

## بررسی اثرات عصاره اکلیل الملک و تمرین مقاومتی بر بیان ژن APP در هیپوکمپ موش‌های مدل آلزایمری

فرح نامنی<sup>۱\*</sup> - زهره رسولی<sup>۲</sup>

۱. استادیار، گروه تربیت‌بدنی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران ۲.  
کارشناسی ارشد، گروه تربیت‌بدنی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴، تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶)

### چکیده

بیماری آلزایمر یکی از مشکلات بزرگ سلامت جامعه محسوب می‌شود که ممکن است تحت تأثیر تغییرات التهابی و ژنی ایجاد شود. با توجه به مشکلات حافظه، عملکرد، رنج فرد بیمار و خانواده و پرداخت هزینه گزاف، لزوم بررسی روش‌هایی برای کاهش این مشکلات احساس می‌شود. لذا پژوهشگران راهکارهایی مانند فعالیت بدنی و ورزش و استفاده از مکمل‌ها یا داروهای گیاهی را ارائه داده‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات عصاره اکلیل الملک و یک دوره تمرین مقاومتی بر بیان ژن APP در هیپوکمپ موش‌های مبتلا به آلزایمر بود. ۵۵ سرموش صحرایی نر ویستار در سن هشت هفته از انستیتو پاستور تهیه شد. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل سالم، گروه کنترل آلزایمری، گروه آلزایمری+تمرین مقاومتی، گروه آلزایمری+عصاره اکلیل الملک، گروه آلزایمری+عصاره اکلیل الملک+تمرین مقاومتی. آلزایمر با القا پپتید بتا آمیلوئید ۴۲-۱ انجام شد. پروتکل تمرین مقاومتی به‌عنوان مداخله در نظر گرفته شد (تمرین، هشت هفته، سه جلسه در هفته و به‌شکل فزاینده، با حمل وزنه از یک نردبان ۲۶ پله‌ای صورت گرفت). گروه‌های تمرینی هر هفته به‌طور دقیق وزن می‌شدند و وزنه تمرینی هر موش بر اساس وزن آن انتخاب می‌شد. اکلیل الملک به‌عنوان مکمل به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به‌مدت ۶ هفته و ۵ روز در هفته به‌عنوان تزریق داخل صفاقی استفاده شد. برای آزمون حافظه فضایی از آزمون ماز آبی موریس استفاده شد. ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها به‌وسیله تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. نمونه‌های هیپوکمپ جدا و سپس با استخراج RNA، تهیه پرایمرها و روش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. مطابق با نتایج آنوا دو طرفه بین گروه‌ها در میزان mRNA APP افزایش معنادار وجود دارد ( $P \leq 0.005$ ). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که در متغیر mRNA APP بین گروه کنترل با گروه آلزایمر، اکلیل الملک و تمرین مقاومتی اختلاف معناداری وجود دارد ( $P \leq 0.005$ ). کاهش معناداری از نظر مدت زمان سپری‌شده در بارنز ماز برای یافتن چاهک هدف توسط موش‌ها (ثانیه) بین گروه کنترل آلزایمری با دو گروه آلزایمری+عصاره اکلیل الملک+تمرین مقاومتی و گروه آلزایمری+تمرین مقاومتی وجود داشت ( $P < 0.001$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان داد مکمل اکلیل الملک به‌همراه تمرین مقاومتی احتمالاً موجب کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی، آزادسازی نوروتروفین‌ها و تحریک نورونز در ساختار هیپوکامپ شده‌است و از کاهش بیان ژن APP ناشی از آلزایمر ممانعت کرده‌است. همچنین موجب بهبود شناختی در موش‌های صحرایی گروه‌های مکمل و تمرین شده‌است.

### واژه‌های کلیدی

آلزایمر، اکلیل الملک، تمرین مقاومتی، ژن APP.

## مقدمه

آمیلوئید بتا کمتری دارد. علاوه بر این، افزایش نورونز مرتبط با ورزش بدنی در مراحل اولیه پاتونز آلزایمر ممکن است به بهبود عملکرد شناختی کمک کند، بنابراین یک استراتژی برای اصلاح یا حتی پیشگیری از بیماری‌هایی مانند آلزایمر ارائه می‌کند (۱۰). با این حال، بیشتر مطالعات از تمرینات هوازی استفاده کرده‌اند و تعداد کمی از آنها اثرات روش‌های دیگری را که در پیشرفت بیماری آلزایمر ممکن است فوایدی را نشان دهند (مانند ورزش مقاومتی) را بررسی کرده‌اند (۱۱). با توجه به اینکه کیفیت زندگی افراد با از دست دادن قدرت و استقامت و آتروفی عضلانی به خطر می‌افتد، ورزش مقاومتی به‌عنوان یک استراتژی مهم برای بهبود توده عضلانی، قدرت عضلانی، تعادل و ظرفیت عملکردی و عملکرد شناختی ظاهر می‌شود (۱۲). علاوه بر این، ورزش مقاومتی اثرات محافظت‌کننده عصبی ایجاد می‌کند و مزایایی مانند افزایش آزادسازی فاکتورهای نوروتروفیک و پاسخ‌های تعدیل‌کننده ایمنی، تحریک نورونز و انعطاف‌پذیری عصبی و بهبود حافظه را دارد (۱۳). به گفته ناوارو و همکاران (۲۰۱۸)، ورزش مقاومتی عملکرد مغز را در افراد مسن بهبود می‌بخشد و می‌تواند محافظت‌کننده عصبی باشد و خطر شروع آلزایمر و زوال عقل را کاهش دهد. اعمال ورزش مقاومتی روزانه بر موش‌های تراریخته موجب کنترل هیپرلوکوموشن، کاهش بار آمیلوئید بتا در هیپوکامپ و کاهش سطح سیتوکین‌های پیش‌التهابی شد (۱۴). لذا پژوهشگران به دنبال راهکارهایی برای بهبود یا درمان این بیماری با استفاده از فعالیت بدنی و ورزش همراه با مکمل‌ها یا داروهای گیاهی هستند. یکی از این مکمل‌ها یا گیاهان دارویی، اکلیل‌الملک می‌باشد. از کاربردهای این گیاه، درمان سردردهای معمولی و میگرنی را ذکر کرده‌اند. در رابطه با نقش فعالیت ورزشی اشاره شده‌است ورزش منظم، ممکن است منجر به کاهش

