

The effect of aerobic exercise and ethanolic extract of *Salvia officinalis* on locomotor-exploratory performance and gene expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the hippocampal tissue of rats with alzheimer's disease rats

Marzieh Rahimi¹ , Mehdi Kargarfard^{2*} , Brandon Shaw³ 

1. Ph.D Candidate in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
3. Professor at School of Sport, Rehabilitation and Exercise Sciences, University of Essex, Colchester, England.

Extended Abstract

Background and Aim: Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia worldwide, and neuroinflammation, particularly tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), plays a critical role in its pathogenesis. Given the adverse side effects of current pharmacological treatments, non-pharmacological interventions such as aerobic exercise and herbal supplements have attracted increasing attention. *Salvia officinalis* (sage) is a medicinal plant with known anti-inflammatory and antioxidant properties. Aerobic exercise has also been shown to improve cognitive function and reduce neuroinflammation in various animal models. However, the combined effects of these two interventions on AD-related outcomes remain poorly understood. Therefore, this study aimed to investigate the independent and combined effects of aerobic exercise and ethanolic extract of *Salvia officinalis* on locomotor-exploratory performance and TNF- α levels in an animal model of AD. The findings may provide a novel, safe, and effective therapeutic strategy for managing AD-related neuroinflammation and behavioral deficits. **Materials and Methods:** This experimental study was conducted on 48 male Wistar rats weighing 270–300 g and aged 8–10 months. The animals were housed under standard laboratory conditions (temperature: 22 $\pm$ 20 °C, humidity: 50 $\pm$ 55%, and a 12-hour light/dark cycle) with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the university and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The rats were randomly divided into five experimental groups (n = 8 per group): (1) diseased control (TMT), (2) sham (receiving solvent), (3) *Salvia officinalis* extract (50 mg/kg, intraperitoneally, 7 days per week), (4) aerobic exercise (8 weeks, 3 sessions per week), and (5) aerobic exercise + *Salvia officinalis* extract. Additionally, eight healthy rats were considered as the healthy control group (HC). Alzheimer's disease was induced by a single intraperitoneal injection of trimethyltin (TMT) at a dose of 10 mg/kg. The sham group received an equal volume of normal saline as the solvent. The *Salvia officinalis* extract was prepared using the ethanolic extraction method and administered intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg for the treatment groups. The aerobic exercise protocol consisted of treadmill running for 8 weeks, three sessions per week, with each session lasting 30 minutes at a speed of 10–15 m/min. Locomotor-exploratory performance was assessed using the open field test. In this test, each rat was placed in the center of an open field arena (100 $\times$ 100 $\times$ 40 cm) and allowed to explore freely for 5 minutes. The total distance traveled, number of rearing, and time spent in the center were recorded as indicators of locomotor and exploratory activity. At the

* **Corresponding Author Address:** Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Email: m.kargarfard@spr.ui.ac.ir

end of the study, the animals were anesthetized, and brain tissue samples were collected for molecular analysis. The expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was evaluated by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Total RNA was extracted from the hippocampal tissue, and complementary DNA (cDNA) was synthesized. The relative expression of TNF- α was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with GAPDH as the internal control. Data were analyzed using SPSS software (version 22). All values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was used to compare the means among the groups. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Findings: The results of this study demonstrated that induction of Alzheimer's disease (AD) by trimethyltin (TMT) caused significant behavioral and molecular alterations in the diseased control group compared to the healthy control group. Specifically, AD induction led to a significant decrease in the distance traveled in the open field test ($p = 0.001$), indicating impaired locomotor activity. Additionally, the time spent in the center of the field was significantly reduced ($p = 0.001$), reflecting increased anxiety-like behavior and reduced exploratory tendency. The number of rearings also showed a significant decrease ($p = 0.001$), suggesting diminished exploratory behavior and motor function. In contrast, the number of defecations significantly increased ($p = 0.001$), which is a well-known indicator of heightened emotionality and anxiety in rodents. Furthermore, the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was significantly elevated in the diseased control group compared to the healthy control group ($p = 0.001$), confirming the presence of neuroinflammation in the AD model. Both individual interventions, including aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract, significantly improved the behavioral indices and reduced TNF- α levels compared to the diseased control group ($p = 0.001$). The aerobic exercise group showed a significant increase in the distance traveled, time spent in the center, and number of rearings, along with a significant decrease in the number of defecations and TNF- α levels. Similarly, the *Salvia officinalis* extract group exhibited significant improvements in all behavioral parameters and a notable reduction in TNF- α levels compared to the diseased control group. More importantly, the combined intervention (aerobic exercise + *Salvia officinalis* extract) was significantly more effective than either individual intervention alone ($p = 0.001$). The combined group demonstrated the greatest improvement in locomotor-exploratory performance, including the highest increase in distance traveled, time spent in the center, and number of rearings, as well as the greatest reduction in the number of defecations. Moreover, the greatest reduction in TNF- α levels was observed in this combined group, indicating a synergistic anti-inflammatory effect of aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract. These findings suggest that both aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract, either alone or in combination, can effectively ameliorate AD-induced behavioral deficits and neuroinflammation. However, the combined intervention appears to provide the most pronounced therapeutic benefits, likely due to the synergistic effects of exercise-induced neuroplasticity and the anti-inflammatory properties of *Salvia officinalis*. These results support the potential of non-pharmacological combined interventions as a safe and effective strategy for managing AD-related behavioral and inflammatory complications.

Table 1. Behavioral indices and TNF- α gene expression in the study groups: ANOVA results and descriptive statistics

Variable	Healthy control	Diseased control	Sham	<i>Salvia officinalis</i>	Aerobic exercise	Exercise + <i>Salvia officinalis</i>	Mean Square	F	Sig.
Distance traveled (m)	45.42 $\pm$ 2.19	12.62 $\pm$ 1.99	13.28 $\pm$ 1.82	24.85 $\pm$ 1.64	26.14 $\pm$ 0.83	32.85 $\pm$ 2.23	1225.94	358.59	0.001
Time spent in center (s)	242.00 $\pm$ 6.67	45.75 $\pm$ 9.77	47.14 $\pm$ 1.32	80.85 $\pm$ 4.15	82.00 $\pm$ 3.46	121.42 $\pm$ 6.09	43116.40	825.78	0.001
Number of rearings	13.14 $\pm$ 0.83	3.12 $\pm$ 1.12	2.71 $\pm$ 1.03	7.85 $\pm$ 0.98	9.28 $\pm$ 1.03	12.00 $\pm$ 1.19	153.31	141.69	0.001
Number of defecations	4.71 $\pm$ 1.03	12.87 $\pm$ 0.83	12.14 $\pm$ 1.55	8.57 $\pm$ 1.29	8.42 $\pm$ 1.59	6.42 $\pm$ 1.59	92.27	50.79	0.001
Percentage of non-	95.12 $\pm$	30.50 $\pm$	30.87 $\pm$	51.83 $\pm$	54.50 $\pm$	58.62 $\pm$ 1.59	50/4488	24/1005	0.001

repetitive alternations (%)	2.64	2.72	1.64	0.03	1.60				
TNF- α gene expression (relative expression)	1.00 $\pm$ 0.02	2.91 $\pm$ 0.09	2.92 $\pm$ 0.05	2.12 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.02	5.53	2441.61	0.001

Conclusion: The findings of this study demonstrated that both aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract significantly improve locomotor-exploratory performance in an animal model of Alzheimer's disease (AD). These beneficial effects appear to be mediated through the reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and the modulation of inflammatory responses. Notably, the combination of aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract exhibited a synergistic effect, leading to greater improvements in behavioral indices and a more pronounced reduction in TNF- α levels compared to either intervention alone. Therefore, this combined non-pharmacological approach may serve as a safe and effective strategy to help slow the progression of AD and alleviate its behavioral and inflammatory complications. Further studies are recommended to explore the underlying molecular mechanisms and to confirm these findings in clinical settings.

Keywords: Aerobic training, *Salvia officinalis* extract, Locomotor-exploratory performance, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Alzheimer's disease.

Ethical Considerations: Compliance with ethical guidelines: All ethical principles for working with laboratory animals were followed according to the Helsinki Convention and under the supervision of the Biomedical Research Ethics Committee of the University of Isfahan with approved code IR.UI.REC.1404.211.

Funding: This research was financially supported by the University of Isfahan.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.



تأثیر تمرین هوازی و عصاره اتانولی مریم‌گلی بر عملکرد حرکتی - اکتشافی و بیان ژن فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا ($TNF-\alpha$) در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری آلزایمر

مرضیه رحیمی^۱ ID، مهدی کارگرفرد^۲ ID*، براندون شاو^۳ ID

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳. استاد دانشکده ورزش، بازتوانی و علوم ورزشی، دانشگاه اسپکس، کالجستر، انگلستان

