

The Effect of Alpha-pinene on Amyloid-beta-induced Neuronal Death and Depression in Male Wistar Rats

Khan-Mohammadi-Khorrami MK¹, Asle-Rousta M*¹, Rahnama M¹, Amini R²

1. Department of Physiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2. Department of Biology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +989125606327, Fax: +982433460463, Email: mrousta58@gmail.com

Received: May 24, 2021 Accepted: Aug 21, 2021

ABSTRACT

Background & objectives: The deposition of amyloid beta (A β) peptide in the brain is one of the most important features of Alzheimer's disease. In addition to memory loss, A β can lead to depression behavior. Alpha-pinene is a type of monoterpene that has antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects. Here, by using an animal model for Alzheimer's disease, we investigated the effect of alpha-pinene on neuronal cell death in the hippocampus and depression induced by A β ₁₋₄₂.

Methods: Male Wistar rats weighing 240-260 g were divided into four groups including control, alpha-pinene, A β , and A β -alpha-pinene. Rats were placed in stereotaxic surgery apparatus and A β ₁₋₄₂ was injected into the hippocampus (4 μ g per side) and alpha-pinene was treated intraperitoneally (50 mg/kg) for 14 consecutive days. At the end of the course, the level of depression was assessed using the forced swimming test. The animals' hippocampus was also examined microscopically after Nissl staining.

Results: Intra-hippocampal injection of A β ₁₋₄₂ increased the total immobility time in the forced swimming test ($p < 0.01$), decreased the number of pyramidal neurons in the CA1 area ($p < 0.001$), and reduced the thickness of the neuronal layer in this region of the hippocampus. Treatment with alpha-pinene largely prevented these changes.

Conclusion: It can be concluded that alpha-pinene decreased the beta-amyloid-induced depressive behavior in rats and inhibited the neuronal loss, suggesting that this neuroprotective compound may have a critical role in depression. Alpha-pinene is probably a suitable therapeutic strategy for repressing A β -induced neurodegeneration.

Keywords: Alpha-pinene; Depression; Hippocampus; Neuronal Death; Amyloid Beta

بررسی اثر آلفاپینن بر مرگ نورونی و افسردگی القا شده توسط پپتید آمیلوئید بتا در رت‌های نر نژاد ویستار

محمد کاظم خانمحمدی خرمی^۱، معصومه اصل‌روستا^{۱*}، مهدی رهنما^۱، رحیم امینی^۲

۱. گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۲۵۶۰۶۳۲۷، فاکس: ۰۲۴۳۳۴۶۰۴۶۳، پست الکترونیک: mrousta58@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: رسوب پپتید آمیلوئید بتا در مغز از مهم‌ترین شاخصه‌های بیماری آلزایمر است. آمیلوئید بتا علاوه بر نقص حافظه، افسردگی را نیز به دنبال دارد. آلفاپینن نوعی مونوترپن است که اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کنندگی عصبی دارد. در این تحقیق اثر آلفاپینن بر مرگ نورونی در هیپوکامپ و افسردگی ناشی از مدل آلزایمری القا شده توسط آمیلوئید بتا بررسی شد.

روش کار: رت‌های نر نژاد ویستار به وزن ۲۶۰-۲۴۰ گرم به چهار گروه شامل کنترل، آلفاپینن، آمیلوئید بتا و آمیلوئید بتا-آلفاپینن تقسیم شدند. آمیلوئید بتا طی جراحی استریوتاکسی به صورت درون‌هیپوکامپی تزریق شد (هر طرف ۱۱g) و آلفاپینن نیز به مدت ۱۴ روز متوالی به صورت درون‌صفاقی تیمار شد (۵۰ mg/kg). در پایان این دوره، سطح افسردگی با استفاده از تست شنای اجباری مورد بررسی قرار گرفت. هیپوکامپ حیوانات نیز پس از رنگ‌آمیزی نیسل مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت.