بیماری آلزایمر با علائم بالینی، مانند از دست دادن عملکردهای شناختی، نقص حافظه و اختلال پیش‌رونده فعالیت‌های حرکتی و رفتاری مشخص می‌شود. یکی از تغییرات نوروپاتولوژیک اصلی، تشکیل پلاک‌ها به دلیل تجمع پروتئین آمیلوئید بتا است که منجر به اختلال انتقال سیناپس و آسیب عصبی می‌شود و فرآیند تخریب عصبی آغاز می‌شود (۱). سطوح بالای استرس و کورتیکواستروئیدها ممکن است با افزایش خطر ابتلا به AD مرتبط باشد و ممکن است پیشرفت بیماری را در مراحل اولیه زوال عقل مرتبط با AD تسریع کند (۲). دراموند و ویسنیوسکی (۲۰۱۷) با مدل‌های تجربی و استفاده از موش‌های تراریخته تجمع  $A\beta$  و تشکیل پلاک را در قشر مغز و هیپوکامپ و عملکرد نشان داده‌اند (۳). و انگ و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند سطوح بالای کورتیکواستروئیدها در مغز حیوانات آلزایمری منجر به افزایش فعال شدن BACE1 می‌شود که به نوبه خود باعث افزایش فعال شدن APP و PS1 می‌شود. APP توسط سکریت از بتا و متعاقباً توسط سکریت از گاما جدا می‌شود و پپتید عصبی آمیلوئید بتا را تشکیل می‌دهد (۴). برخی محققان معتقدند فعالیت جسمانی، هم در انسان و هم در جوندگان، با خطر کمتر زوال عقل و اختلالات شناختی در پیری مرتبط است (۵، ۶). همچنین، در مدل‌های حیوانی، نشان داده شده‌است که ورزش فیزیکی حافظه فضایی را بهبود می‌بخشد و نورونز را افزایش می‌دهد (۷) و موجب کاهش رسوب  $A\beta$  و کاهش نرخ تشکیل پلاک‌های آمیلوئید بتا می‌شود (۸). طبق شواهد لورنسو و همکاران (۲۰۱۹) تمرینات بدنی زمانی که قبل یا در مراحل اولیه رسوب آمیلوئید بتا شروع شود در بهبود آلزایمر مؤثرتر است (۹). هنگامی که ورزش وارد فاز پیش پلاک می‌شود، رسوب

جامعه آماری تحقیق موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بودند. این مطالعه با شماره IR.IAU.VARAMIN.REC.1401.029 در تاریخ ۱۴۰۱/۶/۵ در کمیته اخلاق پژوهش زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا مورد موافقت و تأیید نهایی قرار گرفت. نمونه تحقیق ۵۵ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی حدود ۲۰۰-۲۵۰ گرم بودند که پس از تهیه به حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت منتقل شدند. موش‌های صحرایی به مدت یک هفته جهت تطابق با محیط جدید، بدون دریافت هیچ نوع مداخله‌ای در قفس‌های پلی کربنات شفاف به طول ۳۰، عرض و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد، نگهداری شدند. همه آنها در این مدت به غذای مخصوص جوندگان به صورت پلت دسترسی داشته و همچنین از آب شهری برخوردار بودند (دمای  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت  $5 \pm 5\%$ ، شرایط کنترل شده نور، ۱۲ ساعت تاریکی: ۱۲ ساعت روشنایی). در تمام دوره تحقیق اصول اخلاقی کار با حیوانات بر اساس معاهده هلسینکی و تحت نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی رعایت شد.

#### تهیه و مکمل یاری عصاره اکلیل‌الملک

ابتدا گیاه اکلیل‌الملک از مرکز جهاد کشاورزی شهرستان مرودشت تهیه شد. این گیاه دارویی توسط متخصصین مورد تأیید قرار گرفت. در ادامه ۵۰۰ گرم پودر خشک شده این گیاه با یک و نیم لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۴ روز در دمای معمولی نگهداری شد. پس از چهار روز عصاره آن استخراج و مایع با اتانول مخلوط و از کاغذ صافی رد شد. مایع حاصل در دستگاه تانک خلأ قرار گرفت و عصاره اتانولی این گیاه دارویی با غلظت مناسب استخراج شد. عصاره استخراج شده با استفاده از دستگاه

پیشرفت زوال قدرت شناختی شود. تمرینات منظم ورزشی، با بهبود قابلیت یادگیری و حافظه می‌تواند اثرات مثبتی بر ادراک و شناخت داشته‌باشد. علاوه بر این، ورزش مغز را در مقابل آسیب‌های ناشی از سکته مغزی محافظت کرده و باعث تسریع روند بهبودی مغز پس از صدمات ناشی از سکته مغزی می‌شود (۱۵). برخی مطالعات نشان داده‌اند تمرین بدنی سبب تأخیر در شروع تخریب سیستم عصبی می‌شود. همچنین طی سالیان متمادی داروهای طبیعی و دارویی تنها طریق درمان محسوب می‌شد. بررسی بیوانفورماتیکی و تعیین میزان خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره آبی الکلی اندام‌های هوایی گیاه *Thymus vulgaris* انجام شده‌است (۱۶).

بررسی اثرات ترپینولن و فعالیت بدنی بر حافظه و یادگیری در مدل رت‌های آلزایمری شده نشان داد ترپینولن و ورزش کوتاه مدت می‌توانند با مهار فاکتورها و مسیرهای التهابی موجب بهبود را آلزایمری شوند (۱۷). خاصیت آنتی‌اکسیدان ترپینولن ممکن است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو در رت‌های آلزایمری شده‌است (۱۷). در همین راستا تمرینات ترکیبی و مکمل جینگوبیلوبا بر عامل نروتروفیک مشتق از مغز سالمندان مرد به‌طور معناداری تأثیر داشته (۱۸). لذا هدف این تحقیق بررسی اثرات تمرینات مقاومتی و اکلیل‌الملک بر بیان ژن APP در هیپوکمپ موش‌های صحرایی مبتلا به آلزایمر بود.

#### روش‌شناسی پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون و گروه کنترل بود.

### نحوه القا آلزایمر با تری متیل تین

القا آلزایمر به ۴۴ سر موش صحرایی، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی با استفاده از تری می‌تل تین کلراید<sup>۲</sup> ساخت شرکت سیگما آلدریج آمریکا، با دوز ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم، به‌صورت تزریق صفاقی زیر شکم انجام شد (۲۱،۲۰) (تصویر ۱).



تصویر ۱. القا آلزایمر موش‌های صحرایی با استفاده از تزریق صفاقی زیر شکم

روتاری و شیک شدن به‌صورت پودر درآمد. سپس پودر استخراج‌شده این گیاه دارویی برای تزریق با نرمال سالین رقیق شده و به‌صورت صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق شد. با توجه به اینکه دوز مصرفی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است، روزانه ۱۵۰۰ میلی‌گرم پودر عصاره با ۶ سی سی نرمال سالین مخلوط و به هر موش صحرایی مقدار ۳۰ واحد بین‌المللی از محلول تزریق شد (۱۹).

سالم جهت بررسی اثر القا آلزایمر بر متغیرهای تحقیق در گروه کنترل سالم قرار گرفتند.

