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان SOD در گروه بی‌حرکتی با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). تجزیه و تحلیل‌ها پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان MDA در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). تجزیه و تحلیل‌ها پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان MDA در گروه بی‌حرکتی با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). تست رفتاری شاتل باکس پس از پایان مطالعه نشان داد که در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). تست رفتاری شاتل باکس پس از پایان مطالعه نشان داد که در گروه بی‌حرکتی با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). مطالعات بافت‌شناسی پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان شمارش نورون‌ها در گروه دریافت‌کننده دوز درمانی و حفاظتی و همچنین گروه بی‌حرکتی توام با دوز ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بورنیل استات با گروه‌های کنترل به طور قابل توجهی معنادار بود ($p < 0/001$). مطالعات بافت‌شناسی پس از پایان مطالعه نشان داد که میزان شمارش نورون‌ها در گروه بی

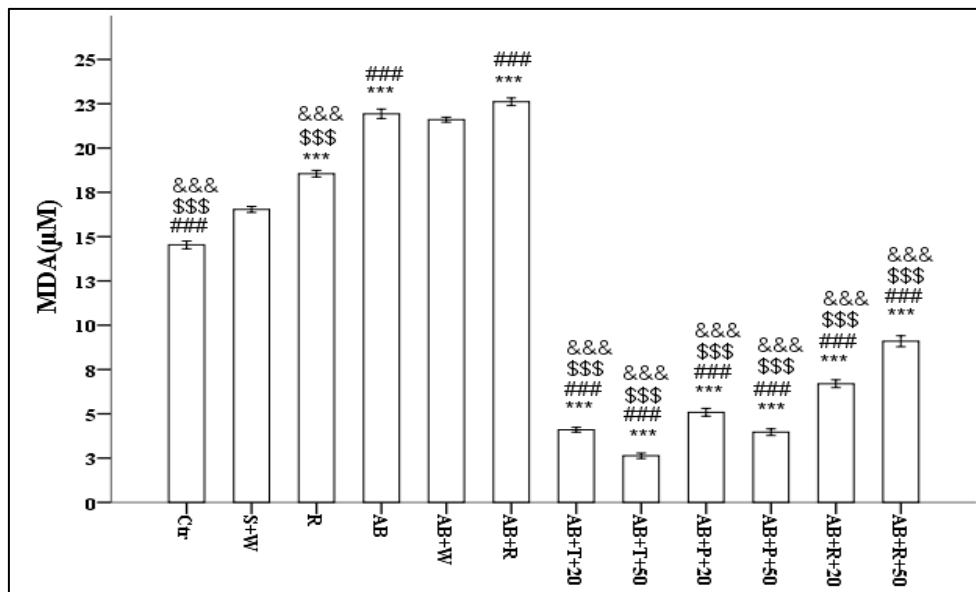
نسبت به گروه آلزایمری مشخص است (شکل ۲). در بخش *in vitro* مطالعه شامل نظارت بر اثر بی ثبات کنندگی میرسن ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۳ هفته انکوباسیون با فیبرهای Aβ42 از قبل تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی است. فیبریل‌های آمیلوئید بتا ۴ روزه دارای تراکم و تعداد بیشتری نسبت به فیبریل‌های آمیلوئید بتا ۲ روزه می‌باشد (A, C). بر اساس تصاویر TEM کاهش فیبریل‌های بتا آمیلوئید در حضور بورنیل استات، بعد از گذشت یک و سه هفته مشخص است (C, D). تصاویر گرفته شده از نمونه های نشان داد که ساختارهای فیبریلاری کوتاهتر در حضور بورنیل استات تشکیل شده اند (برای مقایسه از الیاف Aβ42 استفاده می‌شود). این مشاهده می‌تواند مربوط به حذف پلاک‌های فیبریلاری پس از درمان *in vivo* با ترکیب باشد (شکل ۳).

کنترل ۱، کنترل ۲، بی حرکتی نشان دهنده عدم وجود پلاک های آمیلوئیدی در گروه‌های سالم می‌باشد (d,e,f). در مقابل همانطور که در تصاویر (a,b,c) مشاهده می‌شود، در گروه های آلزایمری، شم، آلزایمری توام با بی حرکتی به علت تزریق دوطرفه آمیلوئید بتا درون هیپوکامپ، پلاک‌های آمیلوئیدی تشکیل و رویت می‌شوند. در بررسی های پلاک های آمیلوئیدی تشکیل شده در گروه‌های آلزایمری که تحت تیمار با بورنیل استات قرار گرفتند، تصاویر (g,h,i,j) نشان می‌دهد که تعداد پلاک ها در گروه های تجربی درمانی و پیشگیری دریافت کننده دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. با توجه به تصاویر (k,l) که مربوط به گروه‌های تجربی دریافت کننده بورنیل استات با دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توام با بی‌حرکتی می‌باشد، کاهش پلاک‌های آمیلوئیدی