یافته‌ها: تزریق درون‌هیپوکامپی آمیلوئید بتا به افزایش مجموع زمان بی‌حرکتی در تست شنای اجباری منجر شد ($p < 0.01$)، تعداد نورون‌های پیرامیدال را در ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش داد ($p < 0.01$) و موجب کاهش ضخامت لایه نورونی در این منطقه از هیپوکامپ شد. آلفاپینن تا حد زیادی از بروز این تغییرات جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج مطالعه حاضر آلفاپینن رفتار افسردگی القا شده توسط آمیلوئید بتا را در رت‌ها کاهش می‌دهد و ممانعت از فقدان نورونی نقش مهمی در این اثر دارد. احتمالاً آلفاپینن گزینه مناسبی برای مهار تحلیل عصبی القا شده توسط آمیلوئید بتا است.

واژه‌های کلیدی: آلفاپینن، افسردگی، هیپوکامپ، مرگ نورونی، آمیلوئید بتا

دریافت: ۱۴۰۰/۳/۴ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۰

مقدمه

آلزایمر نوعی بیماری نورودژنراتیو است که مهم‌ترین علت فراموشی در سالمندان محسوب می‌شود. تجمع و رسوب پپتید آمیلوئید بتا ($A\beta$) در فضای بین سلولی نورون‌ها از شاخصه‌های ابتلاء به این بیماری است. $A\beta$ که بر اثر فعالیت آنزیم‌های بتا و گاما

سکرتاز ایجاد می‌شود انواع مختلفی دارد و سمیت $A\beta_{1-42}$ بیشتر از انواع دیگر است [۱، ۲]. $A\beta$ رابطه نزدیکی با تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در مغز (و بخصوص در هیپوکامپ) دارد و با تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی مغز باعث پیدایش استرس اکسیداتیو می‌شود [۳]. به علاوه $A\beta$ با تحریک فعالیت میکروگلیا

زمینه‌ساز پیدایش التهاب عصبی شده و در نهایت به مرگ نورونی منجر می‌شود. مرگ گسترده نورونی در نواحی مختلف مغز بخصوص در هیپوکامپ، در طولانی مدت به کاهش حجم این بخش از مغز منتهی می‌شود [۴،۵]. استرس اکسیداتیو، التهاب عصبی و کاهش نورونی رفتار افسردگی را به دنبال دارد [۶]. ثابت شده که رابطه نزدیکی بین الیگومرهای $A\beta$ و پیدایش رفتارهای شبه افسردگی در رت‌ها وجود دارد [۷] و ارتباط مستقیم بین رسوب $A\beta$ با شدت علائم افسردگی در انسان نیز به اثبات رسیده است [۸].

امروزه ترپنوئیدها به دلیل دارا بودن خواص ضدآلزایمری مورد توجه قرار دارند [۹]. آلفاپینن نوعی مونوترپن آلی دو حلقه‌ای ($C_{10}H_{16}$) (با نام علمی 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene) است که به فراوانی در گیاهان مخروطی به ویژه در کاج و گیاهانی نظیر رزماری و لیموعمانی یافت می‌شود [۱۰]. مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده است که آلفاپینن خواص آنتی‌اکسیدانی [۱۱]، ضدالتهابی [۱۲]، ضدآپوپتوتیک و محافظت‌کنندگی عصبی [۱۳،۱۴] دارد. علاوه بر این، آلفاپینن بر سطح برخی نوروترنس‌میترها در مغز اثر گذاشته و با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در مغز، اختلالات رفتاری در رت‌های مدل ایسکمی را نیز کاهش می‌دهد [۱۱،۱۳]. بنابراین این فرضیه به وجود آمد که ممکن است آلفاپینن با مهار مرگ نورونی القا شده توسط $A\beta$ نیز بتواند اختلالات رفتاری ناشی از آن (نظیر افسردگی) را کاهش دهد. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آلفاپینن بر مرگ نورونی در هیپوکامپ و رفتار افسردگی القاشده توسط $A\beta_{1-42}$ در رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد.