#### پروتکل تمرینی

موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین مقاومتی به‌مدت یک هفته (پنج جلسه) به آموزش تمرینات مقاومتی پرداختند. آشناسازی موش‌های صحرایی با تمرینات مقاومتی بدین صورت بود که در هر جلسه آموزش تمرینات مقاومتی را با استفاده از نردبانی با ارتفاع یک متر با فاصله ۴ سانتی‌متر بین پله‌ها انجام دادند. علاوه بر این با رعایت تمام اصول اخلاقی ابتدا فقط موش‌های صحرایی از پله‌های بالایی بالا رفتند تا به‌مرور زمان و طی چند جلسه از پله‌های پایینی به بالاترین نقطه پله برسند (۲۲). برای اجرای

پس از گذشت ۱۴ روز از تزریق تری می‌تل تین کلراید، جهت اطمینان از بیماری آلزایمر، علاوه بر مشاهده علائم بالینی (اضطراب، افسردگی، پرخاشگری، پیچ و تاب‌های دمی و خونریزی اطراف چشم)، حافظه و یادگیری تعدادی از موش‌های صحرایی بیمار به‌شکل نرم، با استفاده از آزمون شاتل باکس و ماز Y، ارزیابی شد (پرده شناس و همکاران، ۲۰۲۱). پس از اطمینان از القا بیماری آلزایمر موش‌های صحرایی مبتلا به آلزایمر به‌طور تصادفی به گروه‌های (۱) کنترل مبتلا به آلزایمر، (۲) مکمل اکلیل‌الملک، (۴) تمرین مقاومتی و (۵) تمرین مقاومتی + اکلیل‌الملک تقسیم شدند. علاوه بر این تعداد ۱۱ سر موش صحرایی

درصد وزن بدن و در هفته هشتم ۱۵۰ درصد وزن بدن، وزنه باید حمل می‌شد. در هر جلسه تمرینی موش‌های صحرائی در ۴ ست تمرینی (در ست اول ۵۰ درصد وزنه تعیین شده برای آن جلسه، ست دوم ۷۵ درصد، ست سوم ۹۰ درصد و ست چهارم ۱۰۰ درصد وزن بدن) تمرین را تکرار کردند (۲۳) (تصویر ۲).

تمرینات اصلی موش‌های صحرائی به مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته از نردبانی با ۲۶ پله بالا و پایین رفتند. در هفته اول با ۳۰ درصد وزن بدن، در هفته دوم ۶۰ درصد وزن بدن، در هفته سوم ۹۰ درصد وزن بدن، در هفته چهارم ۱۲۰ درصد وزن بدن، باید وزنه‌ای را حمل می‌کردند. سپس در هفته پنجم ۱۳۰ درصد وزن بدن، در هفته ششم ۱۴۰



تصویر ۲. انجام پروتکل تمرین مقاومتی با استفاده از نرده بان توسط موش‌های صحرائی

معیار بررسی حافظه فضایی در نظر گرفته شد. بعد از القای آلزایمر، زمان ورود به ناحیه تیره در گروه‌های تحقیق، توسط آزمون شاتل باکس محاسبه و نتایج ثبت شدند.

#### تشریح و نمونه‌برداری

در پایان پروتکل تحقیق، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی ابتدا موش‌های صحرائی توسط محلول کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. جهت اطمینان از بی‌هوشی کامل متخصصین از تست‌های بی‌هوشی کامل استفاده کردند. بعد از اطمینان از بیهوشی کامل ابتدا قسمت فوقانی جمجمه حیوان تراشیده و پس از آن توسط کاتر و قیچی بافت جمجمه برش داده شد. بعد از جداسازی بافت‌های مغز، هیپوکامپ بافت به دقت جدا شد. پس از شست و شو و وزن کردن هیپوکامپ توسط ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم) به درون میکرو تیوپ‌های ویژه نگهداری بافت منتقل شد. این نکته قابل ذکر است که سه

#### آزمون معمای آبی موریس و شاتل باکس

به منظور مطالعات یادگیری، حافظه فضایی و رفتاری موش‌های صحرائی از آزمون ماز آبی موریس و شاتل باکس استفاده شد. حرکت و رفتار حیوان به وسیله یک دوربین تلویزیونی مادون قرمز، در ارتفاع دو متری که بالای ناحیه مرکزی مخزن قرار داشت ردیابی و کنترل شد. مدتی که طول می‌کشید تا حیوان سکوی پنهان را پیدا کند، جهت گیری و مقدار کل مسافت شنا شده در هر تکرار اندازه‌گیری و ثبت شد. پروتکل اجرای این آزمون برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی، بین ۶۰ - ۱۲۰ ثانیه در هر روز و به مدت چهار روز متوالی با ثابت باقی ماندن صفحه پنهان در مکان مشخص اجرا شد. ۱۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، آزمون پروب با حذف صفحه پنهان از داخل مخزن، جهت ارزیابی حافظه موش‌های صحرائی انجام شد. مدت زمانی که موش‌های صحرائی برای پیدا کردن مکان صفحه در مخزن در ناحیه مشخص شده صرف می‌کردند به عنوان

گردید و با سرعت 14000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در ادامه RB Mini Column با 750µl از Wash Buffer 2 با سرعت 14000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. این مرحله دو بار تکرار شد. سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت 14000 rpm سانتریفیوژ انجام شد.

RB Mini Column درون Elution Tube قرار داده شد و 50µl از RNase-free ddH<sub>2</sub>O به RB Mini Column اضافه و ۱ دقیقه به آن زمان داده شد. سپس به مدت ۲ دقیقه با سرعت 14000 rpm سانتریفیوژ گردید. محلول درون Elution Tube، RNA های استخراج شده بود که در ۷۰- نگهداری شدند. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز الکتروفورز و همچنین جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه پیکو دراپ شرکت سیگما (ساخت آمریکا) خوانده شد. سپس RNA حاصله تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد.

#### سنتر cDNA

سنتر cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1621) تهیه گردید. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™-MuLV Reverse transcriptase صورت گرفت. هنگام تهیه cDNA از نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته و سپس 0.5µL oligodT Random Hexamers، 0.5µL پرایمر برای الیگودنوکیسی ری بو نوکلئوتید که به عنوان یک پرایمر برای شروع سنتر cDNA استفاده شد) به آن افزوده و سپس تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب DEPC اضافه گردید و تا دمای

بافت از هر گروه نیز برای بررسی پاتولوژی و شمارش سلولی به محلول فرمالین ۱۸ درصد منتقل شد. نمونه‌های هیپوکمپ تا زمان استخراج RNA در فریزر در دمای منفی ۸۰ درجه نگهداری شدند. پس از آن برای بررسی بیان ژن APP ابتدا با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA<sup>۱</sup> ساخت کشور هنگ کنگ طبق دستورالعمل، کل محتویات RNA سلول (total RNA) استخراج شد.