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر (AD) شایع‌ترین علت دمانس است و التهاب عصبی و فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا ($TNF-\alpha$) در پاتوژنز آن نقش دارند. با توجه به عوارض داروهای موجود، مداخلات غیردارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این پژوهش با هدف بررسی اثرات مستقل و ترکیبی تمرین هوازی و عصاره اتانولی مریم‌گلی بر عملکرد حرکتی - اکتشافی و سطح $TNF-\alpha$ در مدل حیوانی AD انجام شد. **روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی نر ویستار (وزن، ۲۷۰-۳۰۰ گرم و سن، ۸-۱۰ ماهه) به پنج گروه شامل: کنترل بیمار، شم، عصاره مریم‌گلی (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم، درون صفاقی، ۷ روز در هفته)، تمرین هوازی (۸ هفته، ۳ جلسه در هفته) و تمرین هوازی+عصاره مریم‌گلی تقسیم شدند. هشت موش سالم نیز به عنوان کنترل سالم در نظر گرفته شدند. با AD با تزریق تک‌دوز درون صفاقی تری‌متیل قلع (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) القا شد. عملکرد حرکتی - اکتشافی با آزمون میدان باز و $TNF-\alpha$ با Real-Time PCR ارزیابی شد. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. **یافته‌ها:** القای AD موجب کاهش معنی‌دار مسافت طی شده ($p=0/001$)، زمان حضور در مرکز میدان ($p=0/001$)، تعداد ایستادن روی دو پا ($p=0/001$) و افزایش تعداد دفع مدفوع ($p=0/001$) و $TNF-\alpha$ نسبت به کنترل سالم شد ($P=0/001$) هر دو مداخله منفرد شاخص‌های رفتاری را بهبود داده و $TNF-\alpha$ را کاهش دادند ($P=0/001$) مداخله ترکیبی در مقایسه با هر یک از مداخلات منفرد مؤثرتر بود ($P=0/001$) و بیشترین کاهش $TNF-\alpha$ در این گروه مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** تمرین هوازی و عصاره مریم‌گلی با کاهش $TNF-\alpha$ و تعدیل پاسخ‌های التهابی، عملکرد حرکتی - اکتشافی را در مدل حیوانی AD بهبود می‌بخشند. ترکیب این مداخلات اثر هم‌افزایی نشان داد و می‌تواند به عنوان رویکردی غیردارویی برای کمک به کند کردن روند پیشرفت بیماری مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، عصاره مریم‌گلی، عملکرد حرکتی - اکتشافی، فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا، بیماری آلزایمر.

* آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

پست الکترونیک: m.kargarfard@spr.ui.ac.ir

The effect of aerobic exercise and ethanolic extract of *Salvia officinalis* on locomotor-exploratory performance and gene expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the hippocampal tissue of rats with alzheimer's disease

RatsMarzieh Rahimi¹ , Mehdi Kargarfard^{2*} , Brandon Shaw³ 

1. Ph.D Candidate in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
3. Professor at School of Sport, Rehabilitation and Exercise Sciences, University of Essex, Colchester, England.

Abstract

Background and Aim: Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, and neuroinflammation and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) play a role in its pathogenesis. Considering the side effects of existing medications, non-pharmacological interventions have gained attention. This study aimed to investigate the independent and combined effects of aerobic exercise and ethanolic extract of *Salvia officinalis* on locomotor-exploratory performance and TNF- α levels in an animal model of AD. **Materials and Methods:** In this experimental study, 48 male Wistar rats (weight: 270–300 g; age: 8–10 months) were divided into five groups: diseased control, sham, *Salvia officinalis* extract (50 mg/kg, intraperitoneally, 7 days per week), aerobic exercise (8 weeks, 3 sessions per week), and aerobic exercise + *Salvia officinalis* extract. Eight healthy rats were also considered as the healthy control group. AD was induced by a single intraperitoneal injection of trimethyltin (10 mg/kg). Locomotor-exploratory performance was assessed using the open field test, and TNF- α was evaluated by real-time PCR. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test. **Findings:** AD induction caused a significant decrease in the distance traveled ($p = 0.001$), time spent in the center of the field ($p = 0.001$), and number of rearings ($p = 0.001$), and a significant increase in the number of defecations ($p = 0.001$) and TNF- α levels compared to the healthy control ($p = 0.001$). Both individual interventions improved behavioral indices and reduced TNF- α ($p = 0.001$). The combined intervention was more effective than either individual intervention ($p = 0.001$), and the greatest reduction in TNF- α was observed in this group. **Conclusion:** Aerobic exercise and *Salvia officinalis* extract improve locomotor-exploratory performance in an animal model of AD by reducing TNF- α and modulating inflammatory responses. The combination of these interventions showed a synergistic effect and can be considered as a non-pharmacological approach to help slow the progression of the disease.

Keywords: Aerobic training, *Salvia officinalis* extract, Locomotor-exploratory performance, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Alzheimer's disease.

* **Corresponding Author Address:** Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Email: m.kargarfard@spr.ui.ac.ir



بیماری آلزایمر^۱ شایع‌ترین علت دمانس و یک اختلال نورودژنراتیو پیشرونده است که با تجمع غیرطبیعی پروتئین‌های آمیلوئید-بتا^۲ و هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو^۳، منجر به تخریب نورون‌ها و زوال عملکردهای شناختی از جمله حافظه و کارکردهای اجرایی می‌شود (۱). بر اساس گزارش‌های اپیدمیولوژیک، شیوع این بیماری با توجه به روند پیری جمعیت جهانی، از حدود ۵۷ میلیون نفر در سال‌های اخیر به‌طور چشمگیری رو به افزایش است و این روند در دهه جاری نیز ادامه‌دار خواهد بود (۲). سن بالا، حضور آلل^۴ APOE ε4، بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت، و کم‌ تحرکی از مهم‌ترین عوامل خطر این بیماری محسوب می‌شوند (۳). از منظر آسیب‌شناختی-فیزيولوژیک، اختلال شناختی در آلزایمر حاصل مجموعه‌ای از فرآیندها شامل التهاب عصبی مزمن^۵، فشار اکسایشی^۶، اختلال در انتقال سیناپسی و در نهایت آتروفی^۷ نواحی کلیدی مغز مانند هیپوکامپ^۸ است (۴). در این میان، التهاب عصبی به عنوان یکی از محورهای اصلی در پاتوژنز بیماری آلزایمر شناخته می‌شود. نشانگرهای پیش‌التهابی^۹ نظیر فاکتور نکروزدهنده توموری آلfa¹⁰ (TNF-α) نقش کلیدی در این فرایند ایفا می‌کنند. افزایش سطح این سیتوکین^{۱۱} در مغز و به‌ویژه هیپوکامپ، نه تنها با تشدید پاسخ‌های التهابی و آسیب نورونی همراه است، بلکه می‌تواند از طریق اختلال در مسیرهای پیام‌دهی^{۱۲} نوروتروفیک^{۱۳}، به‌طور مستقیم به افت عملکردهای شناختی و حرکتی-اکتشافی^{۱۴} منجر شود (۵). بنابراین، تعدیل سطح این فاکتور التهابی می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی مؤثر در مدیریت بیماری آلزایمر مدنظر قرار گیرد. در سال‌های اخیر، رویکردهای غیردارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر و هزینه‌های پایین‌تر، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. در این راستا، فعالیت ورزشی منظم به عنوان یک مداخله مؤثر و در دسترس، نقشی حیاتی در پیشگیری و کند کردن روند بیماری‌های نورودژنراتیو ایفا می‌کند (۶).

تمرینات هوازی، به‌طور ویژه، از طریق افزایش فاکتورهای نوروتروفیک مانند فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز¹⁵ (BDNF)، بهبود نورونز^{۱۶} در هیپوکامپ، افزایش جریان خون مغزی، و کاهش تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی^{۱۷}، به بهبود عملکرد شناختی کمک می‌نمایند (۷، ۸)، در این زمینه، تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین هوازی می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های التهابی از جمله TNF-α در هیپوکامپ، از آسیب‌های عصبی ناشی از بیماری آلزایمر بکاهد (۹، ۱۰). به‌طوری‌که، قاسمی و همکاران (۱۴۰۰) نشان دادند که چهار هفته تمرین هوازی تأثیر مثبتی بر بهبود یادگیری و حافظه در موش‌های آلزایمری داشته و این بهبود با کاهش شاخص‌های التهابی

¹ Alzheimer's disease

² Amyloid-beta

³ Hyperphosphorylation of tau protein

⁴ APOE ε4 allele

⁵ Chronic neuroinflammation

⁶ Oxidative stress

⁷ Atrophy

⁸ Hippocampus

⁹ Pro-inflammatory

¹⁰ Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α)

¹¹ cytokine

¹² Signaling pathways

¹³ Neurotrophic

¹⁴ Locomotor-exploratory function / Motor-exploratory performance

¹⁵ Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

¹⁶ Neurogenesis

¹⁷ Amyloid plaques



مرتبط است (۱۰). در کنار ورزش، استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی به عنوان رویکردی مکمل، مورد توجه گسترده قرار گرفته است.

عصاره مریم^۱ یکی از مهم ترین گونه های دارویی خانواده نعنائیان^۲ است که در مطالعات متعدد، اثرات محافظت کنندگی آن بر سیستم عصبی به اثبات رسیده است (۱۱). ترکیبات فعال این گیاه، از جمله مونوترپن ها^۳ و پلی فنول های^۴ مانند سینئول-۱،۸^۵ و رزمارینیک اسید^۶، از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز^۷، افزایش سطح استیل کولین^۸، سیناپسی، و مهار مسیرهای التهابی^۹ نظیر فاکتور هسته ای کاپا بی^{۱۰}، به بهبود عملکرد حافظه و کاهش آسیب های عصبی کمک می کنند (۱۲، ۱۳). شواهد نشان می دهد که عصاره مریم گلی از طریق کاهش سطح سیتوکین های پیش التهابی نظیر (TNF- α) در بافت مغز، می تواند به کاهش التهاب عصبی و در نتیجه بهبود عملکرد شناختی در مدل های حیوانی و انسانی بیانجامد (۱۲، ۱۴). در این زمینه، آخوندزاده و همکاران (۲۰۰۳) در یک کارآزمایی بالینی نشان دادند که مصرف ۴ ماهه عصاره مریم گلی در بیماران مبتلا به آلزایمر خفیف تا متوسط، منجر به بهبود معنی داری در نمرات آزمون های شناختی گردید (۱۴).