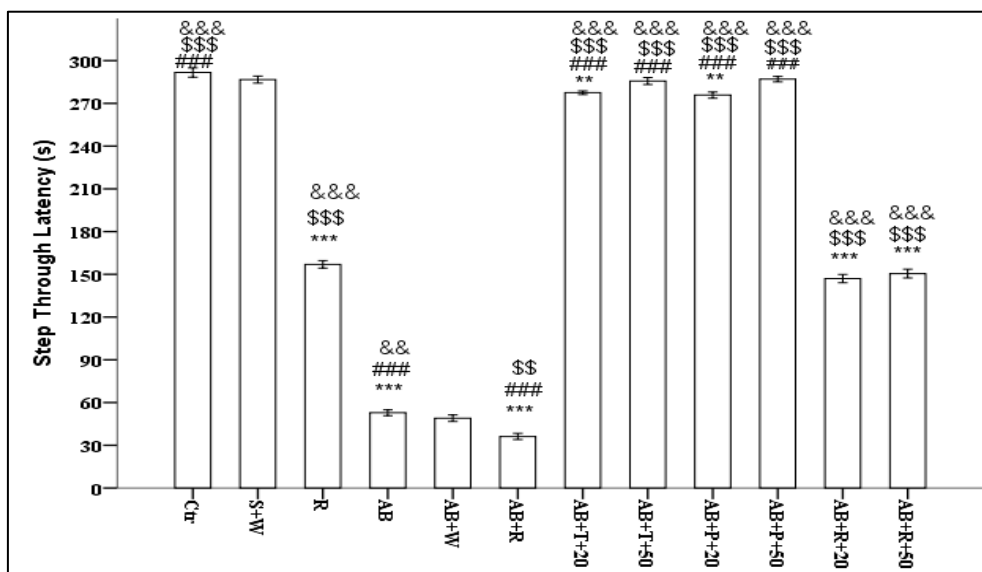


نمودار ۱: مقایسه شاخص بیوشیمیایی SOD در سرم خونی گروه های مختلف بورنیل استات.

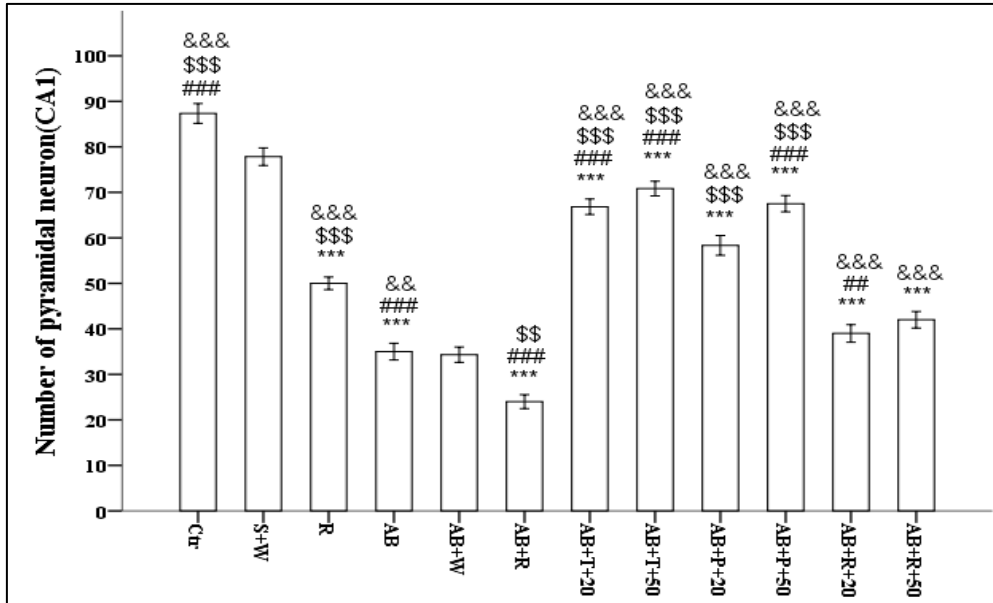
*** p<0.001 : مقایسه با گروه کنترل (Ctr) ، ** p<0.01 : مقایسه با گروه کنترل (Ctr) ، ### p<0.001 : مقایسه با گروه بی حرکتی (R) ، \$\$\$ p<0.001 : مقایسه با گروه آلزایمری شده (AB) ، \$ p<0.01 : مقایسه با گروه آلزایمری شده (AB) ، &&& p<0.001 : مقایسه با گروه آلزایمری شده توام با بی حرکتی (AB+R) .