#### دستورالعمل استخراج RNA به روش ستونی

استخراج RNA به روش ستونی صورت گرفت. ابتدا بافت‌های حاصل با نیتروژن مایع منجمد و پس از آن با روش‌های مکانیکی، خرد و هموژنایز شدند. برای استخراج RNA از سلول‌های حیوانی، دیواره سلول‌ها با کمک یک بافر لیز کننده به نام RB Buffer تخریب شدند. 350µl از RB Buffer به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به‌ازای هر ۱ میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر β-mercaptoethanol به بافر اضافه شده بود) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد Filter Column درون Collection Tube قرار گرفت و مخلوط نمونه به Filter Column انتقال داده شد و با دور 14000 rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول روشن از Collection Tube به یک تیوپ میکرو سانتریفیوژ جدید انتقال یافت. سپس هم حجم آن یعنی 350µl اتانول ۷۰٪ به آن اضافه گردید و به خوبی ورت کس شد. RB Mini Column درون Collection Tube قرار گرفت و نمونه‌ای که اتانول به آن اضافه شده بود به RB Mini Column انتقال یافت و با سرعت 14000 rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در مرحله بعد 500µl Wash Buffer 1 به RB Mini Column اضافه

از Real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و از ژن  $\beta 2m$  (بتا ۲ میکروگلوبولین) به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱). تمام پرایمرها به صورت اتصال اگزون- اگزون طراحی شدند. جهت اطمینان از عدم تکثیر DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA و ۲۵ نانوگرم RNA در تیوب‌های جداگانه از واکنش PCR و به کارگیری از ژل آگاروز ۱/۵٪ استفاده شد. تکثیر cDNA و مشاهده باند مورد انتظار توسط پرایمر اختصاصی و عدم تکثیر RNA پس از واکنش PCR نمایانگر عدم تکثیر DNA ژنومی است. سپس برای هر یک از پرایمرها کارایی PCR اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای آنها رسم گردید.

۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. پس از آن به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا ساختارهای ثانویه RNA از هم باز شوند. در مرحله بعد 4μL 5X Reaction Buffer و 2μL dNTP و 1μL RiboLock RNase Inhibitor و 1 μL RevertAid RT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ قرار گرفته بودند اضافه شد. سپس ترکیب ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، بعد از آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در آخر به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب‌های واکنش را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس cDNA آماده شده جهت انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده

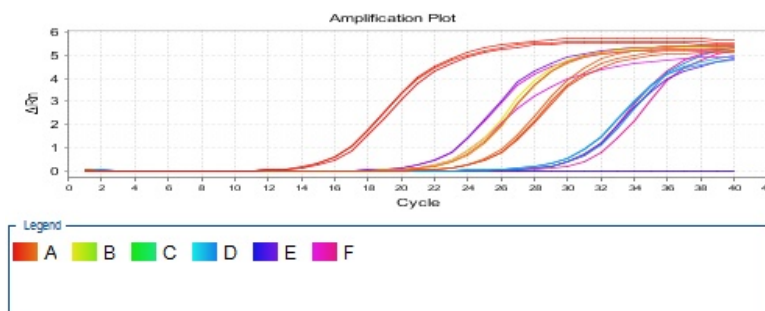
جدول ۱. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های مورد نظر جهت واکنش Real-time PCR

Genes	Primer Sequences	Sizes (Bp)
TBP	Forward: 5'- GCGGGTGCATGAAATCCAGT-3' Reverse: 5'- AGTGATGTGGGGACAAAACGA -3'	147
amyloid beta precursor protein (App)	Forward: 5'- AATGAAGGGTCTGGGTTGAC-3' Reverse: 5'- CTTCTGCAAAGAACCAGTTT-3'	124

تا باندهای DNA حاصل از واکنش PCR گردایانند مشاهده شود. کارایی Real-time PCR با استفاده از شیب خطی که از اختلاف CT به دست آمد و با استفاده از فرمول  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  محاسبه شد. پس از تعیین کارایی PCR و تأیید پرایمرها جهت بررسی بیان ژن‌ها غلظت ۲۵ نانوگرم cDNA برای هر واکنش انتخاب شد (تصویر ۳). در تمام آزمایش‌ها مقدار مساوی از cDNA ژن کنترل داخلی (GAPDH) در مقایسه به ژن مورد نظر استفاده شد. جهت بررسی بیان ژن‌ها برای گروه‌های سلولی از مخلوط PCR, RealQ 2x Master mix Green Dye (ساخت AMPLQON آلمان) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت

آنالیز کیفی DNA روی ژل آگارز انجام شد. برای این کار از بافر TAE استفاده شد. برای ساخت ژل آگارز ۱٪ در کاست ژل که ۴۰ میلی‌لیتر حجم دارد ۰/۰۶ گرم آگارز درون ارلن ریخته شد و به آن بافر اضافه گردید از بافر 10 X TAE مقدار ۴۰ میلی‌لیتر برداشته و با آب مقطر به حجم ۴۰ رسانده و به پودر آگارز اضافه شد. به ارلن حرارت داده تا دمای آن به ۴۵ تا ۵۰ درجه رسید سپس به آن ۱/۵ μL DNA Safe Stain اضافه گردید و داخل سینی الکتروفورز ریخته شد. پس از سفت شدن ژل شانه برداشته شد و ژل به همراه سینی درون تانک الکتروفورز قرار گرفت. نمونه‌ها به نسبت ۱۰ به ۱ با Loading buffer مخلوط گردید. پس از load کردن نمونه‌ها، تانک الکتروفورز به دستگاه Power supply متصل شد. پس از پایان الکتروفورز ژل آگارز روی دستگاه Gel doc قرار گرفت و اشعه UV به ژل تابانده شد

به TBP و گروه کنترل محاسبه و سپس با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان آن محاسبه گردید.



### تصویر ۳. نمونه‌ای از پلات‌های ایجاد شده در Real-Time

تحلیل واریانس دو عاملی و آزمون تعقیبی بونفرونی تجزیه و تحلیل شدند. از لحاظ آماری  $P < 0.05$  معنی‌دار تلقی شدند.

#### یافته‌ها

ابتدا از آمار توصیفی برای توصیف متغیر وابسته در گروه‌ها استفاده شد. میانگین بیان ژن APP در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شدند (جدول ۲).

#### روش‌های آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و اکسل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج ارائه شده بیان ژن، حاصل از سه تکرار ( $\pm SEM$  میانگین) آزمایش مستقل می‌باشد. میانگین سطح بیان mRNA نمونه‌های تیمار شده با میانگین نمونه‌های کنترل (برابر با ۱) مقایسه شد و اطلاعات به‌دست آمده بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون

### جدول ۲. توصیف متغیرهای وابسته (APP) پژوهش (درصد بیان نسبی نسبت به ژن 18s)

ردیف	متغیر	app
گروه		
۱	کنترل	۴/۱±۲/۰۱
۲	آلزایمر	۱/۵±۰/۶۷
۳	مکمل اکلیل‌الملک	۰/۷۱±۰/۶۳
۴	تمرین مقاومتی	۲/۴±۱/۳
۵	تمرین+ مکمل اکلیل‌الملک	۳/۰۹±۱/۷

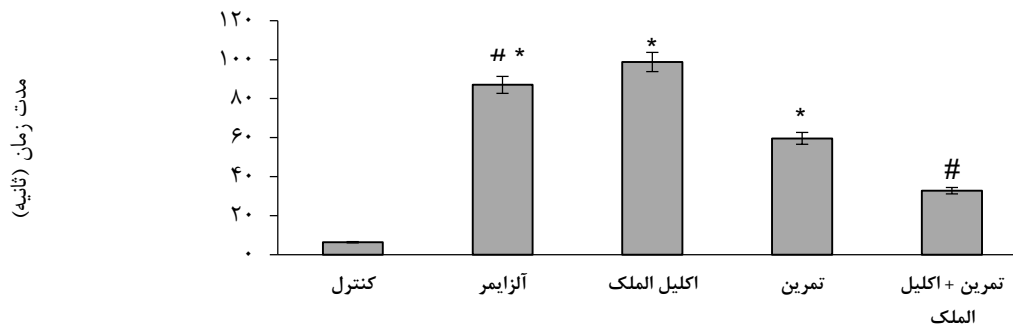
شد ( $P < 0.05$ ). نتایج آزمون ماز آبی موریس، مسافت طی شده و مدت زمان سپری‌شده نیز برای هر گروه اندازه‌گیری و ثبت شدند (جدول ۳).