روش کار

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار به وزن ۲۶۰-۲۴۰ گرم استفاده شد. رت‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاه و بر طبق اصول اخلاقی

کار با حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی با کد اخلاق IR.IAU.ABHAR.REC.1399.009 تایید شد. رت‌ها به ۴ گروه شامل (۱ کنترل، ۲ آلفاپینن، ۳ آمیلوئیدبتا ($A\beta$) و ۴ آمیلوئیدبتا-آلفاپینن تقسیم شدند.

حیوانات گروه‌های ۳ و ۴ طی جراحی استریوتاکسی، $A\beta_{1-42}$ را به صورت درون هیپوکامپی دریافت نمودند. ابتدا حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کلرال هیدرات (80 mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس قرار داده شدند.

محل تزریق توسط اطلس مغز رت با مختصات $AP:-3.84\text{mm}$, $L:\pm 2.2\text{mm}$, and $V:2.5\text{mm}$ تعیین شده [۱۵] و تزریق $A\beta_{1-42}$ توسط سرنگ همپلتون در این محل انجام گرفت (هر طرف $4 \mu\text{g}$).

گروه کنترل طی جراحی استریوتاکسی حلال $A\beta_{1-42}$ (فسفات بافر سالین) را با همان حجم تزریقی برای $A\beta$ به صورت درون هیپوکامپی دریافت نمود ($2 \mu\text{l}$) و تحت تیمار دیگری قرار نگرفت. گروه‌های ۲ و ۴ نیز به مدت ۱۴ روز متوالی آلفاپینن (50 mg/kg) را به صورت درون صفاقی (به حجم 0.5 ml) دریافت نمودند [۱۴]. تزریق آلفاپینن در گروه ۴ یک روز پس از تزریق $A\beta_{1-42}$ شروع شد.

در پایان این دوره ۱۴ روزه، افسردگی حیوانات توسط تست شنای اجباری بررسی شد. این آزمون با کمک یک استوانه به ارتفاع ۴۵ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر که تا ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری حاوی آب (به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) بود انجام گرفت. آزمون ۶ دقیقه طول کشید. رت در داخل آب رها شد و دو دقیقه ابتدایی به تطابق پیدا کردن حیوان با شرایط موجود اختصاص داده شده و هیچ فاکتوری ثبت نشد. رفتار حیوان در چهار دقیقه پایانی مورد بررسی قرار گرفت به طوری که اولین زمان بی‌حرکت شدن (بر حسب ثانیه) و مجموع زمان‌های بی‌حرکتی (بر حسب ثانیه) در این محدوده زمانی ثبت شد. کاهش اولین

زمان بی‌حرکتی و افزایش مجموع بی‌حرکتی به معنی افزایش سطح افسردگی در حیوان است [۱۶]. پس از آزمون رفتاری، حیوانات با استنشاق دی‌اکسید کربن بیهوش شده و سر آنها به سرعت توسط گیوتین جدا شد. نیمکره چپ ۵ رت برای مطالعه بافتی به فرمالین ده درصد منتقل شد. پس از یک هفته تثبیت در فرمالین، نمونه‌ها در درجات صعودی الکل و سپس در زایلول قرار گرفتند و در نهایت توسط پارافین قالب‌گیری شدند. سپس برش‌های ۶ میکرومتری از ناحیه هیپوکامپ (با کمک

اطلس مغز رت) توسط میکروتوم تهیه شد. برش‌گیری از ۲/۷ میلی‌متری پس از برگما آغاز شد و تا ۱ میلی‌متر پس از آن ادامه یافت. برش‌ها با استفاده از کریزل ویوله آبی رنگ‌آمیزی شدند (رنگ‌آمیزی نیسل) و سپس توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند [۱۷]. شمارش نورونی در نواحی مختلف هیپوکامپ انجام گرفت (در بزرگنمایی $\times 400$) و درصد مرگ نورونی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مرگ نورونی} = \frac{100 \times (\text{میانگین تعداد نورون‌ها در هر گروه} - \text{میانگین تعداد نورون در گروه کنترل})}{\text{میانگین تعداد نورون در گروه کنترل}}$$

شد ($p < 0.05$) (شکل ۱). گروه آلفاپین در هیچ یک از فاکتورهای مربوط به این آزمون تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت.