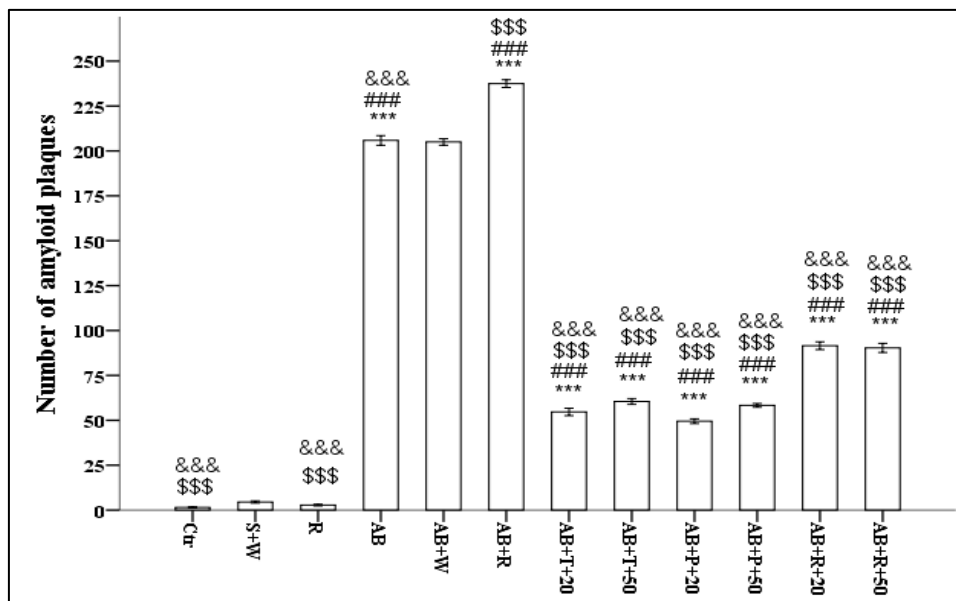
نمودار ۲: مقایسه شاخص بیوشیمیایی MDA در سرم خونی گروه‌های مختلف بورنیل استات. $p < 0.001$ ***: مقایسه با گروه کنترل (Ctr)، $p < 0.01$ **: مقایسه با گروه کنترل (Ctr)، $p < 0.001$ ###: مقایسه با گروه بی‌حرکتی (R)، \$\$\$: مقایسه با گروه آلیزیمری شده (AB)، $p < 0.001$ &&&: مقایسه با گروه آلیزیمری شده توام با بی‌حرکتی (AB+R).



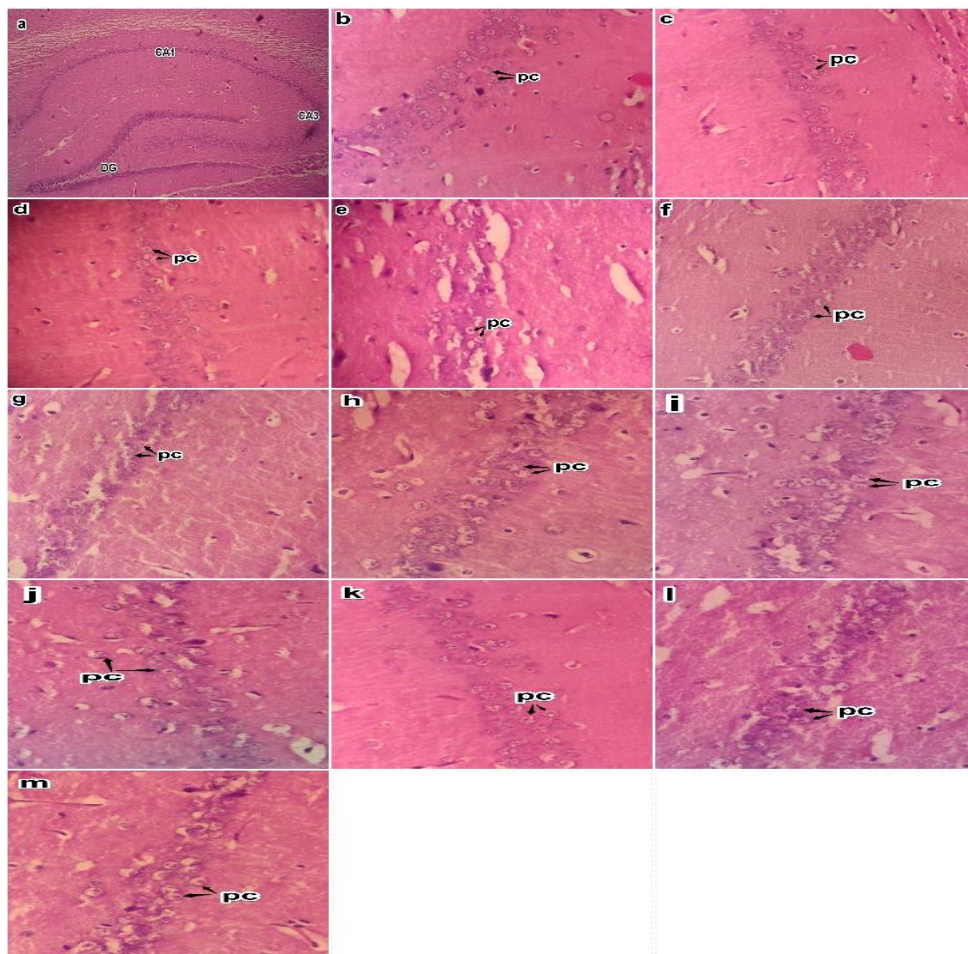
نمودار ۳: مقایسه شاخص رفتاری (مدت زمان تاخیر) در گروه‌های مختلف بورنیل استات. $p < 0.001$ ***: مقایسه با گروه کنترل (Ctr)، $p < 0.01$ **: مقایسه با گروه کنترل (Ctr)، $p < 0.001$ ###: مقایسه با گروه بی‌حرکتی (R)، \$\$\$ $p < 0.001$: مقایسه با گروه آلیزیمری شده (AB)، $p < 0.01$ \$\$: مقایسه با گروه آلیزیمری شده (AB)، $p < 0.001$ &&&: مقایسه با گروه آلیزیمری شده توام با بی‌حرکتی (AB+R).