با وجود شواهد امیدوارکننده برای هر یک از این دو مداخله به تنهایی، یک شکاف علمی قابل توجه در خصوص بررسی اثرات هم افزای^{۱۱} ترکیب تمرین هوازی + مصرف عصاره مریم گلی بر شاخص های التهابی و عملکرد حرکتی-اکتشافی در بیماری آلزایمر وجود دارد. مطالعات پیشین هرچند به بررسی اثرات مجزای ورزش یا عصاره مریم گلی پرداخته اند، اما تعداد پژوهش هایی که به طور همزمان به بررسی اثر تعاملی این دو مداخله بر تعدیل التهاب عصبی، به ویژه TNF- α و ارتباط آن با شاخص های رفتاری پرداخته باشند، بسیار اندک است. این خلأ، ضرورت انجام پژوهش های ترکیبی را برای دستیابی به رویکردهای درمانی غیرتهاجمی، کم هزینه و در دسترس برای کاهش بار بیماری آلزایمر بیش از پیش آشکار می سازد. از این رو، هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر همزمان تمرین هوازی و عصاره اتانولی مریم گلی بر عملکرد حرکتی-اکتشافی و بیان ژن TNF- α در موش های صحرایی آلزایمری شده با تری متیل تین^{۱۲} است.

روش تحقیق

طرز تهیه و نگهداری حیوانات: نمونه آماری پژوهش حاضر را ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار^{۱۳} با محدوده سنی ۸-۱۰ ماه و وزن تقریبی ۲۷۰-۳۰۰ گرم تشکیل دادند که از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. کلیه حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی از نظر نور (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد) و رطوبت

¹ Salvia officinalis

² Lamiaceae family

³ Monoterpenes

⁴ Polyphenols

⁵ 1,8-cineole (Eucalyptol)

⁶ Rosmarinic acid

⁷ Acetylcholinesterase

⁸ Acetylcholine

⁹ Inhibition of inflammatory pathways

¹⁰ Nuclear Factor kappa B

¹¹ Synergistic effect

¹² Trimethyltin

¹³ Rattus norvegicus



نسبی (۵۵-۶۰ درصد) نگهداری شدند. دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد مخصوص موش‌های صحرایی (جوندگان) فراهم بود و حیوانات در قفس‌های پلی‌کربنات قابل شست‌وشو (با ابعاد ۴۰×۳۰×۲۰ سانتی‌متر) نگهداری شدند. برای جذب رطوبت و ادرار در کف قفس‌ها از خاک اره چوبی استریل استفاده گردید. تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس معاهده هلسینکی و تحت نظارت کمیته اخلاق پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه اصفهان با کد مصوب IR.UI.REC.1404.211 انجام شد. موش‌ها پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، به‌طور تصادفی در گروه‌های آزمایشی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل: (۱) بیمار TMT، (۲) Sham (حلال مریم گلی)، (۳) عصاره مریم گلی TMT+S، (۴) تمرین هوازی TMT+AT و (۵) تمرین هوازی + عصاره مریم گلی TMT+AT+S تقسیم شدند. همچنین ۸ سر موش صحرایی سالم جهت بررسی اثر القا بیماری بر متغیرها در گروه کنترل سالم (HC) در نظر گرفته شدند. کلیه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده سنی ۸-۱۰ ماه و وزن ۲۷۰-۳۰۰ گرم که فاقد هر گونه ناهنجاری ظاهری، عفونت یا بیماری بودند، وارد مطالعه شدند. موش‌هایی که در طول دوره پژوهش دچار کاهش وزن بیش از ۲۰٪ وزن اولیه شوند، موش‌هایی که در حین پروتکل تمرینی دچار آسیب فیزیکی (شکستگی، زخم عمیق، یا لنگش شدید) گردند. موش‌هایی که پس از القای TMT، علائم تاییدکننده آلزایمر (پرخاشگری، پیچ‌وتاب دمی، تشنج و خونریزی اطراف چشم) را نشان دهند معیارهای خروج از مطالعه هستند (۱۶، ۱۷).

میزان تلفات نمونه‌ها و جایگزینی: در طول دوره ۸ هفته‌ای تحقیق، ۲ سر موش صحرایی از گروه تمرین هوازی به‌دلیل آسیب جزئی در ناحیه پنجه (لنگش) از مطالعه خارج شدند و با ۲ سر موش جدید که تحت همان شرایط قرار گرفته بودند، جایگزین گردیدند. همچنین ۱ سر موش از گروه کنترل بیمار به‌دلیل کاهش وزن بیش از ۲۰٪ حذف و با موش جایگزین شد. بنابراین، در پایان مطالعه، تعداد نهایی هر گروه ۸ سر بود ($48 = 6 \times 8$).

نحوه القای بیماری آلزایمر و تأیید آن: برای القای بیماری آلزایمر، در آزمایشگاه آموزش عالی پیش‌تازان شیراز ۴۰ سر موش صحرایی (از مجموع ۴۸ سر) تحت القای بیماری قرار گرفتند. بدین منظور، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، تزریق درون‌صفافی^۱ (TMT) با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ساخت شرکت سیگما الدریج^۲، کد محصول (T50208)، ایالات متحده آمریکا انجام شد. انتخاب این دوز و روش القا بر اساس مطالعه معتبر سلیمانی و همکاران (۲۰۲۲) صورت گرفت که نشان داد تزریق تک دوز TMT با دوز مذکور، تخریب انتخابی نورون‌های هرمی ناحیه CA1 و CA3 هیپوکامپ و ایجاد نقایص شناختی و رفتاری قلیل‌توجهی را در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به همراه دارد (۱۵).

۱۴ روز پس از تزریق TMT، جهت تأیید القای بیماری، علائم بالینی شامل پرخاشگری، پیچ‌وتاب‌های دمی^۳، تشنج‌های کلونیک خفیف و خونریزی اطراف چشم^۴ مورد بررسی قرار گرفت. این علائم به‌عنوان نشانه‌های رفتاری و بالینی معتبر برای تأیید مدل آلزایمر القا شده با TMT در مطالعات پیشین گزارش شده‌اند (۱۶، ۱۷). موش‌هایی که علائم مذکور را نشان ندادند، از مطالعه حذف شدند، ۲ سر موش که علائم کافی نداشتند، جایگزین شدند؛ در مجموع ۴۰ سر موش با علائم تأیید شده وارد مطالعه شدند (تأیید

¹ Intraperitoneal Injection

² Sigma-Aldrich

³ tail twisting

⁴ periorbital hemorrhage



نهایی القای بیماری با مشاهده کاهش معنی دار در شاخص های رفتاری کاهش مسافت طی شده و زمان سپری شده در مرکز میدان (باز) و افزایش معنی دار $TNF-\alpha$ در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم انجام شد که در بخش نتایج ارائه گردیده است.

طراحی گروه های آزمایشی و حجم نمونه: پس از تأیید القای بیماری، ۴۰ سر موش صحرایی مبتلا به صورت تصادفی با استفاده از نرم افزار تخصیص تصادفی^۱ نسخه ۲.۰، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به پنج گروه ۸ تایی (هر گروه ۸ = ۴۰ سر) تقسیم شدند. علاوه بر این، ۸ سر موش صحرایی سالم بدون تزریق TMT نیز به عنوان **گروه کنترل سالم** برای بررسی اثر القای بیماری در نظر گرفته شدند. بنابراین، تعداد کل گروه ها ۶ گروه و حجم نمونه کل ۴۸ سر بود (۵ گروه بیمار $\times$ ۸ = ۴۰ سر + ۱ گروه سالم $\times$ ۸ = ۸ سر). گروه های آزمایشی شامل: گروه کنترل سالم شامل ۸ سر موش صحرایی بود که بدون القای بیماری و بدون هیچ گونه مداخله ای نگهداری شدند. گروه کنترل بیمار (AD) نیز شامل ۸ سر موش بود که بیماری آلزایمر با تزریق تری متیل تین کلراید در آنها القا شد. گروه شم (Sham) با ۸ سر موش، شامل القای آلزایمر به همراه دریافت حلال عصاره (نرمال سالین) به صورت درون صفاقی و بدون مداخله تمرینی بود. گروه مریم گلی (Salvia) با ۸ سر موش، القای آلزایمر به همراه دریافت عصاره لتانولی مریم گلی با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و به مدت ۷ روز در هفته را دریافت کردند. گروه تمرین هوازی (Exercise) شامل ۸ سر موش بود که القای آلزایمر به همراه انجام تمرین هوازی به مدت ۸ هفته و ۳ جلسه در هفته در آنها اعمال شد. در نهایت، گروه تمرین + عصاره مریم گلی (Exercise + Salvia) با ۸ سر موش، شامل القای آلزایمر به همراه تمرین هوازی و دریافت عصاره مریم گلی بود.

ارزیابی حداکثر سرعت دویدن (آشنایی با نوارگردان): برای تعیین شدت تمرین و آشنایی موش ها با دستگاه نوارگردان^۲، ساخت شرکت برج صنعت^۳ (مدل TS ۱۰-، ایران)، یک هفته آشنایی اولیه در آزمایشگاه عالی پیشتازان شیراز انجام شد. موش ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶ متر بر دقیقه بر روی نوارگردان (بدون شیب) دویدند. سپس سرعت به صورت تدریجی و هر ۳ دقیقه، ۳ متر بر دقیقه افزایش یافت تا زمانی که حیوان به واماندگی برسد. واماندگی زمانی تعریف شد که موش در فاصله کمتر از یک دقیقه، سه بار متوالی به انتهای نوارگردان برخورد کرده و قادر به ادامه دویدن نباشد (۱۹).