از آزمون شاپیرو-ویلک برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها، آزمون لوین جهت بررسی همگنی واریانس‌ها و تحلیل واریانس دو عاملی برای مقایسه بین گروهی استفاده

جدول ۳. توصیف متغیرهای مرتبط با آزمون ماز آبی موريس

گروه	متغیر	مسافت طی شده (متر)	مدت زمان سپری شده (ثانیه)
کنترل		۰/۰±۶/۰۵	۶/۳±۳/۹
آلزایمر		۲/۰±۱/۸۹	۸۷/۲۹±۱/۰۱
اکلیل الملک		۲/۰±۰۳/۵۱	۹۸/۶۰±۸/۰۴
تمرین مقاومتی		۱/۱±۵/۰۴	۵۹/۱۲±۶/۲۸
تمرین مقاومتی+مکمل اکلیل الملک		۰/۰±۶/۴۱	۳۲/۲۱±۸/۲

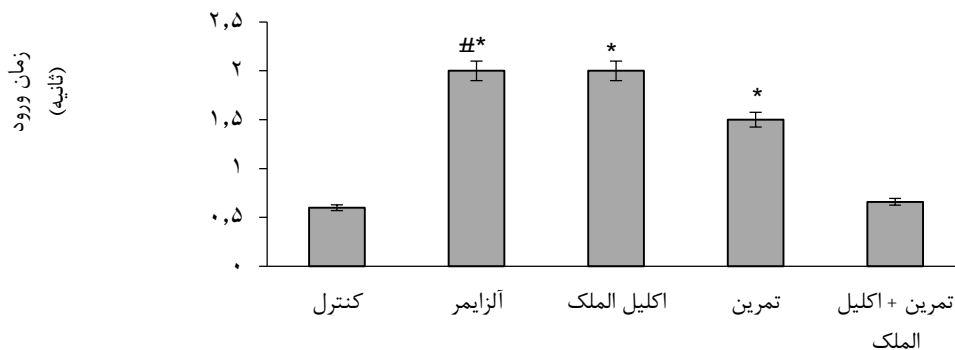
مدت زمان سپری شده در بارنز ماز برای یافتن چاهک هدف توسط موش‌ها بر حسب ثانیه بررسی و ثبت شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. مدت زمان سپری شده در بارنز ماز برای یافتن چاهک هدف توسط موش‌ها (ثانیه) (\* وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ #) وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین+ اکلیل الملک

به لحاظ آماری نشان داده‌اند. مقایسه داده‌های حاصل از آزمون شاتل باکس (زمان ورود به ناحیه تیره) و ماز بعد از القای آلزایمر در گروه‌های تحقیق بررسی و ثبت شد (نمودار ۲).

بر اساس نمودار شماره ۱، تفاوت معناداری از نظر مدت زمان سپری شده در بارنز ماز برای یافتن چاهک هدف توسط موش‌ها (ثانیه) در بین گروه‌های آزمایش وجود داشت ( $P < 0.001$ ). به جز گروه کنترل، سایر گروه‌ها القا آلزایمر را



نمودار ۲. مقایسه داده‌های حاصل از آزمون شاتل باکس (زمان ورود به ناحیه تیره) بعد از القای آلزایمر (\* وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ #) وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین+ اکلیل الملک

با استفاده از آزمون لون، همگونی واریانس‌ها و با آزمون شاپیرو-ویلک طبیعی بودن توزیع داده‌ها در گروه‌های تحت اندازه‌گیری تأیید شد. برای مقایسه بیان APP در گروه‌های مختلف از تحلیل واریانس دو عاملی استفاده شد (جدول ۴).

براساس نمودار شماره یک، تفاوت معناداری از نظر زمان ورود به ناحیه تیره در دستگاه شاتل باکس برحسب ثانیه برای یافتن چاهک هدف در بین گروه‌های آزمایش وجود داشت ( $P < 0.001$ ). به جز گروه کنترل، سایر گروه‌ها الفا آلازیم را به لحاظ آماری نشان داده‌اند.

جدول ۴. نتایج مربوط به تحلیل واریانس دو عاملی در مقادیر بیان mRNA APP جهت بررسی اثر گروه

مقدار P (معنی‌داری)	مقدار F	اندازه اثر $\eta^2$	میانگین مربعات	Df (درجه آزادی)	مجموع مربعات	آماره‌های استنباطی
						منبع واریانس
*0/003	5/2	0/312	10/9	4	43/6	تمرین
*0/001	6/3	0/445	2/07	4	51/9	اکلیل الملک
0/19	2/6	0/128	7/4	3	22/3	تعامل تمرین و اکلیل الملک

(\*) وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05

مختلف ایجاد نماید. بنابراین بین گروه‌ها در میزان mRNA APP اختلاف معنادار وجود دارد. برای بررسی جزئیات بیشتر و مقایسه دو به دوی گروه‌ها با یکدیگر از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده گردید (جدول ۵).

نتایج تحلیل واریانس دو عاملی نشان داد تعامل بین تمرین و اکلیل الملک بر میزان تغییرات بیان ژن APP تأثیر معناداری ندارد. اما تمرین به تنهایی و همچنین اکلیل الملک به تنهایی می‌تواند تفاوت معناداری بین گروه‌های

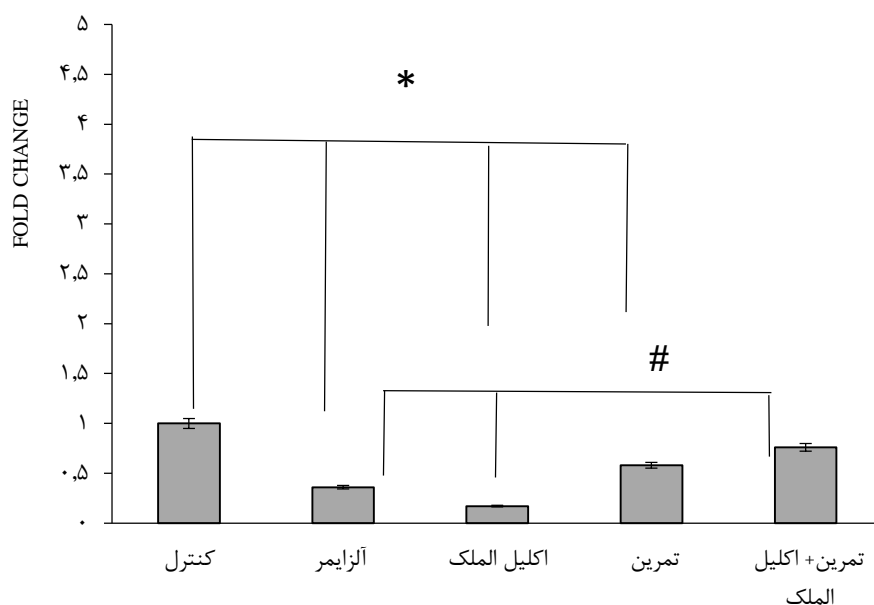
جدول ۵. نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی بین گروه‌های مختلف پژوهش در متغیر APP