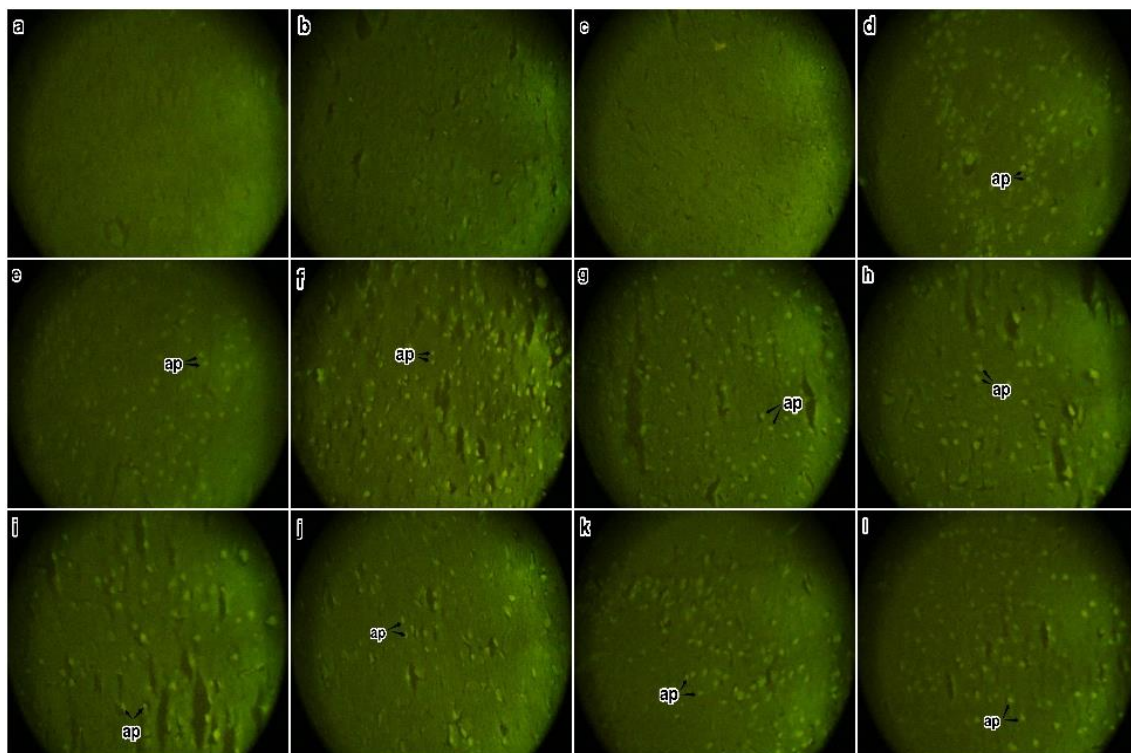
نمودار ۴: مقایسه میزان نوروزن در گروه های مختلف بورنیل استات. $p < 0.001$: مقایسه با گروه کنترل (Ctrl) ، $p < 0.01$: مقایسه با گروه کنترل (Ctrl) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه بی حرکتی (R) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه آرایمری شده (AB) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه آرایمری شده توام با بی حرکتی (AB+R) .



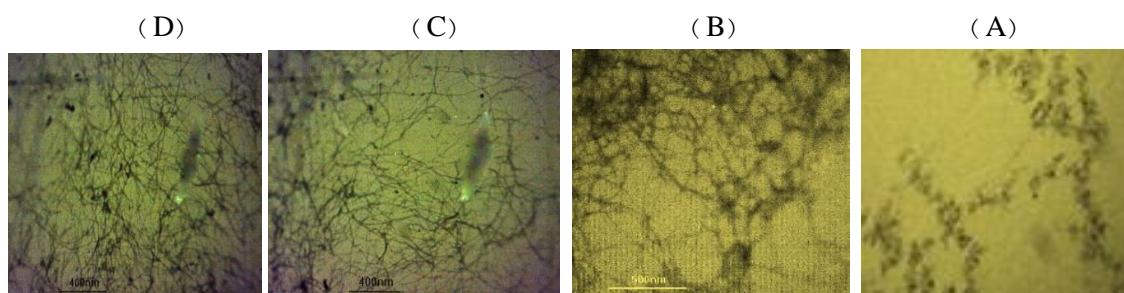
نمودار ۵: مقایسه تجمع پلاک آمیلوئیدی در گروه های مختلف بورنیل استات. $p < 0.001$: مقایسه با گروه کنترل (Ctrl) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه بی حرکتی (R) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه آرایمری شده (AB) ، $p < 0.001$: مقایسه با گروه آرایمری شده توام با بی حرکتی (AB+R) .



شکل ۱- فتومیکروگراف ازبخش CA1 (Cortex Area 1) ناحیه هیپوکامپ بافت مغزبارنگامیزی H & E.
 a: گروه کنترل ۱ (با بزرگنمایی x40)، b: گروه کنترل ۱ (با بزرگنمایی x400)، c: گروه کنترل ۲ (تحت جراحی و دریافت آب مقطر)، d: گروه بی حرکتی (تحت بی حرکتی قرار گرفتند)، e: گروه آلزایمری (تحت جراحی و دریافت آمیلوئید بتا)، f: گروه شم (دریافت آمیلوئیدبتا و آب مقطر)، g: گروه آلزایمری توام با بی حرکتی (دریافت آمیلوئید بتا و تحت بی حرکتی قرار گرفتند)، h: گروه تجربی ۱ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۲۰ بورنیل استات با هدف درمانی)، i: گروه تجربی ۲ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بورنیل استات با هدف درمانی)، j: گروه تجربی ۳ (دریافت امیلوئید بتا و دوز ۲۰ بورنیل استات با هدف پیشگیری)، k: گروه تجربی ۴ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بورنیل استات با هدف پیشگیری)، l: گروه تجربی ۵ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۲۰-بورنیل استات و تحت بی حرکتی قرار گرفتند)، m: گروه تجربی ۶ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بی حرکتی و تحت بی- حرکتی قرار گرفتند).