نحوه اجرای پروتکل تمرین اصلی: پروتکل تمرین هوازی بر اساس مطالعه هاشمی و همکاران (۲۰۲۳) (۲۰) در آزمایشگاه عالی پیشتازان شیراز با اعمال تغییرات جزئی (ذکر دقیق شیب، استراحت و تحریک) اجرا شد. این پروتکل به مدت ۸ هفته و با فراوانی ۳ جلسه در هفته (یک روز در میان) انجام شد. تمامی جلسات تمرینی در زمان مشابه (بین ۹ تا ۱۱ صبح) و در شرایط محیطی یکسان (دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵-۶۰ درصد) انجام شد. دوره آشنایی یک هفته قبل از شروع تمرین اصلی انجام شد که طی آن موش ها روزانه ۸ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه و بدون شیب بر روی نوارگردان راه رفتند تا با دستگاه سازگار شوند. هر جلسه تمرین اصلی شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه و بدون شیب و ۵ دقیقه سرد کردن با همان سرعت و بدون شیب بود. تمامی جلسات تمرین اصلی با شیب صفر درجه (۰٪) انجام شد، مگر در هفته هشتم که شیب به ۵ درجه (حدود ۸٪) افزایش یافت تا شدت تمرین به صورت فیزیولوژیک افزایش یابد. جلسات تمرینی با فاصله حداقل ۲۴ ساعت (یک روز در میان) برگزار شد تا زمان کافی برای ریکاوری فراهم گردد. در مواردی که موش از دویدن بازمی ایستاد، با استفاده از تحریک ملایم با برس

¹ Random Allocation Software

² Treadmill

³ Borj Sanat



نرم و بدون ایجاد استرس یا آسیب، به ادامه حرکت تشویق می‌شد (۲۱). پروتکل اصلی به مدت ۸ هفته و ۳ جلسه در هفته اجرا شد و برنامه تمرینی به صورت افزایش تدریجی مدت و سرعت مطابق جدول زیر انجام گرفت.

جدول ۱ جزئیات پروتکل ۸ هفته‌ای تمرین هوازی روی نوارگردان

هفته	تعداد جلسه/هفته	مدت تمرین اصلی (دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)
۱	۳	۱۵	۱۰
۲	۳	۲۰	۱۲
۳	۳	۲۵	۱۴
۴	۳	۳۰	۱۶
۵	۳	۳۵	۱۸
۶	۳	۴۰	۲۰
۷	۳	۴۵	۲۲
۸	۳	۴۸	۲۴

۵. آماده‌سازی و مصرف عصاره اتانولی مریم‌گلی: ابتدا ۵۰۰ گرم گیاه مریم‌گلی با تأیید گیاه‌شناس از مراکز معتبر جهاد کشاورزی استان فارس (شیراز) تهیه شد. و در آزمایشگاه آموزش عالی پیش‌تازان شیراز گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی به پودر نرم تبدیل گردید و با یک لیتر اتانول ۹۸ درصد (حلال) مخلوط شد. مخلوط به مدت ۴ روز در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در ظرف دربسته و در محیط تاریک نگهداری شد و روزانه ۲ بار هم‌زده شد. در روز چهارم، بخش مایع با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱^۱ صاف شد و سپس به دستگاه تقطیر روتاری اواپراتور^۲ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و تحت خلأ منتقل شد تا حلال (اتانول) تبخیر و عصاره تغلیظ شده به دست آید. در نهایت، عصاره خشک‌شده بر روی روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به شکل پودر خشک تبدیل شود. پودر حاصل در نرمال سالین حل شد و دوز نهایی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره به صورت (IP) تجویز گردید (۲۲). برای تهیه دوز مورد نظر، ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک در ۶ سی‌سی نرمال سالین حل شد و حجم تزریق بر اساس وزن هر موش محاسبه گردید (به گونه‌ای که هر موش تقریباً ۰٫۶-۰٫۵ سی‌سی دریافت می‌کرد). گروه‌های دریافت‌کننده عصاره (گروه عصاره مریم‌گلی و گروه تمرین + عصاره مریم‌گلی) روزانه (۷ روز در هفته) به صورت (IP) تزریق شدند. زمان تزریق عصاره، بلافاصله پس از اتمام جلسه تمرین هوازی (در گروه ترکیبی) و در ساعت مشخص (بین ۱۰ تا ۱۱ صبح) برای کلیه گروه‌ها بود تا از ثبات شرایط آزمایشگاهی اطمینان حاصل شود. گروه شم نیز روزانه حجم مساوی از حلال (نرمال سالین) را به صورت تزریق درون صفاقی (IP) دریافت کردند.

۷. ارزیابی عملکرد حرکتی-اکتشافی با آزمون میدان باز^۳: برای ارزیابی عملکرد حرکتی-اکتشافی و رفتارهای شبه‌اضطرابی، در آزمایشگاه عالی پیش‌تازان شیراز، و از آزمون میدان باز استفاده شد (۲۳). دستگاه میدان باز یک محوطه مربع شکل با ابعاد

¹ Whatman No. 1

² Rotary Evaporator

³ Open Field Test



۱۰۰×۱۰۰×۴۰ سانتی متر (طول×عرض×ارتفاع) بود که کف آن با خط‌های فرضی به ۲۵ مربع مساوی (هر یک ۲۰×۲۰ سانتی متر) تقسیم شده بود. دیواره‌ها و کف دستگاه از جنس پلاستیک مشکی رنگ (غیربازتابنده) ساخته شده بود تا از ایجاد سایه و بازتاب نور جلوگیری شود.

زمان انجام آزمون: آزمون میدان باز ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هوازی و ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق عصاره (به منظور حذف اثرات حاد تمرین و تزریق) انجام شد. کلیه آزمون‌ها در شرایط نوری یکسان (نور کم حدود ۳۰ لوکس) و در زمان مشابه (بین ۱۰ تا ۱۲ ظهر) فیلم برداری شد.

روش اجرای آزمون میدان باز: هر موش به تنهایی در مرکز میدان قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه آزادانه به کاوش محیط پرداخت. بین هر موش، دستگاه با الکل ۷۰٪ تمیز و خشک می‌شد تا از انتقال بو و آثار موش قبلی جلوگیری گردد. در مطالعات پیشین، کاهش مسافت طی شده، کاهش زمان سپری شده در مرکز، کاهش تعداد ایستادن روی دو پا و افزایش تعداد دفع مدفوع، همگی به عنوان نشانه‌های افزایش رفتار شبه اضطرابی و کاهش عملکرد حرکتی-اکتشافی در مدل‌های حیوانی آلزایمر گزارش شده‌اند. (۲۳)

شاخص‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از (نرم افزار تحلیل حرکتی اتوویژن ایکس تی^۱ نسخه ۱۴، ساخت شرکت نولدوس^۲ هلند عبارت بودند از: شاخص نخست مسافت طی شده با واحد متر (m) است که معنای رفتاری آن فعالیت حرکتی کلی و رفتار اکتشافی در نظر گرفته می‌شود. شاخص دوم زمان سپری شده در مرکز با واحد ثانیه (s) است که بیانگر کاهش رفتار شبه اضطرابی و افزایش اکتشاف است. شاخص سوم تعداد ایستادن روی دو پا با واحد تعداد (n) است که نشان دهنده کنجکاوی و رفتار اکتشافی عمودی می‌باشد. شاخص چهارم تعداد دفع مدفوع با واحد تعداد (n) است که به عنوان شاخص فیزیولوژیک استرس و اضطراب در نظر گرفته می‌شود.

۸. نحوه اندازه‌گیری بیان ژن (TNF- α): به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات التهابی در سطح مولکولی، بیان ژن (TNF- α) در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی اندازه‌گیری شد. این روش به عنوان حساسترین و دقیق‌ترین رویکرد برای سنجش سطوح پایین رونوشت‌های سیتوکین‌ها و ارزیابی شبکه‌های سیتوکینی در نمونه‌های کوچک بافتی شناخته می‌شود (۲۵، ۲۶)

۹. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف معیار استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک^۳ برای مقایسه تفاوت بین گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌داری، برای تعیین محل دقیق تفاوت‌ها از آزمون تعقیبی توکی^۴ استفاده گردید. سطح معنی‌داری برای کلیه آزمون‌ها، ۰۰۰۵ در

¹ EthoVision XT

² Noldus

³ Shapiro-Wilk test

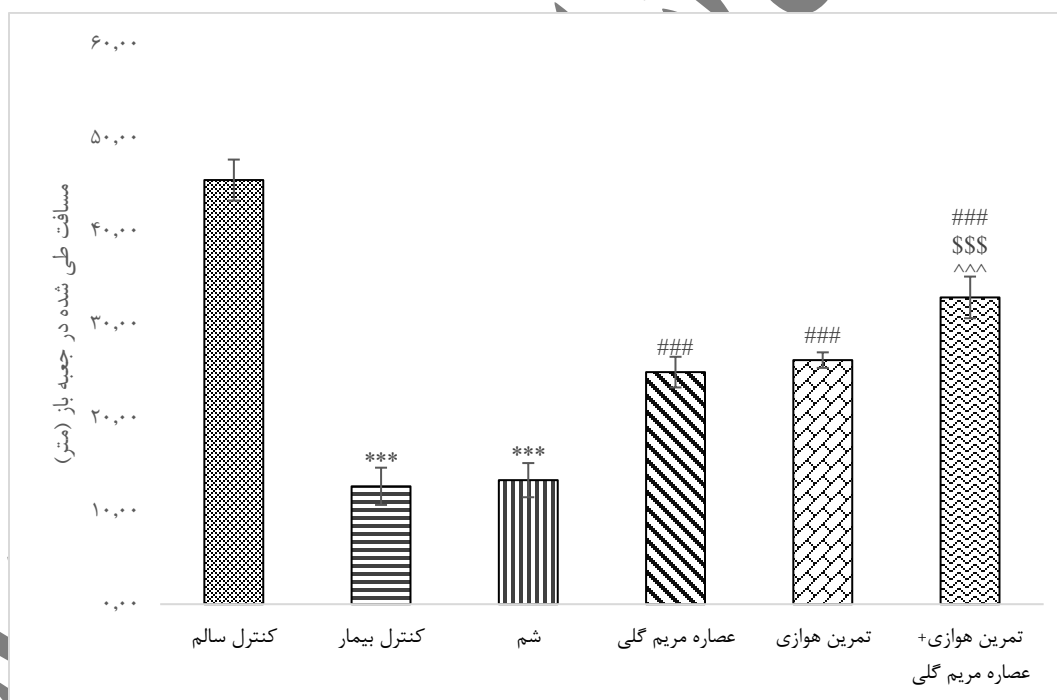
⁴ Tukey's post-hoc test



نظر گرفته شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار بسته آماری در علوم اجتماعی نسخه ۲۶^۱ (IBM Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد.