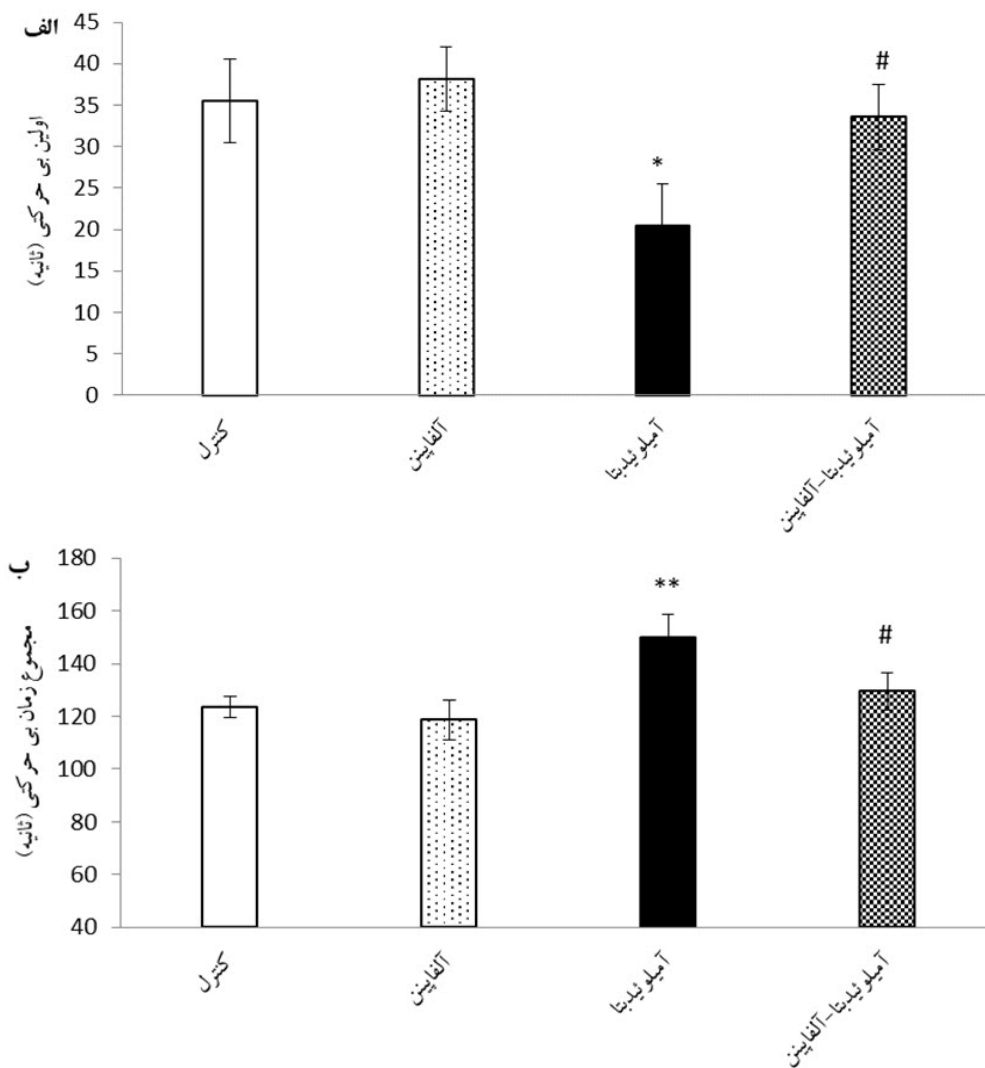
بررسی میکروسکوپی برش‌های هیپوکامپ نشان داد که تزریق $A\beta_{1-42}$ مرگ نورونی در ناحیه CA1 را به دنبال داشت و تعداد نورون‌های پیرامیدال در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری در این بخش کاهش یافت. آلفاپین توانست درصد فقدان نورونی را در رت‌های دریافت‌کننده $A\beta_{1-42}$ به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < 0.01$) (جدول ۱). همچنین بررسی میکروسکوپی برش‌ها حاکی از کاهش ضخامت لایه نورونی و از هم‌گسیختگی در برخی مناطق از CA1 در رت‌های گروه $A\beta$ بود و آلفاپین تا حد زیادی از آسیب ذکرشده ممانعت نمود. تصویری از ناحیه CA1 یک حیوان از هر گروه به طور نمونه در شکل ۲ نمایش داده شده است.