شکل ۲- فتومیکروگراف از بخش 1 (Cortex Area) CA1 ناحیه هیپوکامپ بافت مغز، با رنگ‌آمیزی تیوفلاوین s
 a: گروه کنترل ۱ (با بزرگنمایی x40)، b: گروه کنترل ۱ (با بزرگنمایی x400)، c: گروه کنترل ۲ (تحت جراحی و دریافت آب مقطر)، d: گروه بی‌حرکتی (تحت بی‌حرکتی قرار گرفتند)، e: گروه آلزایمری (تحت جراحی و دریافت آمیلوئید بتا)، f: گروه شم (دریافت آمیلوئید بتا و آب مقطر)، g: گروه آلزایمری توام با بی‌حرکتی (دریافت آمیلوئید بتا و تحت بی‌حرکتی قرار گرفتند)، h: گروه تجربی ۱ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۲۰ بورنیل استات با هدف درمانی)، i: گروه تجربی ۲ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بورنیل استات با هدف درمانی)، j: گروه تجربی ۳ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۲۰ بورنیل استات با هدف پیشگیری)، k: گروه تجربی ۴ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بورنیل استات با هدف پیشگیری)، l: گروه تجربی ۵ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۲۰ بورنیل استات و تحت بی‌حرکتی قرار گرفتند)، m: گروه تجربی ۶ (دریافت آمیلوئید بتا و دوز ۵۰ بورنیل استات و تحت بی‌حرکتی قرار گرفتند).



شکل ۳- آنالیز فیبریلاسیون Aβ42. A: تصویر TEM از فیبریلاسیون Aβ42 پس از انکوباسیون ۲ روزه، B: تصویر TEM از فیبریلاسیون Aβ42 پس از انکوباسیون ۴ روزه، C: تصویر TEM از فیبریلاسیون Aβ42 انکوبه شده با ۱۰۰ μM بورنیل استات، پس از یک هفته، D: تصویر TEM از فیبریلاسیون Aβ42 انکوبه شده با ۱۰۰ μM بورنیل استات، پس از سه هفته.

بحث

باشد و ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشد (۱۸). در مطالعات گزارش شده که گیاهانی که بورنیل استات جزء اصلی آن می‌باشد باعث مهار لیپو اکسیژناز و فعالیت ضد رادیکالی را نشان می‌دهد (۱۸، ۴۱). بورنیل استات دارای خواص ضد التهابی، ضد درد، ضد اضطراب می‌باشد (۳۰، ۴۳). و همچنین در هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی و آرام بخش بودن ماث‌ر است (۲، ۴۴). در مطالعات گذشته گزارش شده است که استرس اکسیداتیو عامل اساسی در پیشرفت AD می‌باشد (۳). همچنین در گزارشی دیگر مشخص شد گیاهانی که دارای ترکیب بورنیل استات می‌باشند دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد استیل کولین استراز و همچنین فعالیت های ضد آمیلوئیدی و تقویت کننده حافظه و نقش در گیرنده GABA و افزایش هوشیاری و احتمالاً نقش در مسیرهای محافظت از نورون می‌باشند (۶، ۱۶، ۲۷، ۳۲). گزارشات مبنی بر افزایش سطح SOD پلازما و کاهش سطح MDA در بهبود تخریب عصبی نیز در گیاهانی که جزئی اصلی آن بورنیل استات می‌باشد گزارش شده است (۲۸، ۳۶). نتایج ما مطابق با مطالعات بالا نشان می‌دهد که سطح آنتی‌اکسیدان SOD در گروه آلزایمری کاهش یافته در حالی که بورنیل استات توانای افزایش سطح SOD را نشان می‌دهد. در مطالعات گذشته مشخص شد بورنیل استات باعث تقویت پاسخ ایمنی می‌شود (۴). همچنین تجویز بورنیل استات باعث سرکوب اثرات منفی التهابی می‌شود (۴۶، ۸). بورنیل استات می‌تواند در کاهش اختلالات حافظه و همچنین تقویت حافظه نقش داشته باشد (۹، ۲۱، ۳۲، ۳۵) همچنین در مطالعه دیگر مشخص شد گیاهانی که جزء اصلی آن بورنیل استات می‌باشد، می‌تواند با توجه کاهش اثرات منفی بیماری باعث درمان آلزایمر شوند (۲۳، ۲۴، ۳۳، ۳۴،