یافته‌ها

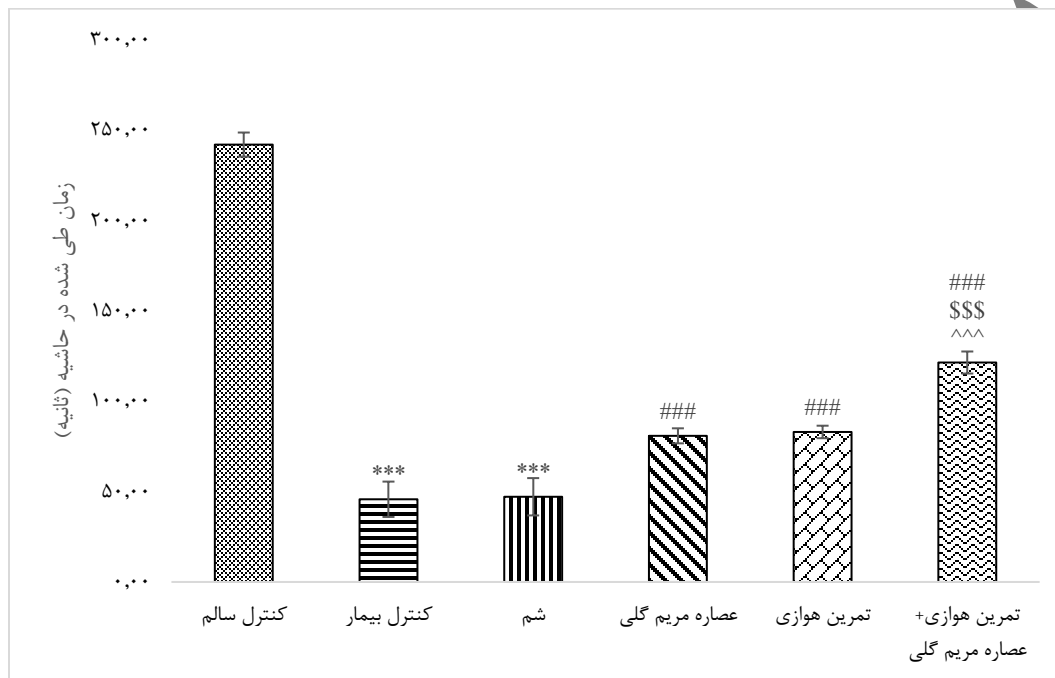
نحوه تحلیل عوامل شناختی: نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر مسافت طی شده ($p=0/001$ و $F_{(42,5)}=358/59$)، زمان سپری شده در مرکز ($p=0/001$ و $F_{(42,5)}=825/78$)، تعداد ایستادن روی پا ($p=0/001$ و $F_{(42,5)}=141/9$) و تعداد دفع مدفوع ($p=0/001$ و $F_{(42,5)}=50/79$) در گروه‌های مختلف وجود دارد. همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مسافت طی شده در آزمون اوپن فیلد در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل سالم بود ($p=0/001$). تفاوت معنی‌داری در گروه‌های کنترل بیمار و شم مشاهده نشد ($p=0/97$). اما در گروه‌های عصاره مریم‌گلی ($p=0/001$)، تمرین هوازی ($p=0/001$) و تمرین + عصاره مریم‌گلی ($p=0/001$) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بیمار بود. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تمرین هوازی و عصاره مریم‌گلی مشاهده نشد ($p=0/73$). اما در گروه تمرین + عصاره مریم‌گلی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های تمرین هوازی ($p=0/001$) و عصاره مریم‌گلی ($p=0/001$) بود (شکل ۱).



شکل ۱. مسافت طی شده در آزمون جعبه باز در گروه‌های مورد مطالعه بر اساس متر. *** نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ ### نشانه افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ \$\$\$ نشانه افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ ^^^ نشانه افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$.

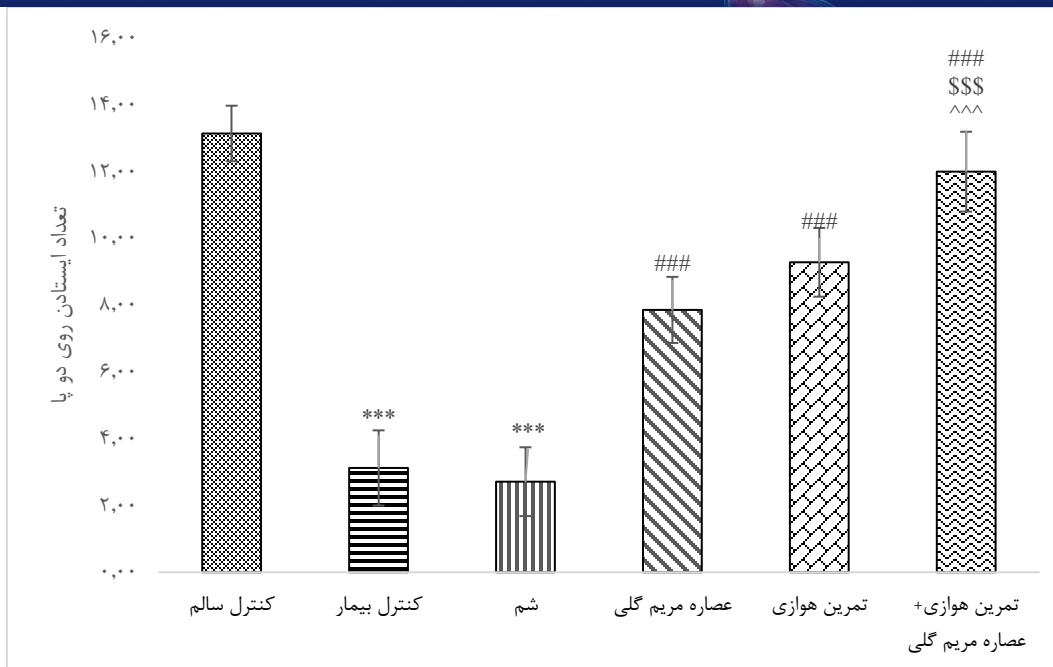


زمان سپری شده در مرکز در گروه کنترل بیمار به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل سالم بود ($p=0/001$). تفاوت معنی داری در گروه های کنترل بیمار و شم مشاهده نشد ($p=0/99$). اما در گروه های عصاره مریم گلی ($p=0/001$)، تمرین هوازی ($p=0/001$) و تمرین + عصاره مریم گلی ($p=0/001$) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بیمار بود. تفاوت معنی داری بین گروه های تمرین هوازی و عصاره مریم گلی مشاهده نشد ($p=0/99$). اما در گروه تمرین + عصاره مریم گلی به طور معنی داری بیشتر از گروه های تمرین هوازی ($p=0/001$) و عصاره مریم گلی ($p=0/001$) بود (نمودار ۲).



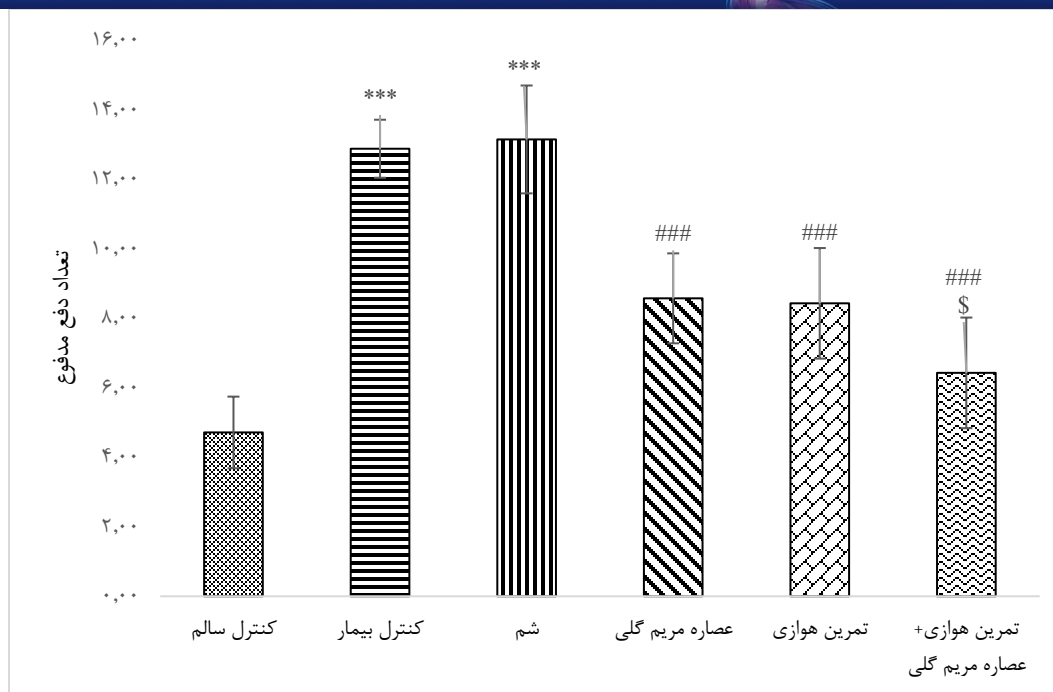
شکل ۲. مدت زمان سپری شده در مرکز در آزمون جعبه باز در گروه های مورد مطالعه. *** نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ ### نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ \$\$\$ نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$ ؛ ^^^ نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0/001$.