مطالعات آماری با استفاده از SPSS-18 انجام شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین ارائه شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آزمون آنووا یکطرفه^۱ و همچنین Tukey LSD post hoc انجام و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تست شنای اجباری نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی $A\beta_{1-42}$ به بروز رفتار شبه افسردگی در رت‌ها منجر شد. زمان اولین بی‌حرکتی در گروه $A\beta$ در مقایسه با کنترل کمتر بود ($p < 0.05$) و مجموع زمان بی‌حرکتی نیز بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). مصرف آلفاپین موجب افزایش اولین زمان بی‌حرکتی ($p < 0.05$) و کاهش معنی‌دار مجموع زمان‌های بی‌حرکتی در رت‌های دریافت‌کننده $A\beta_{1-42}$

¹ One Way ANOVA

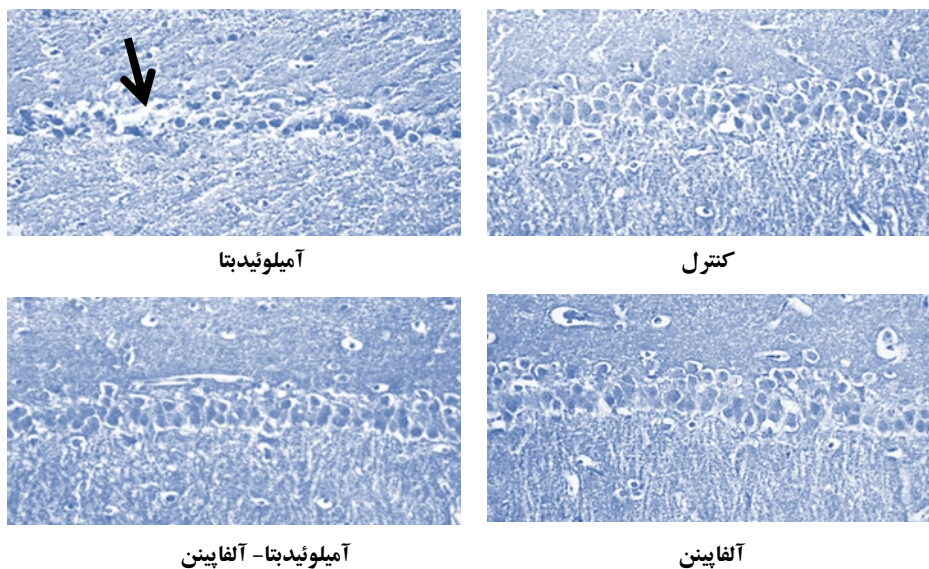


شکل ۱. اثر آلفاین بر افسردگی القا شده توسط پپتید آمیلوئید بتا که توسط تست شنای اجباری بررسی شد. الف) زمان اولین بی حرکتی (ثانیه) و ب) مجموع زمان بی حرکتی (ثانیه) محاسبه شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است و ۱۰ سر موش در هر گروه قرار داشت. $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** در مقایسه با کنترل و $p < 0.05$ # در مقایسه با گروه آمیلوئید بتا