با توجه به شاخص‌های بیوشیمیایی، مطالعات بافت شناسی مغز و مطالعات رفتاری هم در حالت درمانی و همچنین پیشگیری مصرف بورنیل استات در کاهش پلاکهای مغزی و افزایش نوروزنز و بهبود حافظه در مدل *in vivo* ماث‌ر بود. همچنین در گروه (حلال آبی) مشخص شد که هیچ تاثیر خاصی بر روی شاخص‌های مورد مطالعه نمی‌گذارد. در این مطالعه به نظر می‌رسد بر اساس آزمایشات *in vitro* بورنیل استات می‌تواند تا حدودی پتانسیل لازم برای بی‌ثبات سازی فیبریل‌ها قبل از تشکیل را ارائه دهد. همچنین مشخص شد که استرس بی‌حرکتی می‌تواند پیامدهای ناشی از القا آلزایمر که بر حافظه و نوروزنز و شاخص‌های بیوشیمیایی باشد را تقویت کند. در حالی که وقتی استرس بی‌حرکتی مهار و همچنین با بورنیل استات درمان می‌شود علائم بهبود می‌یابد. مطالعات گذشته نشان داده است که استرس مزمن باعث تغییرات بیوشیمیایی، فارماکولوژی و مورفولوژی در هیپوکامپ می‌شود (۱۳). تزریق A β 42 در آب مقطر دوبار استریل حل شده بود باعث تشکیل پلاکهای آمیلوئیدی در مغز موش می‌شود (۷). A β 42 یک پپتید قوی سمی عصبی است و ساختار اصلی پلاک‌های که منجر به اختلال عملکرد عصبی و حافظه در بیماران AD می‌باشد. که منجر به التهاب و استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۰). در مطالعات گذشته مشخص شده است مونوترپن‌ها که طیف گسترده‌ای از فعالیت دارویی را دارند به طوری که با تنظیم مکانیسم‌های استرس اکسیداتیو و مسیرهای التهابی باعث سلامتی مطلوبی برای بدن از جمله سیستم عصبی می‌شوند (۳۷). *Valeriana jatamansi Jones and V. hardwickii Wall* غنی از مونوترپن‌ها می‌باشد که بورنیل استات جزء اصلی آن می‌باشد که نتایج آن نشان می‌دهد دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی می‌-

2. Buchbaue G r., Jäger W., Jirovetz L., Meyer F., Dietrich H. 1992. [Effects of valerian root oil, borneol, isoborneol, bornyl acetate and isobornyl acetate on the motility of laboratory animals (mice) after inhalation]. *Pharmacy Journal*, 47(8): 620-2.

3. Cassidy L., Fernandez, F., Johnson JB., Naiker M., Owoola, AG., Broszczak, DA. 2020. Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapy and Medicine*, 49, 102294.

4. Chen N., Sun G ., Yuan X ., Hou J ., Wu Q ., Soromou LW ., Feng H . 2014. Inhibition of lung inflammatory responses by bornyl acetate is correlated with regulation of myeloperoxidase activity. *Surgical Research*, 186(1): 436-45.

5. Crous-Bou M., Minguillon C., Gramunt N., Molinuevo JL. 2017. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research and Therapy*, 12;9(1): 71.

6. Cutillas AB ., Carrasco A., Martinez-Gutierrez R. ., Tomas V., Tudela J. 2018. *Thymus mastichina* L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities. *PLoS One*, 13(1): e0190790.

7. Dall'Igna OP., Fett P., Gomes MW., Souza DO., Cunha RA ., Lara DR. 2007. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice *Experimental neurology*, 203(1): 241-245..

8. Darwish RS ., Hammada HM., Ghareeb DA ., Abdelhamid ASA ., Bellah El Naggar EM., Harraz FM., Shawky E. 2020. Efficacy-directed discrimination of the essential oils of three Juniperus species based on their in-vitro antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Comparative Study*, 15;259: 11297.

۳۸). با توجه به اینکه اضطراب و افسردگی از عوامل تشدید کننده آلزایمر می‌باشد و همچنین در مطالعات گذشته گزارش شده بورنیل استات ضد اضطراب و افسردگی می‌باشد می‌توان گفت بورنیل استات از این طریق نیز در درمان آلزایمر ماثراست (۳۰، ۴۸) علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در *in vivo*، بر اساس نتایج مشخص شد که بورنیل استات می‌تواند با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر روی مدل آلزایمری از طریق اثر ضد فیبریل در شرایط *in vitro* ماثرا باشد. اثرات ضد فیبریل‌اسیون ترکیبات معطر به ویژه مواد شیمیایی چند حلقه بزرگتر بر روی انواع ترکیبات و روی انواع مختلف فیبریل‌ها گزارش شده است (۱۵، ۲۲).

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات بورنیل استات در بهبود یادگیری و حافظه در مدل آلزایمری و همچنین کاهش پلاک‌های آمیلوئید و اثرات ضد فیبریل‌اسیون آن میتوان بورنیل استات را به عنوان یک ساختار برای درمان آلزایمر پیشنهاد داد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش، حاصل پایان نامه مقطع دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود و با حمایت‌های معنوی و مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به انجام رسیده است. بدین وسیله از کمک و مساعدت این عزیزان تقدیر و تشکر می‌آید.

منابع

1. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chemical Toxicology*, 46(2): 446-75.

products with mitochondria: Effect of small-molecule natural products. *Peptide Science*, 102(6): 473-86.

16. Granger RE., Campbell EL., Johnston GA. 2005. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors. *Biochemical Pharmacology*, 1;69(7): 1101-11.