تعداد ایستادن روی دو پا در گروه کنترل بیمار به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل سالم بود ($p=0/001$). تفاوت معنی داری در گروه های کنترل بیمار و شم مشاهده نشد ($p=0/96$). اما در گروه های عصاره مریم گلی ($p=0/001$)، تمرین هوازی ($p=0/001$) و تمرین + عصاره مریم گلی ($p=0/001$) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بیمار بود. تفاوت معنی داری بین گروه های تمرین هوازی و عصاره مریم گلی مشاهده نشد ($p=0/08$). اما در گروه تمرین + مریم گلی به طور معنی داری بیشتر از گروه های تمرین هوازی ($p=0/001$) و عصاره مریم گلی ($p=0/001$) بود (شکل ۳).



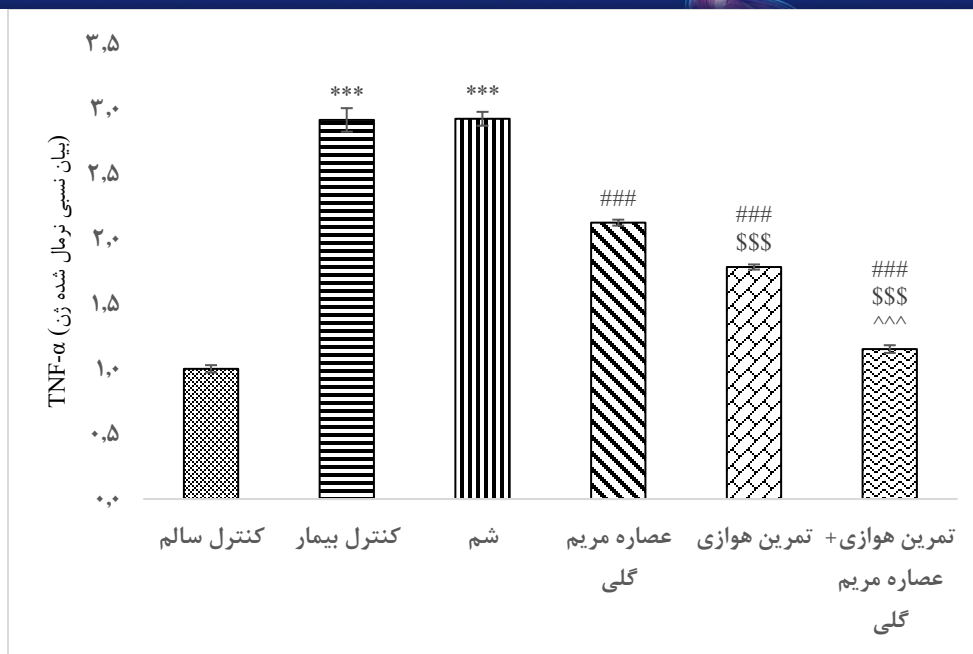
شکل ۳. تعداد ایستادن روی دو پا در آزمون جعبه باز در گروه‌های مورد مطالعه. *** نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0.001$ ؛ بیمار: \$\$\$ نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0.001$ ؛ عصاره مریم گلی: ^^^ نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0.001$ ؛ تمرین هوازی

تعداد دفع مدفوع در گروه کنترل بیمار به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل سالم بود ($P=0.001$). تفاوت معنی داری در گروه های کنترل بیمار و شم مشاهده نشد ($p=0.99$). اما در گروه های عصاره مریم گلی ($p=0.001$)، تمرین هوازی ($p=0.001$) و تمرین + عصاره مریم گلی ($p=0.001$) به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بیمار بود. تفاوت معنی داری بین گروه های تمرین هوازی و عصاره مریم گلی مشاهده نشد ($p=0.99$). اما در گروه تمرین + عصاره مریم گلی به طور معنی داری کمتر از گروه های عصاره مریم گلی بود ($p=0.03$). اما تفاوت معنی داری بین گروه های تمرین + عصاره مریم گلی و تمرین هوازی مشاهده نشد ($p=0.52$; شکل ۴).



شکل ۴. تعداد دفع مدفوع در آزمون جعبه باز در گروه‌های مورد مطالعه. * نشان افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0.01$ سالم؛ ### نشان کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $p \leq 0.05$ عصاره مریم گلی

تحلیل عامل التهابی: نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی نشان داد که بیان ژن $TNF-\alpha$ در بافت هیپوکامپ گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافته است ($p < 0.01$). در گروه‌های دریافت‌کننده S، AT و $TMT+AT+S$ ، بیان ژن $TNF-\alpha$ به طور معنی‌داری نسبت به گروه TMT کاهش یافت ($p < 0.01$). همچنین، کاهش بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه ترکیبی ($TMT+AT+S$) به طور معنی‌داری بیشتر از هر یک از گروه‌های AT و S به تنهایی بود ($p < 0.01$). این یافته‌ها با نتایج سنجش بیان ژن $TNF-\alpha$ همخوانی داشته و نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزای AT و S در تعدیل بیان ژن التهابی در سطح هیپوکامپ است. نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر $TNF-\alpha$ ($p = 0.01$) بین گروه‌های تحقیق وجود دارد. نتایج نشان داد مقادیر $TNF-\alpha$ در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل سالم ($p = 0.01$) بود. تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و شم مشاهده نشد ($p = 0.99$). اما در گروه‌های عصاره مریم‌گلی ($p = 0.01$)، تمرین هوازی ($p = 0.01$) و تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی ($p = 0.01$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بیمار بود. همچنین در گروه‌های تمرین هوازی ($p = 0.01$) و تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی ($p = 0.01$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه عصاره مریم‌گلی بود. علاوه بر این در گروه تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی به طور معنی‌داری کمتر از گروه تمرین هوازی بود ($p = 0.01$; شکل ۵).



شکل ۵. مقادیر TNF- α در گروه‌های مورد مطالعه. * نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P \leq 0.001$ سالم؛ ### نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P \leq 0.001$ بیمار؛ \$\$\$ نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P \leq 0.001$ عصاره مریم گلی

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی، مصرف عصاره آتانولی مریم گلی و ترکیب آن‌ها بر عملکرد حرکتی-اکتشافی و بیان ژن TNF- α در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به آلزایمر القاشده با تری‌متیل‌تین انجام شد. یافته‌ها نشان داد که القای بیماری آلزایمر با تری‌متیل‌تین کلراید موجب اختلال در عملکرد حرکتی-اکتشافی و افزایش بیان ژن TNF- α در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم گردید. هر دو مداخله تمرین هوازی و عصاره مریم گلی به‌تنهایی باعث بهبود شاخص‌های رفتاری و کاهش بیان ژن TNF- α در مقایسه با گروه کنترل بیمار شدند. باین‌حال، اثر ترکیبی این دو مداخله به‌طور مؤثرتری از هر یک از آن‌ها به‌تنهایی عمل کرد و بیشترین کاهش در بیان ژن TNF- α در گروه تمرین هوازی همراه با عصاره مریم گلی مشاهده شد. در ادامه، به تفسیر مکانیسم‌های احتمالی این یافته‌ها در چهار بخش مجزا پرداخته می‌شود.

در مطالعه حاضر، موش‌های گروه کنترل بیمار (دریافت‌کننده تری‌متیل‌تین (TMT) کاهش معنی‌داری در مسافت طی‌شده (کاهش ۴۲٪ نسبت به کنترل سالم)، زمان سپری‌شده در مرکز (کاهش ۵۸٪)، تعداد ایستادن روی دو پا (کاهش ۴۵٪) و افزایش معنی‌داری در تعداد دفع مدفوع (افزایش ۲۲۰٪) و بیان ژن TNF- α در هیپوکامپ (افزایش ۳/۸) برابر نسبت به کنترل سالم نشان دادند. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین که نشان داده‌اند تزریق تک دوز TMT از طریق تخریب انتخابی نورون‌های هرمی ناحیه CA1 و CA3 هیپوکامپ، باعث ایجاد نقایص شناختی و رفتاری قابل‌توجهی در موش‌های صحرایی می‌شود، همخوانی دارد (۲۷، ۲۸). تری‌متیل‌تین



(TMT) به عنوان یک عامل نوروتوکسین، با ایجاد استرس اکسیداتیو، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعال‌سازی آبشارهای التهابی، منجر به افزایش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی نظیر $TNF-\alpha$ می‌شود (۲۹). افزایش سطح $TNF-\alpha$ در هیپوکامپ می‌تواند از طریق اختلال در پلاستیسیته سیناپسی و کاهش زایش نرونی، به افت عملکرد حرکتی-اکتشافی و افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی منجر شود (۳۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار مسافت طی شده (افزایش ۳۵٪، زمان سپری‌شده در مرکز (افزایش ۴۸٪)، تعداد ایستادن روی دو پا (افزایش ۴۰٪) و کاهش معنی‌دار تعداد دفع مدفوع (کاهش ۵۲٪) و بیان ژن $TNF-\alpha$ در هیپوکامپ (کاهش ۴۱٪) نسبت به گروه کنترل بیمار گردید ($p < 0.001$). این یافته‌ها با مطالعات پیشین همسو است. در مطالعه شی و همکاران (۲۰۲۳)، گزارش شد که تمرین هوازی با بهبود حافظه فضایی و کاهش استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مدل حیوانی آلزایمر همراه است (۳۱). پهلوانی (۲۰۲۳) نیز گزارش کرد که تمرین هوازی از طریق کاهش التهاب عصبی و بهبود عملکرد سیناپسی، به کاهش اختلالات رفتاری در مدل‌های حیوانی آلزایمر کمک می‌کند (۳۲). سازکارهای اصلی تأثیر تمرین هوازی بر کاهش بیان $TNF-\alpha$ فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا $TNF-\alpha$ و بهبود عملکرد حرکتی-اکتشافی عبارت‌اند از: (۱) افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک نظیر BDNF که نقش کلیدی در زایش نرونی هیپوکامپی و بقای نورون‌ها ایفا می‌کنند (۳۳)؛ (۲) کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی درون‌سلولی (۳۴)؛ (۳) مهار مسیر پیام دهی NF-KB و در نتیجه کاهش رونویسی ژن $TNF-\alpha$ (۳۵)؛ و (۴) بهبود جریان خون مغزی و افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت هیپوکامپ (۳۶). با این حال، برخی مطالعات مانند مطالعه کابوچینیس و ماتسون (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که اگرچه تمرین موجب بهبود برخی شاخص‌های متابولیک می‌گردد، اما تأثیر معنی‌داری بر تمامی جنبه‌های شناختی ندارد که این اختلافات احتمالاً ناشی از تفاوت در شدت، مدت و نوع تمرین، مرحله پیشرفت بیماری و گونه حیوانی است (۳۷).