جدول ۱. اثر آلفاین بر درصد مرگ نورونی ناشی از آمیلوئید بتا در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش های صحرایی

گروه	درصد مرگ نورونی در CA1
کنترل	۰
آلفاین	$1/36 \pm 0/21$
آمیلوئیدبتا	$34/98 \pm 3/78$ ***
آمیلوئیدبتا-آلفاین	$4/67 \pm 0/93$ ###

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است و ۵ سر موش در هر گروه قرار داشت. $p < 0.001$ *** در مقایسه با کنترل و $p < 0.001$ ### در مقایسه با گروه آمیلوئید بتا



شکل ۲. اثر آلفاپینن بر تخریب لایه نورون های پیرامیدال در ناحیه CA1 هیپوکامپ در رت های دریافت کننده $A\beta_{1-42}$. کاهش ضخامت و از هم گسیختگی لایه نورون های پیرامیدال و فقدان نورونی در برخی از مناطق لایه CA1 در این رت ها مشاهده می شود که با فلش مشخص شده است. آلفاپینن از بروز تخریب ناشی از $A\beta_{1-42}$ در این بخش از هیپوکامپ ممانعت نموده است (بزرگنمایی $\times 400$).

بحث

در این تحقیق، به دنبال تزریق درون هیپوکامپی $A\beta_{1-42}$ رفتارهای افسردگی در رت ها مشاهده شد. بررسی میکروسکوپی هیپوکامپ این حیوانات نشان داد که تعداد نورون های پیرامیدال در ناحیه CA1 کاهش یافته بود و لایه نورونی در برخی نواحی دچار فقدان نورونی و کاهش ضخامت شده بود. این نتایج با گزارش اصل روستا و همکاران (۱۸)، گرادیناریو^۱ و همکاران (۱۹) و چانگ^۲ و همکاران (۲۰) که با تزریق $A\beta$ موجب القای مرگ نورونی و پیدایش اختلالات رفتاری نظیر افسردگی در رت ها شدند همسو است. در ادامه، اثر آلفاپینن بر افسردگی و فقدان نورونی در هیپوکامپ رت های مدل آلزایمر با تزریق ۱۴ روزه این مونوترپن بررسی گردید.

نتایج حاصل از تست شنای اجباری نشان داد که آلفاپینن، رفتارهای شبه افسردگی را در رت هایی که تحت تزریق $A\beta_{1-42}$ قرار گرفتند کاهش داد. اثرات ضدافسردگی مونوترپن های دیگر از جمله لینالول

[۲۱]، لیمونن [۲۲] و سینئول [۲۳] نیز به اثبات رسیده است. کونگ^۳ و همکاران [۲۴] اعلام کردند که استنشاق اسانس Roman chamomile و آلفاپینن که ترکیب عمده موجود در آن است رفتارهای شبه افسردگی را در رت ها کاهش داد. آنها این نتایج را به اثرات آلفاپینن بر فعالیت میتوکندریایی و سیگنالینگ وابسته به پاروالبومین در هیپوکامپ نسبت دادند. $A\beta$ بیان گیرنده سروتونینی 5-HT_{1A} را در ناحیه آمیگدال مغز موش ها نیز کاهش می دهد و مهار ERK^5 ، با جلوگیری از بروز این تغییرات، از پیدایش افسردگی ناشی از $A\beta$ ممانعت می کند [۲۰]. بنابراین اندازه گیری سطح سروتونین و بیان و فعالیت ERK در مغز رت های آمیلوئیدبتا- آلفاپینن فرضیه ضدافسردگی بودن این ترکیب را تقویت می کند و در پژوهش های بعدی باید مورد بررسی قرار بگیرد. با توجه به این که استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی در مغز بخصوص در هیپوکامپ، نقش اساسی در بروز