مقادیر p بین گروهی	اختلاف میانگین	مقایسه گروه‌ها با یکدیگر
*0/004	2/6	آلازیمر
*0/001	3/4	اکلیل الملک
*0/004	1/7	تمرین مقاومتی
0/19	1/1	تمرین مقاومتی + اکلیل الملک
0/34	0/8	اکلیل الملک
0/28	-0/9	تمرین مقاومتی
0/07	-1/5	تمرین مقاومتی + اکلیل الملک
0/28	1/7	اکلیل الملک
0/44	-0/6	تمرین مقاومتی + اکلیل الملک
*0/009	2/3	اکلیل الملک

(\*) وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05

مقادیر mRNA APP در گروه‌های مورد آزمایش،

بررسی و مقایسه شدند (نمودار ۳).



نمودار ۳: بیان نسبی ژن APP نسبت به ژن کنترل در گروه‌های مختلف

(\* وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ #) وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین + اکلیل الملک

پژوهش ساسان و همکاران (۱۳۹۸)، زمانی و همکاران (۱۳۹۱) و سیفی و همکاران (۱۴۰۰) موافق (۱۷،۲۴،۲۵) می‌باشد و با نتایج الکس یانگ و همکاران (۲۰۱۹) در تناقض است (۲۶). در گزارش‌های انگ و همکاران دویدن اجباری (۱۲ هفته با شدت بالا) موجب افزایش حافظه و یادگیری و افزایش تعداد نورون‌های کولینرژیک شده بود (۲۷). همچنین پنج ماه فعالیت ورزشی در چرخ گردان منجر به کاهش پلاک‌های آمیلوئید در قشر پیشانی و هیپوکامپ و بهبود حافظه و یادگیری موش‌های آلزایمری تراریخته در تست ماز آبی موریس (۲۸) شده‌است. اوم و همکاران (۲۰۱۱) هم همسو با مطالعه حاضر نشان دادند دویدن روی تردمیل به مدت سه ماه می‌تواند باعث بهبود پیشگیری از روند تخریب حافظه و یادگیری ناشی از بیماری آلزایمر شود. در پژوهش حاضر زمان صرف شده برای یافتن صفحه پنهان، در گروه‌های تمرینی و مکمل اکلیل الملک

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بین گروه‌ها در سطوح mRNA ژن APP تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در متغیر APP بین گروه‌های آلزایمر، اکلیل الملک و تمرین مقاومتی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری وجود دارد ( $P < 0.005$ ). اما بین گروه کنترل با گروه آلزایمر + اکلیل الملک + تمرین مقاومتی اختلاف معناداری وجود ندارد ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان داد که در گروه آلزایمر نسبت به گروه آلزایمر + تمرین قدرتی و گروه آلزایمر + اکلیل الملک اختلاف معناداری وجود ندارد ( $P < 0.05$ ). مدت زمان سپری‌شده در بارنز ماز برای یافتن چاهک هدف و آزمون شاتل باکس نیز کاهش معنادار را در گروه تمرین و اکلیل الملک نسبت به گروه آلزایمر، تمرین و اکلیل الملک نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ). نتایج پژوهش حاضر با نتایج

کاهش سطح *cGMP* کاهش می‌یابد (۳۳). گزارشاتی مبنی بر تحریک نوروزنر توسط مکمل‌های گیاهی موجود است. لذا، این امکان وجود دارد که مهارکننده‌های *PDE5* بتوانند عملکرد نورون‌ها را تحریک کرده و نوروزنر را در افراد مسن یا در افراد مبتلا به *AD* یا سایر بیماری‌های با اختلال عملکرد هیپوکامپ بهبود بخشند. از علل *AD* پلاک‌های خارج سلولی آمیلوئیدهای بتا (۳۴) و کلاهای رشته‌های درهم تابیده داخل نورون پروتئین تائو هستند (۳۵). البته هدف قرار دادن پلاک‌های آمیلوئید ایجاد شده توسط *APP* در سیستم ایمنی ممکن است موفقیت آمیزتر باشد (۳۶). کاهش این پروتئین منجر به کاهش پلاک‌های بتا آمیلوئید شده و در نتیجه احتمال بهبود این بیماری زیاد می‌شود. همچنین زمانی که مداخله‌های فعالیت ورزشی و ترکیب فعالیت ورزشی به‌همراه مکمل اکلایل الملک اضافه شد سطح بیان ژن‌های این دو متغیر به سطح بیان گروه کنترل که یک گروه سالم می‌باشد نزدیک‌تر شد. به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی به‌همراه مکمل اکلایل الملک می‌تواند این تعدیلات را برای بهبود شرایط آلزایمری انجام دهد.

تخریب لیزوزومی و فرایند اتوفاژی در بیماری آلزایمر، برای تخریب سیناپس و مرگ نورون مطرح شده‌است. آمیلوئید بتا و تائو دارای ارتباطات متقابل و اثرات توأم می‌باشند. بسیاری از مسیرهای مولکولی که منجر به تخریب سیناپس و مرگ نورون می‌شوند، با هم میان‌کنش دارند و فرضیه واحدی را برای عوامل مولکولی لقاء بیماری آلزایمر نمی‌توان ارائه کرد (۱۹).

فعالیت بدنی منظم برای سبک‌زندگی سالم با تعدیل سازگاری‌های *CNS* و به‌خصوص هیپوکامپ که در یادگیری و حافظه نقش به‌سزایی دارد به‌عنوان یک ضرورت تأثیر می‌گذارد (۳۷). ورزش موجب بهبود عملکرد عضلانی و افزایش یادگیری و حافظه می‌گردد و با افزایش بیان فاکتورهای محافظت‌کننده نوروونی در ارتباط است. تنظیم