17. Guaza C., Borrell J. 1985. Prolonged ethanol consumption influences shuttle box and passive avoidance performance in rats. *Physiology and Behavior*, 34(2): 163-5.

18. Hodaj-Çeliku E., Tsiftoglou O., Shuka L., Abazi S., D Hadjipavlou-Litina., Lazari D. 2017. Antioxidant Activity and Chemical Composition of Essential Oils of some Aromatic and Medicinal Plants from Albania. *Natural Product Communications*, 12(5): 785-790.

19. Hosseinzadeh S., Roshan VD., Poursasghar M. 2013. Effects of intermittent aerobic training on passive avoidance test (shuttle box) and stress markers in the dorsal hippocampus of wistar rats exposed to administration of homocysteine. *Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Science*, 7(1): 37.

20. Hu NW., Smith IM., Walsh DM., Rowan MJ. 2008. Soluble amyloid- β peptides potently disrupt hippocampal synaptic plasticity in the absence of cerebrovascular dysfunction in vivo. *Brain*, 131(9): 2414-24.

21. Iijima M., Osawa M., Nishitani N., Iwata M., 2009. "Effects of incense on brain function: evaluation using electroencephalograms and event-related potentials. *Neuropsychobiology*, 59(2): 80-86.

22. Jemia MB., Chaabane S., Senatore F., Bruno M., Kchouk ME. 2013. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Natural Product Research*, 27(16): 1419-30.

9. Diego M A., Jones N A., Field T Hernandez-Reif M., Schanberg S., Kuhn C., McAdam V., Galamaga R., Galamaga M. 1998, "Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. *International Journal of Neuroscience*, 96(3-4): 217-24.

10. Donna M., Wilcock A. 2012. Changing Perspective on the Role of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 12: 495-243.

11. Doody RS., Thomas RG., Farlow M., Iwatsubo T., Vellas B., Joffe S., Kieburtz K., Raman R., Sun X., Aisen PS., Siemers E., Liu-Seifert H., Mohs R. 2014. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 370: 311-21.

12. Dubois B., Feldman HH., Jacova C., Hampel H., Molinuevo JL., Blennow K., DeKosky ST., Gauthier S., Selkoe D., Bateman R., Cappa S., Crutch S., Engelborghs S., Frisoni GB., Fox NC., Galasko D., Habert MO., Jicha GA., Nordberg A., Pasquier F., Rabinovici G., Robert P., Rowe C., Salloway S., Sarazin M., Epelbaum S., de Souza LC., Vellas B., Visser PJ., Schneider L., Stern Y., Scheltens P., Cummings JL. 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Journal of Lancet Neurology*, 13(6): 614-29.

13. Fuchs E., Flugge G., Ohl F., Lucassen P., Vollmann-Honsdorf GK., Michaelis T. 2001. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiology and Behavior*, 73: 285-291.

14. Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigations*, 115(5): 1121-9.

15. Ghobeh M., Ahmadian S., Meratan AA., Ebrahim-Habibi A., Ghasemi A., Shafizadeh M., Nemat-Gorgani M. 2014. Interaction of A β (25-35) fibrillation

31. Paxinos, G., and Watson C. 2006. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Australia.
32. Perry N S ., Houghton P J., Theobald A., Jenner P ., Perry E K . 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. *Pharmacy and Pharmacology*, 52(7): 895-902.
33. Perry N.S.L., Bollen C., Perry E.K., Ballard C., Salvia .2003. For dementia therapy: Review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3): 651-659.
34. Savelev S., Okello E., Perry NSL., Wilkins RM., Perry EK. 2003 .Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in Salvia lavandulaefolia essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75: 661-668.
35. Sayorwan W., Siripornpanich V., Piriyaupunyanorn T., Hongratanaworakit T., Kotchabhakdi N., Ruangrunsi N. 2012. The effects of lavender oil inhalation on emotional states, autonomic nervous system, and brain electrical activity. *Journal of Medical Association of Thailand*, 95(4): 598-606.
36. Shanhong L., Ting Zh., Gu W., Ya X., Lu J., Ronghua Zh., Yu J. 2018. Volatile Oil of *Amomum villosum* Inhibits Nonalcoholic Fatty Liver Disease via the Gut-Liver Axis. *Biomedical Research*, e3589874.
- 37 . Subramaniyan, S.D., AshokKumar N., Citral A. 2017. Monoterpene Protect Against High Glucose Induced Oxidative Injury in HepG2 Cell In Vitro-An Experimental Study. *Journal of Clinical Diagnosis Research*, 11: BC10-BC15.
- 38 . Tildesley NTJ., Kennedy DO., Perry EK., Ballard CG., Savelev S., Wesnes KA., Scholey AB. 2003, *Salvia lavandulaefolia* (Spanish sage) enhances memory in healthy young volunteers.
23. Kennedy DO., Dodd FL., Robertson BC., Okello EJ., Reay JL., Scholey AB., Haskell CF. 2011 .Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology*, 25(8): 1088-100.
24. Kennedy DO., Wightman EL. 2011 Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1): 32-50.
25. Khatoon S.S., Rehman M., Rahman A. 2018. The role of natural products in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Studies in natural products chemistry*, 56: 69-127.
26. Kim JJ., Song EY., Kim JJ., Song EY., Kosten TA. 2006. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress*, 9(1): 1-11.
27. Kim K., Bu Y., Jeong., Lim J., Kwon Y., Cha DS., Kim J., Jeon S., Eun J., Jeon H. 2006. Memory-enhancing effect of a supercritical carbon dioxide fluid extract of the needles of *Abies koreana* on scopolamine-induced amnesia in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(8): 1821-1826.
28. Kim S.H., Lee S.Y., Hong C.Y., Gwak K.S., Park M.J., Smith D., Cho I.G. 2013. Whitening and antioxidant activities of bornyl acetate and nezukol fractionated from *Cryptomeria japonica* essential oil. *International Journal of Cosmetics Sciences*, 35(5): 484-90.
29. Lane CA., Hardy J., Schott JM. 2018. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1): 59-70.
30. Orhan IE . 2021. A Review Focused on Molecular Mechanisms of Anxiolytic Effect of *Valeriana officinalis* L. in Connection with Its Phytochemistry through in vitro/in vivo Studies. *Current Pharmaceutical Design*, 27(28): 3084-3090.