³ Kong

⁴ 5-Hydroxytryptamine receptor 1A

⁵ Extracellular Signal-regulated Kinase

¹ Gradinariu

² Chang

نورونی را در ناحیه CA1 هیپوکامپ این حیوانات کاهش داد. ناحیه CA1 تغییرات فراوانی را در طول افسردگی متحمل می‌شود به طوری که کاهش حجم این ناحیه از هیپوکامپ به عنوان مهم‌ترین شاخص افسردگی محسوب می‌شود [۲۶]. بنابراین محافظت از نورون‌های این منطقه تا حد زیادی از پیشرفت افسردگی جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آلفاپین رفتارهای شبه افسردگی ناشی از پیتید بتا آمیلوئید را در رت‌ها کاهش می‌دهد و ممانعت از مرگ نورونی در ناحیه CA1 هیپوکامپ نقش مهمی در بروز این اثر دارد. احتمال دارد تغییر سطح سروتونین و سیگنالینگ ERK-MAPK در اثر ضدافسردگی آلفاپین نقش داشته باشد و انجام مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی برای تقویت این فرضیه لازم است. به نظر می‌رسد آلفاپین گزینه مناسبی برای پیشگیری و درمان نورودژنراسیون باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از بخشی از رساله دکتری نویسنده اول، مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان استخراج شده است. بدین وسیله از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان قدردانی می‌شود.

افسردگی دارد [۶] این قابلیت در نواحی مختلف مغز از جمله در کورتکس و هیپوکامپ را می‌توان دلیل دیگری برای بروز اثر ضدافسردگی آلفاپین دانست [۱۳، ۱۴]. اثر ضدالتهابی آلفاپین را به سرکوب فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF- κ B) و فعال‌شدن سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن (MAPK) نسبت داده‌اند [۱۲] برای اطمینان از نقش این مسیر سیگنالینگ در اثر ضدافسردگی آلفاپین لازم است بیان و فعالیت این مولکول‌ها در مغز حیوانات گروه آمیلوئید بتا- آلفاپین بررسی شود که به دلیل کمبود بودجه تحقیقاتی برای محققین مطالعه حاضر میسر نبود.

التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو که از نتایج حاصل از رسوب آمیلوئید بتا در مغز هستند به مرگ نورونی در نواحی مختلف بخصوص در هیپوکامپ منجر می‌شوند که اختلالات رفتاری نظیر نقص حافظه و افسردگی را به دنبال دارد [۵، ۲۵]. بنابراین با جلوگیری از مرگ نورونی تا حد زیادی می‌توان از بروز اختلالات رفتاری ناشی از آمیلوئید بتا نیز ممانعت کرد. اثر ضدآپوپتوتیک آلفاپین در هیپوکامپ رت‌های مدل ایسکمی به اثبات رسیده است. آلفاپین بیان فاکتور ضدآپوپتوتیک Bcl را در هیپوکامپ و کورتکس این رت‌ها افزایش و بیان فاکتور پیش‌آپوپتوتیک Bax را کاهش می‌دهد [۱۴]. در تحقیق حاضر نیز نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی برش‌های هیپوکامپ در رت‌هایی که تحت تزریق $A\beta_{1-42}$ قرار گرفته بودند نشان داد که آلفاپین فقدان

References

- 1- Long JM, Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*. 2019 Oct;179(2):312-39.
- 2- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb perspect Med*. 2011 Sep;1(1):a006189.
- 3- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:450-64.
- 4- Halliday G. Pathology and hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2017 Nov;16(11):862-4.