کمتر بود. در نمونه انسانی، گزارش‌ها حاکی از آن است که افراد با شرایط فیزیکی مناسب از نظر عملکرد شناختی و حافظه در مقایسه با هم‌تایان کم‌تحرک بهتر عمل می‌کنند (۲۹). اریکسون و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند ورزش هوازی منظم منجر به افزایش دو درصدی حجم هیپوکامپ قدامی، بهبود حافظه فضایی و افزایش سطح *BDNF* شده که از نظر ادراک حالت عادی دارند (۳۰). پروتکل تمرینی یانگ و همکاران (۲۰۱۹) یک جلسه بود که منجر به کاهش *BACE1* و افزایش *BDNF* شده بود. دلیل احتمالی کاهش بیان ژن در مطالعه یانگ و همکاران یک جلسه فعالیت ورزشی می‌تواند باشد و متفاوت از پروتکل پژوهش حاضر (یک دوره فعالیت ورزشی) است. همچنین به نظر می‌رسد در مداخله آلزایمر و اکلایل الملک میزان بیان ژن کاهش می‌یابد. اما در مداخله فعالیت ورزشی به‌همراه اکلایل الملک میزان بیان ژن‌ها به سطح عادی می‌رسد و در واقع تعدیل می‌شوند. کاهش بیش از حد و احتمالاً افزایش بیش از حد بیان ژن، می‌تواند منجر به ایجاد شرایط نامناسب برای بیماری آلزایمر شود. لذا به نظر می‌رسد یک تعدیل مناسب از بیان ژن *APP* برای بهبود روند بیماری آلزایمر لازم باشد. مکانیسمی که از طریق آن می‌توان به اثرات مفید تمرین مقاومتی و تمرینات دوره‌ای بر ساختار و عملکرد مغز پی برد، هنوز به‌طور کامل ارائه نشده‌است، اما می‌توان آن را به کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی و آزادسازی نوروتروفین‌ها نسبت داد به‌ویژه در ساختار هیپوکامپ (۳۱). همچنین نتایج تحقیق نشان داد که مصرف مکمل اکلایل الملک منجر به جلوگیری از کاهش بیشتر *APP* در گروه تمرین و اکلایل الملک شد. تفاوت معنی‌دار در سطح بیان *APP* بین گروه‌ها منجر به عملکرد بهتر در آزمون شناختی شد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که مکمل اکلایل الملک با افزایش سطح *cGMP* نقش بالقوه‌ای در نوروزنر دارد (۳۲) چون رشد نورون‌ها با افزایش سن به‌دلیل

ویتامین‌های موجود در اکلیل الملک مانند ویتامین‌های گروه B می‌توانند خطر از دست دادن حافظه و زوال شناختی را کاهش دهند و بر سیستم عصبی و نگهداری سلول‌ها در مغز مؤثر باشند. همچنین اکلیل الملک از طریق رقیق کردن خون موجب کاهش نفوذپذیری مویرگ‌ها شده است و از تشکیل لخته خون در مغز می‌کاهد. مکانیسم‌های احتمالی نقش اکلیل الملک بر بیماری آلزایمر به‌عنوان یک عامل ضد التهابی و ضد اکسیدانی هم مطرح شده‌است (۴۱) که با استرس اکسیداتیو و آسیب رادیکال‌های آزاد در آلزایمر مقابله می‌کند. اثرات تقویتی اسیدفولیک و ویتامین B12 بر حافظه فضایی در موش صحرائی نر بالغ مدل بیماری آلزایمر هم مشخص شده‌است (۲۷). محدودیت‌های تحقیق شامل تعداد نمونه محدود، استفاده از نمونه‌های حیوانی، هزینه و مشکلات ناشی از تحقیقات آزمایشگاهی بود.

عصاره اکلیل الملک به‌همراه تمرین مقاومتی می‌تواند موجب هم‌افزایی اثرات مقابله با آلزایمر شوند، بیان ژن APP را کاهش دهند و با توقف یا کاهش گسترش آلزایمر بر زمان انجام فعالیت جسمانی و حافظه مؤثر باشند و موجب بهبود عملکرد شناختی شوند. احتمالاً با گنجاندن ورزش و اکلیل الملک در سبک‌زندگی، پیشرفت بیماری آلزایمر و سایر بیماری‌های مرتبط با زوال عقل به تأخیر خواهند افتاد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا است. بدین وسیله از تمامی همکارانی که در آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد مرودشت در اجرای این تحقیق ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی میشود.

منفی بیان ژن بتا سکرِت از با نوروتروفین‌ها و کاهش رسوبات پلاک‌های آمیلوئید در ارتباط هستند (۳۸). بنابراین احتمال کاهش این ژن طی مداخله ورزش توسط واکنش فاکتورهای محافظت‌کننده نورونی وجود دارد. بیان پروتئین بتا سکرِت از در بافت مغز بسیار بیشتر از دیگر بافت‌ها است و بیان این پروتئین با افزایش سن بالا می‌رود. لذا امکان کاهش پروتئین بتا سکرِت از و پروتئین APP با توجه به اثرات تمرین و اکلیل الملک وجود دارد.

دی‌آلمیدا و همکاران (2022) هم نشان دادند یک پروتکل متناوب تمرین مقاومتی به‌مدت ۴ هفته موجب کاهش بار آمیلوئید بتا، اندازه و کمیت پلاک‌ها شده‌است (۳۹). مکانیسم‌های احتمالی، کاهش بیان آنزیم‌های مسئول تشکیل آمیلوئید بتا، کاهش آستروگلیوز و تعدیل فعالیت میکروگلیال است (۱۳). ورزش همچنین می‌تواند بیان آنزیم‌های تجزیه‌کننده آمیلوئید بتا را افزایش دهد (۱۲). بر طبق نتایج تمرین مقاومتی تعداد پلاک‌های آمیلوئید بتا را در هیپوکامپ حیوانات کاهش داد. البته هاشیگوجی (۲۰۲۰) کاهش حجم پلاک‌ها و بیان پیت‌ید آمیلوئید بتا را نشان داده‌اند اما نتوانستند تفاوت‌هایی را در سطوح پروتئین APP پیدا کنند. احتمالاً تمرین مقاومتی اثرات خود را از طریق مکانیسم‌های متمایز از تمرینات هوازی اعمال می‌کند (۴۰). ورزش هوازی *BDNF/TrkB* را تعدیل می‌کند، در حالی که تمرین مقاومتی مسیرهای *AKT* و *IGF-1/IGF-1R* را فعال می‌کند. علاوه بر سن، نوع برنامه تمرینی ممکن است بر پاسخ رفتاری و سطح استرسی تأثیر بگذارد (۵). تمرین مقاومتی ممکن است برای حیوانات استرس‌زا باشد و تغییرات هورمونی بر فعال شدن *BACE1* (آنزیم پردازشگر APP) از طریق مسیر آمیلوئیدوژنیک و در نتیجه تشکیل پپتیدهای آمیلوئید بتا اثر بگذارد. (۵)