در گروه دریافت‌کننده عصاره مریم‌گلی نیز بهبود معنی‌داری در شاخص‌های رفتاری و کاهش بیان ژن $TNF-\alpha$ مشاهده شد؛ به‌گونه‌ای که مسافت طی‌شده (افزایش ۳۲٪، زمان سپری‌شده در مرکز (افزایش ۴۵٪)، تعداد ایستادن روی دو پا (افزایش ۳۸٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر و تعداد دفع مدفوع (کاهش ۴۸٪) و بیان ژن $TNF-\alpha$ (کاهش ۳۲٪) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بیمار بود ($p < 0.001$). این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین همسو است. در مطالعه لیو و همکاران (۲۰۲۴)، گزارش شد که تانشینون IA^{3} مشتق از گونه مریم‌گلی قرمز چینی^۴ موجب کاهش تجمع آمیلوئید-بتا، بهبود مسیرهای نورونی و ارتقای عملکرد شناختی در مدل موش‌های پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید / پره‌سنیلین-۱^۵ (APP/PS1) می‌شود (۳۸). همچنین، وانگ و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که اسید سالویانولیک B^۶ به‌عنوان یکی از ترکیبات فعال مریم‌گلی، توانست در مدل‌های حیوانی آلزایمر باعث کاهش پاتولوژی آمیلوئیدی و بهبود عملکرد نورونی گردد (۳۹). وحید و همکاران (۲۰۲۲) نیز در یک مدل القا شده اختلال شناختی در موش‌ها نشان

¹ Shi et al., 2023

² Kapogiannis and Mattson

³ Tanshinone IIA

⁴ Salvia miltiorrhiza

⁵ Amyloid Precursor Protein / Presenilin-1

⁶ Salvianolic Acids



دادند که تجویز مریم‌گلی هیمالیایی¹ به طور معنی‌داری موجب بهبود عملکرد حافظه و رفتارهای شناختی در آزمون‌های رفتاری می‌شود (۴۰). سازکارهای ضدالتهابی مریم‌گلی عمدتاً از طریق ترکیبات فعالی مانند تانشتینون‌ها و اسیدهای سالویانولیک اعمال می‌شود که با مهار تجمع آمیلوئید-بتا، کاهش استرس اکسیداتیو، مهار مسیر التهابی NF-Kb و در نتیجه کاهش رونویسی ژن TNF- α نقش مهمی در کاهش التهاب عصبی ایفا می‌کنند (۳۸، ۳۹). همچنین، بهبود عملکرد سیناپسی، تنظیم مسیرهای آپوپتوز و افزایش فاکتورهای نوروتروفیک از دیگر سازکارهای گزارش شده برای این گیاه هستند که در نهایت به بهبود حافظه و عملکرد شناختی منجر می‌شوند (۴۰).

در مطالعه حاضر، به منظور ارزیابی دقیق‌تر تغییرات التهابی ناشی از بیماری آلزایمر و مداخلات تمرینی و دارویی، بیان ژن TNF- α در بافت هیپوکامپ و با استفاده از روش حساس Real-Time PCR سنجیده شد. انتخاب بافت هیپوکامپ به این دلیل است که این ناحیه از مغز، به عنوان مرکز اصلی حافظه و یادگیری، در بیماری آلزایمر دچار آسیب جدی می‌شود و تجمع پروتئین آمیلوئید-بتا و التهاب عصبی در آن، نقش کلیدی در زوال شناختی دارد. از سوی دیگر، استفاده از روش Real-Time PCR به جای سنجش پروتئین در سرم، امکان ارزیابی دقیق‌تر بیان ژن و تغییرات مولکولی در سطح بافت هدف را فراهم می‌آورد. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که سنجش mRNA سایتوکین‌های پیش‌التهابی در بافت هیپوکامپ، شاخص معتبر و حساس برای بررسی التهاب عصبی در مدل‌های حیوانی آلزایمر است. برای مثال، شنوی و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی، با استفاده از Real-Time PCR نشان دادند که تمرین هوازی می‌تواند بیان mRNA سایتوکین‌های پیش‌التهابی از جمله TNF- α را در بافت هیپوکامپ کاهش دهد و این کاهش با بهبود عملکرد شناختی همراه است [۴۱]. بنابراین، رویکرد ما در این مطالعه، با در نظر گرفتن بافت هدف هیپوکامپ و روش مولکولی دقیق Real-Time PCR، امکان بررسی مستقیم‌تر اثرات مداخلات بر التهاب عصبی مرکزی را فراهم می‌کند.

مهم‌ترین یافته مطالعه حاضر، اثر هم‌افزای قابل توجه ترکیب تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی بر بهبود شاخص‌های رفتاری و کاهش بیان ژن TNF- α بود. در گروه ترکیبی (تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی)، مسافت طی شده (افزایش ۵۶٪)، زمان سپری شده در مرکز (افزایش ۷۲٪) و تعداد ایستادن روی دو پا (افزایش ۶۰٪) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بیمار بود و این مقادیر به طور معنی‌داری بیشتر از هر یک از گروه‌های تمرین هوازی و عصاره مریم‌گلی به تنهایی بود ($p < 0.001$). همچنین، بیان ژن TNF- α در گروه (تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های تمرین هوازی و عصاره مریم‌گلی به تنهایی کاهش یافت (به ترتیب ۵۸٪ و ۵۴٪) کاهش نسبت به گروه کنترل بیمار؛ ($p < 0.001$). تعداد دفع مدفوع در گروه (تمرین هوازی + عصاره مریم‌گلی) نیز به طور معنی‌داری کمتر از گروه عصاره مریم‌گلی به تنهایی بود ($p = 0.03$) این یافته‌ها نشان‌دهنده برتری آشکار رویکرد ترکیبی نسبت به مداخلات منفرد است.

محدودیت

پژوهش حاضر با وجود یافته‌های ارزشمند، دارای محدودیت‌هایی نیز بود. نخست، القای بیماری آلزایمر با تری‌متیل‌تین کلراید یک مدل شیمیایی است و ممکن است به طور کامل تمام جنبه‌های پاتوفیزیولوژیک بیماری آلزایمر انسانی، از جمله تجمع پلاک‌های

¹ Salvia moorcroftiana



آمیلوئیدی و کلاف‌های نوروفیبریلاری را بازتاب ندهد. دوم، اندازه‌گیری بیان ژن $TNF-\alpha$ تنها در سطح mRNA و در بافت هیپوکامپ انجام شد و سنجش سطح پروتئین یا بررسی سایر نواحی مغزی مانند قشر پیش‌پیشانی و آمیگدال انجام نشد. سوم، مدت مداخله (هشت هفته) و دوز ثابت عصاره مریم‌گلی (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود و اثر دوزهای مختلف یا مدت‌های طولانی‌تر بررسی نشد. چهارم، ارزیابی عملکرد حرکتی-اکتشافی تنها با آزمون میدان باز انجام شد و استفاده از آزمون‌های مکمل مانند ماز آبی موریس یا آزمون‌های حافظه کاری می‌توانست تصویر جامع‌تری از عملکرد شناختی ارائه دهد. پنجم، مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر انجام شد و نتایج ممکن است به جنس ماده یا انسان قابل تعمیم نباشد. با این حال، این محدودیت‌ها از اعتبار یافته‌های اصلی پژوهش نمی‌کاهد و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از مدل‌های ژنتیکی آلزایمر، سنجش سطح پروتئین $TNF-\alpha$ ، دوزهای مختلف عصاره و آزمون‌های رفتاری متعدد استفاده شود.