- Amomum villosum. *Zhong Yao Cai*, 27(6): 438-439.
- 44 . Wu X., Xiao F., Zhang Z., Li X., Xu Z. 2005 . Research on the analgesic effect and mechanism of bornyl acetate in volatile oil from amomum villosum. *Zhong Yao Cai*, 28(6): 505-507.
- 45 . Yaghmaei P., Azarfar K., Dezfulian M., Ebrahim-Habibi A. 2014. Silymarin effect on amyloid- β plaque accumulation and gene expression of APP in an Alzheimer's disease rat model. *DARU*, 22(1): 24.
- 46 . Yang L., Liu J., Li Y., Qi G. 2018. Bornyl acetate suppresses ox-LDL-induced attachment of THP-1 monocytes to endothelial cells. *Biomedical Pharmacology*, 103: 234-239.
- 47 . Yu N.N., Wang X.X., Yu J.T., Wang N.D., Lu R.C., Miao D., Tian Y., Tan L. 2010. Blocking β 2-adrenergic receptor attenuates acute stress-induced amyloid β peptides production. *Brain Reserch*, 1317: 305-310.
- 48 . Zhang Y., Long Y., Yu S., Li D., Yang M., Guan Y., Zhang D., Wan J., Liu S., Shi A., Peng W. 2021. Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder. *Pharmacology Research*, 164: 105376.
- Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75: 669-674.
39. Tung YT., Chua MT., Wang Sh., Chang ST. 2008. Antiinflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource and Technology*, 99: 3908-13.
40. Van Cauwenberghe C. , Van Broeckhoven C., and Sleegers K. 2015 . The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, 18(5): 421-430.
- 41 Wang X., Ma A., Shi W., Geng M., Zhong X., Zhao Y. 2011. Quercetin and bornyl acetate regulate t-lymphocyte subsets and INF- γ /IL-4 ratio in utero in pregnant mice. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, e745262.
- 42 . Wellington D., Mikaelian I., Singer L. 2013. Comparison of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats. *Journal of the American association for laboratory animal science*, 52(4): 481-7.
- 43 . Wu X., Li X., Xiao F., Zhang Z., Xu Z., Wang H . 2004. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effect of bornyl acetate in volatile oil from

The Effect of Bornyl Acetate on Male Alzheimer's Disease Wistar Rats and *In Vitro* Amyloid Fibrils and Investigating the Immobility Stress

Hamid-Reza Alipour¹, Parichehreh Yaghmaei*¹, Shahin Ahmadian², Maryam Ghobeh¹, Azadeh Ebrahim-Habibi^{3,4}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that results in neuronal death and memory loss as it progresses. Following the progression of this disease, the production of free radicals and inflammatory factors occurs and it is now increasingly widespread, especially among the elderly. Studies show that Bornyl acetate, as a monoterpene, has antioxidant and anti-inflammatory effects. Therefore, the present study aims at assessing the effects of Bornyl acetate on AD male Wistar rats. A β 1-42 was injected into the hippocampus of male rats bilaterally to create the Alzheimer's model. The therapeutic as well as the preventive effects of Bornyl acetate at a dosage (50, 20 mg/kg) were also investigated. Moreover, biochemical enzymes, SOD and MDA, shuttle box behavioral test, histological studies and hematoxylin & eosin and thioflavin-S staining were used to evaluate neurogenesis and amyloid plaques and the effects of short-term restraint stress on AD rats as well as the effects of the compound *in vitro*. Biochemical factors, histological images and behavioral test of the AD group were significantly different from the control groups and AD group showed a significant decline in learning and memory indices compared with the control group. Also, receiving a Bornyl acetate caused a significant increase in neurogenesis and a significant decrease in plaque density as well as significant changes in biochemical indices and behavioral tests. In addition, Bornyl acetate + restraint stress (R) group elevated learning speed and improved memory compared with the AD group. Notably, the above combination reduced amyloid fibrils *in vitro*. It seems that this compound can improve memory disorders and complications according to the results of the present study and previous reports suggest the anti-inflammatory and antioxidant effects of Bornyl acetate.

Keywords: Bornyl acetate, immobility stress, A β 42, memory, Amyloid plaques