## References

1. Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's disease: pathogeny, etiology, and related therapeutic directions. *Molecules*. 2022; 27:1210.
2. Lyons CE, Bartolomucci A. Stress and Alzheimer's disease: a senescence link? *Neurosci. Biobehav*. 2020; 115:285–298.
3. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133, 155–175.
4. Wang H, Li Q, Sun S, Chen S. Neuroprotective effects of Salidroside in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2020; 40, 1133–1142.
5. Zhang SQ, Cao LL, Liang YY, Wang P. The molecular mechanism of chronic high-dose corticosterone-induced aggravation of cognitive impairment in APP/PS1 transgenic mice. *Front. Mol. Neurosci*. 2021; 13:613421.
6. Hörder H, Johansson L, Guo X, Grimby G, Kern S, Östling S, et al. Midlife cardiovascular fitness and dementia: a 44-year longitudinal population study in women. *Neurology*. 2018; 90, e1298–e1305.
7. Liu-Ambrose T, Nagamatsu LS, Voss MW, Khan KM, Handy TC. Resistance training and functional plasticity of the aging brain: a 12-month randomized controlled trial. *Neurobiol. Aging*. 2012; 33: 1690–1698.
8. Tapia-Rojas C, Aranguiz F, Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Voluntary running attenuates memory loss, decreases neuropathological changes and induces neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2016; 26, 62–74.
9. Kennedy G, Hardman RJ, Macpherson H, Scholey AB, Pipingas A. How does exercise reduce the rate of age-associated cognitive decline? A review of potential mechanisms. *J. Alzheimers Dis*. 2017; 55: 1–18.
10. Lourenco MV, Frozza RL, de Freitas GB, Zhang H, Kincheski GC, Ribeiro FC, et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat. Med*. 2019; 25, 165–175.
11. Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science*. 2018; 361:eaan8821. doi: 10.1126/science.aan8821.
12. Campos HC, Ribeiro DE, Hashiguchi D, Glaser T, Milanis MdS, Gimenes C, Suchecki D, Arida RM, Ulrich H, Longo BM. Neuroprotective effects of resistance physical exercise on the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Neurosci*. 2023; 17:132 825.
13. Hashiguchi D, Campos HC, Wuo-Silva R, Faber J, Gomes da Silva S, Coppi AA, et al. Resistance exercise decreases amyloid load and modulates inflammatory responses in the APP/PS1 mouse model for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*. 2020; 73, 1525–1539
14. De Frutos-Lucas J, López-Sanz D, Zuluaga P, Rodríguez-Rojo IC, Luna R, López ME, et al. Physical activity effects on the individual alpha peak frequency of older adults with and without genetic risk factors for Alzheimer's disease: a MEG study. *Clin. Neurophysiol*. 2018; 129, 1981–1989.

15. Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-Castro C, Sanchez-Varo R, and Davila JC, et al. Microglia in Alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative. *Front. Aging Neurosci.* 2018; 10, 140.
16. Hosseini S, Mogimi A, Iman M. Design and Docking Study of Novel Oximes as Deactivator are of Inhibited Acetyl cholinesterase with Nerve Agents. *J. Military Medicine.* 2018; 20(2):170-180.
17. Seifi Nahavandi B, Yaghmaei P, Ahmadian S, Ebrahim-Habibi A, Ghobeh M. Effects of Terpinolene and Physical Activity on Memory and Learning in a Model of Alzheimer's Disease among Rats. *Qom Univ Med Sci J.* 2020; 14(10):25-33.
18. Hasanzadeh B, Farhadi A. Effect of Combined Exercise and Ginkgo Biloba Supplementation for 8 Weeks on Brain-derived Neurotrophic Factor Level in Depressed Older Men. *Salmand: Iranian Journal of Ageing.* 2021; 16(2):234-247.
19. Mesbahzadeh B, Hassanzadeh-Taheri M, Vazifeshenas-Darmiyan K, Moodi N, Hosseini M. Effect of Co-administration of Astragalus hamosus L. ethanol Extract and Metformin on Reproductive Parameters in Diabetic Male Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2022; 31(206):14-29.
20. Faraji F, Tavakoli H, Jafari M, Eidi A, Divsalar A. Measurement of Glutamate Neurotransmitter in the Brain of Male Rat Using Glutamate Oxidase-Based Electrochemical Biosensor. *Journal of Ilam University of Medical Sciences.* 2023; 31(2): 65-75.
21. Alipour F, Mohammadzadeh E, Khareavi B. Investigating the process of apoptosis in rat hippocampal tissue in a laboratory model of Alzheimer's disease. *Shafai Khatam Neurosciences.* 2013; 2(2):13-20.
22. Godfrey JK, Kayser BD, Gomez GV, Bennet J, Jaque SV. Interrupted Resistance Training and BMD in Growing Rats. *International Journal of Sports Medicine.* 2009; 30(8):579-84.
23. Greg K, Hardmana RJ, Helen M, Scholey AB. How Does Exercise Reduce the Rate of Age-Associated Cognitive Decline? A Review of Potential Mechanisms. *Journal of Alzheimer's disease.* 2017; 55(1):1-18.
24. Sasan H, Samareh Gholami A, Hashemabadi M. Alteration in the Expression of Alzheimer's-Related Genes in Rat Hippocampus by Exercise and Morphine Treatments. *Shafaye Khatam.* 2019; 7(4):23-29.
25. Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A. Effect of Royal Jelly on Improving Passive Avoidance Learning and Spatial Learning and Memory in Rats. *JSSU.* 2012; 20(2):211-19.
26. Yang AJ, Hayward GC, MacPherson RE. Acute exercise and brain BACE 1 protein content: A time course study. *Physiological Reports.* 2019; 7(8):e14084.
27. Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moochhala S, Ng Y-K. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain research.* 2006; 1113(1):186-93.
28. Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2005; 25(17):4217-21.

29. Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Kim EJ, Yang CH, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience research*. 2011; 69(2):161-73.
30. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2011; 108(7):3017-22.
31. Pennisi M, Crupi R, Di Paola R, Ontario ML, Bella R, Calabrese EJ, et al. Inflammasomes, hormesis, and antioxidants in neuroinflammation: role of NRLP3 in Alzheimer disease. *Journal of neuroscience research*. 2017; 95(7):1360-72.
32. Taddei E, Giachetti D. Pharmacological action of morphine in the rat chronically treated with clomipramine. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1986; Jul 30; 62(7):857-63.
33. Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, et al. Phosphodiesterase 5 Inhibition Improves Synaptic Function, Memory, and Amyloid- $\beta$  Load in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Neurosci*. 2009 Jun 24; 29(25): 8075–8086.
34. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Brashear HR. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370(4):322-333.
35. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016; 537(7618):50-56.
36. Kosten TR, George TP. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Sci Pract Perspect*. 2002 Jul; 1(1):13–20.
37. Barati Z, Yaghoubi A, Jalilvand MR. Effect of Continuous and Interval Training on Amyloid  $\beta$  42 (A $\beta$ 42) and Malondialdehyde (MDA) Levels in Hippocampus of Elderly Rats. *JSSU*. 2021; 29(9):4083-4095.
38. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*. 2011; 4(1):1-13.
39. De Almeida EJR, Ibrahim HJ, Chitolina Schetinger MR, de Andrade CM, Cardoso AM. Modulation of inflammatory mediators and microglial activation through physical exercise in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurochem. Res*. 2022; 47, 3221–3240.
40. Gaitán JM, Moon HY, Stremlau M, Dubal DB, Cook DB, Okonkwo OC, et al. Effects of aerobic exercise training on systemic biomarkers and cognition in late middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol*. 2021; 12:660181.
41. Bazazzadegan N, Dehghan Shasaltaneh M, Saliminejad K, Kamali K, Mehdi Banan, et al. Effects of Herbal Compound (IMOD) on Behavior and Expression of Alzheimer's Disease Related Genes in Streptozotocin-Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Adv Pharm Bull*. 2017; 7(3), 491-494.