نتیجه‌گیری: ترکیب تمرین هوازی + مصرف عصاره مریم‌گلی، نسبت به هر یک از این دو مداخله به‌تنهایی، اثر هم‌افزایی چشمگیری در بهبود عملکرد حرکتی-اکتشافی و کاهش رفتارهای شبه‌اضطرابی از طریق تعدیل بیان ژن فاکتور ($TNF-\alpha$) در مدل حیوانی آلزایمر دارد و می‌تواند به‌عنوان یک راهکار غیردارویی مؤثر در پیشگیری و کندی پیشرفت این بیماری مد نظر قرار گیرد.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه اصفهان و همه افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- 1- Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. Lancet. 2021;397(10284):1577-90. DOI: [10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- 2- Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, Fukutaki K, Chalek J, Abd-Allah F, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet Public Health. 2022;7(2):e105-e25. DOI: [10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- 3- Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. Lancet. 2020;396(10248):413-46. DOI: [10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- 4- DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2019;14(1):32. DOI: [10.1186/s13024-019-0333-5](https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5)

- 5- Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease. *Molecules*. 2020;25(24):5789. DOI: [10.3390/molecules25245789](https://doi.org/10.3390/molecules25245789)
- 6- Sanders LMJ, Hortobágyi T, Karssemeijer EGA, van der Zee EA, Scherder EJA, van Heuvelen MJG. Effects of low- and high-intensity physical exercise on physical and cognitive function in older persons with dementia: a randomized controlled trial. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12:28. DOI: [10.1186/s13195-020-00597-3](https://doi.org/10.1186/s13195-020-00597-3)
- 7- Yu F, Vock DM, Zhang L, Salisbury D, Nelson NW, Chow LS, et al. Cognitive effects of aerobic exercise in Alzheimer's disease: A pilot randomized controlled trial. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(1):233-44. DOI: [10.3233/JAD-201100](https://doi.org/10.3233/JAD-201100)
- 8- Morris JK, Vidoni ED, Johnson DK, Van Sciver A, Mahnken JD, Honea RA, et al. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. *PLoS One*. 2017;12(2): e0170547. DOI: [10.1371/journal.pone.0170547](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170547)
- 9- Salehi O, Sheikholeslami-Vatani D, Hosseini SA. Positive effects of HIIT and vitamin E on cognitive function, angiogenesis and NRF2 antioxidant pathway in male rats with Alzheimer's disease. *Biogerontology*. 2025;26(4):129. DOI: [10.1007/s10522-025-10215-2](https://doi.org/10.1007/s10522-025-10215-2)
- 10- Ghasemi P, Gharakhanlu R, Mola Noroozi Shamsi M, Khodadadi D. (2021). The effect of four weeks of aerobic training on the gene expression of glial cell-derived neurotrophic factor, TNF- α , and cognitive factors in the hippocampi [https://spj.ssric.ac.ir/article_2990.html. In Persian]
- 11- Miroddi M, Navarra M, Quattropiani MC, Calapai F, Calapai G. Systematic review of clinical trials assessing Salvia species on memory and cognitive impairment. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20(6):485-95. DOI: [10.1111/cns.12270](https://doi.org/10.1111/cns.12270)
- 12- Kennedy DO, Pace S, Haskell CF, Okello EJ, Milne A, Scholey AB. Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood and cognition in healthy volunteers. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;99(4):494-501. DOI: [10.1016/j.pbb.2011.04.019](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.019)
- 13- Wahid F, Jan T, Al-Joufi FA, Ali Shah SW, Nisar M, Zahoor M. Amelioration of scopolamine-induced cognitive dysfunction in experimental mice using the medicinal plant *Salvia moorcroftiana*. *Brain Sci*. 2022;12(7):894. DOI: [10.3390/brainsci12070894](https://doi.org/10.3390/brainsci12070894)
- 14- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther*. 2003;28(1):53-9 DOI: [10.1046/j.1365-2710.2003.00463.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2003.00463.x)
- 15- Soleimani M, Kargarfard M, Salehi I, Sadeghi M. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration and cognitive deficits in male Wistar rats: time-course and dose-response study. *J Chem Neuroanat*. 2022;123:102120. doi: [10.1016/j.jchemneu.2022.102120](https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102120).
- 16- Ishida N, Akaike M, Saito H, Kato K. Behavioral and neurochemical changes in rats following trimethyltin administration. *Brain Res Bull*. 2020;159:1-10. doi: [10.1016/j.brainresbull.2020.03.001](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.001).
- 17- Sun Y, Zhao L, Zhang X, Li Y, Wang Q, Liu H. Neurological and behavioral outcomes after acute trimethyltin intoxication in rats. *Neurotoxicology*. 2021;84:67-76. doi: [10.1016/j.neuro.2021.03.004](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.03.004).

- 18- Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-6. doi: [10.4103/0976-500X.119726](https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726).
- 19- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats: a new protocol. *J Appl Physiol*. 2007;103(2):533-8. doi: [10.1152/jappphysiol.00070.2007](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00070.2007).
- 20- Hashemi SA, Ghadimi Z, Ghaedi H, Hashemi A. The effects of eight weeks of aerobic training with vitamin C on the expression pathway of antioxidants in the hippocampus tissue of TMT induced Alzheimer's disease rats. *Brain Res*. 2024;1822:148645. doi: [10.1016/j.brainres.2023.148645](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148645).
- 21- Tümer N, Demirel HA, Serdar Z, Kocabağcak E, Şahin S. Mild electrical stimulation and soft brushing as motivational tools for treadmill running in rodents: a comparative study. *Lab Anim*. 2022;56(2):156-64. doi: [10.1177/00236772211053264](https://doi.org/10.1177/00236772211053264).
- 22- Aurelian S, Ciobanu A, Cărare R, Stoica SI, Angheliescu A, Ciobanu V, et al. Topical cellular/tissue and molecular aspects regarding nonpharmacological interventions in Alzheimer's disease: a systematic review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(22):16533. doi: [10.3390/ijms242216533](https://doi.org/10.3390/ijms242216533).
- 23- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015;(96):52434. doi: [10.3791/52434](https://doi.org/10.3791/52434).
- 24- Zavvari F, Karimzadeh F. A review on the behavioral tests for learning and memory assessments in rat. *Shefaye Khatam*. 2017;5(4):110-124. doi: [10.18869/acadpub.shefa.5.4.110](https://doi.org/10.18869/acadpub.shefa.5.4.110).
- 25- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*. 2004;5:3. doi: [10.1186/1471-2172-5-3](https://doi.org/10.1186/1471-2172-5-3).
- 26- Badrikoohi M, Sadeghi M, Asadi S, Ghasemi R, Hosseini M, Ebrahimi MN. Simultaneous administration of bromodomain and histone deacetylase I inhibitors alleviates cognition deficit in Alzheimer's model of rats. *Brain Res Bull*. 2022;180:1-11. doi: [10.1016/j.brainresbull.2021.12.004](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.12.004).
- 27- Soleimani M, Kargarfard M, Salehi I, Sadeghi M. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration and cognitive deficits in male Wistar rats: time-course and dose-response study. *J Chem Neuroanat*. 2022;123:102120. doi: [10.1016/j.chemneu.2022.102120](https://doi.org/10.1016/j.chemneu.2022.102120).
- 28- Ishida N, Akaike M, Saito H, Kato K. Behavioral and neurochemical changes in rats following trimethyltin administration. *Brain Res Bull*. 2020;159:1-10. doi: [10.1016/j.brainresbull.2020.03.001](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.001).
- 29- Sun Y, Zhao L, Zhang X, Li Y, Wang Q, Liu H. Neurological and behavioral outcomes after acute trimethyltin intoxication in rats. *Neurotoxicology*. 2021;84:67-76. doi: [10.1016/j.neuro.2021.03.004](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.03.004).



- 30- Park MH, Park JH, Kim M, Song YS, Kim W, Lee J, et al. TNF- α /NF-KB signaling pathway mediates the neuroprotective effect of rosmarinic acid in an Alzheimer's disease model. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):147. doi: [10.1186/s12974-019-1537-2](https://doi.org/10.1186/s12974-019-1537-2).
- 31- Shi D, Hao Z, Qi W, Jiang F, Liu K, Shi X. Aerobic exercise combined with chlorogenic acid exerts neuroprotective effects and reverses cognitive decline in Alzheimer's disease model mice (APP/PS1) via the SIRT1/PGC-1 α /PPAR γ signaling pathway. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1269952. doi: [10.3389/fnagi.2023.1269952](https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1269952).
- 32- Pahlavani HA. Exercise therapy to prevent and treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1243869. doi: [10.3389/fnagi.2023.1243869](https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1243869).
- 33- Erickson KI, Hillman CH, Kramer AF. Physical activity, brain, and cognition. *Curr Opin Behav Sci*. 2015;4:27-32. doi: [10.1016/j.cobeha.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.01.005).
- 34- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int*. 2006;49(4):387-92. doi: [10.1016/j.neuint.2006.02.004](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.004).
- 35- Chen WQ, Viidik A, Skalicky M, Höger H, Lubec G. The effect of exercise on the expression of NF-KB and IKB in the hippocampus of rats. *Neurochem Int*. 2008;52(6):1113-8. doi: [10.1016/j.neuint.2007.12.001](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.12.001).
- 36- Voss MW, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T, Kramer AF. Exercise, brain, and cognition across the life span. *J Appl Physiol*. 2011;111(5):1505-13. doi: [10.1152/japplphysiol.00210.2011](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00210.2011).
- 37- Kapogiannis D, Mattson MP. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2011;10(2):187-98. doi: [10.1016/S1474-4422\(10\)70277-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70277-5).
- 38- Liu XQ, Hu T, Wu GL, Qiao LJ, Cai YF, Wang Q, Zhang SJ. Tanshinone IIA, the key compound in *Salvia miltiorrhiza*, improves cognitive impairment by upregulating A β -degrading enzymes in APP/PS1 mice. *Int J Biol Macromol*. 2024;254(Pt 3):127923. doi: [10.1016/j.jbiomac.2023.127923](https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2023.127923).
- 39- Wang MD, Zhang S, Liu XY, Wang PP, Zhu YF, Zhu JR, et al. Salvianolic acid B ameliorates retinal deficits in an early-stage Alzheimer's disease mouse model through downregulating BACE1 and A β generation. *Acta Pharmacol Sin*. 2023;44(11):2151-68. doi: [10.1038/s41401-023-01120-2](https://doi.org/10.1038/s41401-023-01120-2).
- 40- Wahid F, Jan T, Al-Joufi FA, Ali Shah SW, Nisar M, Zahoor M. Amelioration of scopolamine-induced cognitive dysfunction in experimental mice using the medicinal plant *Salvia moorcroftiana*. *Brain Sci*. 2022;12(7):894. doi: [10.3390/brainsci12070894](https://doi.org/10.3390/brainsci12070894).
- 41- Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D, et al. Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats. *J Inflamm (Lond)*. 2015;12:56. doi: [10.1186/s12950-015-0102-3](https://doi.org/10.1186/s12950-015-0102-3).