- 5- Calvo-Flores Guzman B, Elizabeth Chaffey T, Hansika Palpagama T, Waters S, Boix J, Tate WP, et al. The interplay between beta-amyloid 1–42 (A β 1–42)-induced hippocampal inflammatory response, p-tau, vascular pathology, and their synergistic contributions to neuronal death and behavioral deficits. *Front Mol Neurosci*. 2020 Nov;13:196.
- 6- Bakunina N, Pariante CM, Zunszain PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*. 2015 Mar;144(3):365-73.
- 7- Ledo J, Azevedo E, Clarke J, Ribeiro F, Figueiredo C, Foguel D, et al. Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Molecul psychiatr*. 2013 Oct;18(10):1053-4.
- 8- Smith GS, Kuwabara H, Nandi A, Gould NF, Nassery N, Savonenko A, et al. Molecular imaging of beta-amyloid deposition in late-life depression. *Neurobiol Aging*. 2021 May;101:85-93.
- 9- Yoo KY, Park SY. Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. *Molecules*. 2012 Mar;17(3):3524-38.
- 10- Aydin E, Türkez H, Geyikoğlu F. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia*. 2013 Oct;68(5):1004-9.
- 11- Shahriari M, Zibae A, Sahebzadeh N, Shamakhi L. Effects of α -pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic Biochem Physiol*. 2018 Sep;150:40-7.
- 12- Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, Han YH, Kee JY, Kim H-J, et al. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med*. 2015 Jun;43(04):731-42.
- 13- Khoshnazar M, Bigdeli MR, Parvardeh S, Pouriran R. Attenuating effect of α -pinene on neurobehavioural deficit, oxidative damage and inflammatory response following focal ischaemic stroke in rat. *J Pharm Pharmacol*. 2019 Nov;71(11):1725-33.
- 14- Khoshnazar M, Parvardeh S, Bigdeli MR. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Stroke Cerebrovasc. Dis*. 2020 Aug;29(8):104977.
- 15- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier; 2006: 56-65.
- 16- Raman S, Asle-Rousta M, Rahnema M. Protective effect of fennel, and its major component trans-anethole against social isolation induced behavioral deficits in rats. *Physiol Int*. 2020 Apr;107(1):30-39.
- 17- Bigdeli Y, Asle-Rousta M, Rahnema M. Effects of limonene on chronic restraint stress-induced memory impairment and anxiety in male rats. *Neurophysiol*. 2019 Mar;51(2):107-13.
- 18- Asle-Rousta M, Oryan S, Ahmadiani A, Rahnema M. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by SEW2871 improves cognitive function in Alzheimer's disease model rats. *EXCLI J*. 2013;12:449.
- 19- Gradinariu V, Cioanca O, Hritcu L, Trifan A, Gille E, Hancianu M. Comparative efficacy of *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils against amyloid beta (1–42)-induced anxiety and depression in laboratory rats. *Phytochem Rev*. 2015 Aug;14(4):567-75.
- 20- Chang KW, Zong HF, Wang M, Rizvi MY, Neha SI, Yang WN, et al. PNU282987 alleviates A β -induced anxiety and depressive-like behaviors through upregulation of α 7nAChR by ERK-serotonin receptors pathway. *Neurosci lett*. 2020 Jul;731:135118.
- 21- Guzmán-Gutiérrez SL, Bonilla-Jaime H, Gómez-Cansino R, Reyes-Chilpa R. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life sciences*. 2015 May;128:24-9.
- 22- Piccinelli AC, Santos JA, Konkiewitz EC, Oesterreich SA, Formagio ASN, Croda J, et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutr Neurosci*. 2015 Jul;18(5):217-24.
- 23- Dougnon G, Ito M. Inhalation administration of the bicyclic ethers 1, 8-and 1, 4-cineole prevent anxiety and depressive-like behaviours in mice. *Molecules*. 2020 Jan;25(8):1884.

- 24- Kong Y, Wang T, Wang R, Ma Y, Song S, Liu J, et al. Inhalation of Roman chamomile essential oil attenuates depressive-like behaviors in Wistar Kyoto rats. *Sci. China Life Sci.* 2017 Jun;60(6):647-55.
- 25- Cruz-Sanchez F, Girones X, Ortega A, Alameda F, Lafuente J. Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: a topographical study. *J Neurol Sci.* 2010 Dec;299(1-2):163-7.
- 26- Roddy DW, Farrell C, Doolin K, Roman E, Tozzi L, Frodl T, et al. The hippocampus in depression: more than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression. *Biol Psychiatr.* 2019 Mar;85(6):487-97.