

Comparing the Effects of Rivastigmin and Aqueous Extract of Olibanum on gene Expression of Amyloid Precursor Protein in Rats Treated with Aluminum Chloride

Received: 25 November 2015

Revised: 17 December 2015

Accepted: 23 December 2015

ABSTRACT

Mohammad Khalaj-Kondori^{1*}
Samira Amiri²
Mohammad Ali Hosseinpour
Feizi³
Farzam Shaikhzadeh-Hesari⁴

¹Assistant Professor, Molecular Genetics, Animal Biology Department, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

²M.Sc, Genetics, Dept. of Genetics, Faculty of Basic Science, Tabriz Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

³Professor, Radiobiology, Animal Biology Department, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

⁴Associate Professor, Physiology, Animal Biology Department, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding Author:

Mohammad Khalaj-Kondori
Tel: (+98)4133392674
email: khalaj@tabrizu.ac.ir

Background: Laboratory Studies show that Olibanum boosts the process of learning and memory. Alzheimer' disease is one of the important cognitive abnormalities which affect memory. Moreover, increased expression of amyloid precursor protein (*App*) results in Alzheimer' disease. This study aimed to compare the effects of Olibanum aqueous extract and rivastigmin on the expression of *App* gene in rats that are treated by AlCl₃.

Materials and Methods: 24 adult male rats with a weight range of 220±30 gr. were randomly divided into 4 groups (n=6) and treated for 120 days. Treating groups were as follow: Group no. 1 as control , group no. 2 as Alzheimer's model, group no. 3 as Olibanum treated , group 4 as rivastegmin teated were received 1 ml of distilled water, AlCl₃ 20mg/kg, AlCl₃ (20 mg/kg) for 60 days and then AlCl₃ with the same dose plus aqueous extract of Olibanum (200 mg/kg) for another 60 days and , AlCl₃ (20 mg/kg) for 60 days and then AlCl₃ with the same dose plus rivastigmin (0.3 mg/kg) for another 60 days, respectively. Then, learning and spatial memory performance of the rats were examined in 6 successive days with Morris-Water-Maze. After behavioral tests, hippocampus of the rats was isolated and saved in -80 degree centigrade. Total RNA was extracted by using RNX-plus solution. Finally, the expression of *App* gene was examined by semi-quantitative RT-PCR.

Results: Results obtained from Morris-Water-Maze showed that AlCl₃ impairs memory performance in rats; while treatments with rivastigmin or aqueous extract of Olibanum improves learning in the AlCl₃-treated rats. The *App* gene expression analysis revealed that this gene was up-regulated significantly by utilizing AlCl₃. Comparing the effects of rivastigmin and aqueous extract of Olibanum showed that Olibanum but not rivastigmin decreases the expression of *App*.

Conclusion: AlCl₃ treatment can impair learning and spatial memory in rats while Olibanum or rivastigmin might improve their performance. Moreover, Olibanum impedes AlCl₃-induced *App* up-regulation.

Keywords: *App*, alzheimer, olibanum, rivastigmin

مقایسه تأثیر داروی ریواستیگمین و عصاره آبی کندر بر بیان ژن پیش ساز آمیلوئید در رت‌های تیمار شده با کلرید آلومینیوم

تاریخ پذیرش: ۲ دی ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح: ۲۶ آذر ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۴ آذر ۱۳۹۴

چکیده

محمد خلیج کندری^{*۱}سمیرا امیری^۲محمدعلی حسینپور فیضی^۳فرزام شیخ زاده حصارى^۴

مقدمه: مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که کندر در روند افزایش یادگیری و تقویت حافظه مؤثر است. یکی از اختلالات مهم شناختی درگیرکننده حافظه بیماری آلزایمر می‌باشد. همچنین افزایش بیان ژن پیش ساز آمیلوئید (*App*) به آلزایمر می‌انجامد. مطالعه حاضر با هدف مقایسه تأثیر مصرف خوراکی عصاره آبی کندر با داروی ریواستیگمین بر بیان ژن پیش ساز آمیلوئید (*App*) در هیپوکمپ رت‌های تیمار شده با $AlCl_3$ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین منظور ۲۴ رأس رت نر بالغ با محدوده وزنی 220 ± 30 گرم به‌طور تصادفی در چهار گروه ($n=6$) تقسیم شدند و به مدت ۱۲۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمار گروه‌ها به صورت، گروه یک کنترل (آب مقطر)، گروه دوم به‌عنوان گروه مدل آلزایمر روزانه یک میلی‌لیتر ماده شیمیایی $AlCl_3$ با دوز mg/kg ۲۰۰، گروه سوم به مدت دو ماه $AlCl_3$ با همان دوز و دو ماه دیگر عصاره آبی کندر با دوز mg/kg ۰/۳ دریافت نمودند. پس از پایان دوره تیمار، عملکرد حافظه فضایی و یادگیری حیوانات توسط ماز آبی موریس به مدت ۶ روز متوالی ارزیابی شد. سپس بافت هیپوکمپ آن‌ها جداسازی و در دمای $-80^\circ C$ درجه نگهداری گردید. RNA ی تام با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج گردید و میزان بیان ژن *App* به روش نیمه کمی (Semi-Quantitative) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از ماز آبی موریس نشان داد که مصرف $AlCl_3$ باعث از بین رفتن یادگیری در رت‌ها شده است ولی تجویز عصاره آبی کندر و یا ریواستیگمین باعث بهبود نسبی یادگیری در رت‌های مدل می‌شود. بررسی میزان بیان نسبی *App* در گروه‌های مختلف نشان داد که مصرف $AlCl_3$ افزایش معنی‌داری در بیان *App* القاء می‌کند. مقایسه اثر تیمار با عصاره آبی و داروی ریواستیگمین در رت‌های مدل حاکی از آن است که عصاره آبی کندر می‌تواند باعث کاهش بیان ژن *App* در مقایسه با داروی ریواستیگمین شود.

نتیجه‌گیری: مصرف $AlCl_3$ باعث آسیب یادگیری و عملکرد حافظه فضایی در رت‌ها می‌شود و تجویز عصاره آبی کندر و یا ریواستیگمین می‌تواند آن بهبود بخشد. همچنین عصاره آبی کندر می‌تواند افزایش بیان القاء شده *App* توسط $AlCl_3$ را کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: *App*، آلزایمر، کندر، ریواستیگمین

استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
آکارشناسی ارشد، ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران.
آستاد، رادیوبیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
آدانشیار فیزیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول:

محمد خلیج کندری

تلفن: ۰۲۶۷۴۳۳۳۹۴۱۳۳۳ (+۹۸)

پست الکترونیک:

khalaj@tabrizu.ac.ir

مقدمه

مناطق مختلف مغز از قبیل، آمیگدال، هیپوکمپ و منطقه کورتکس، حافظه و عملکرد شناختی افراد را درگیر می‌کند. آلزایمر نمونه بارزی از اختلالات نورولوژیکی مرتبط با ناحیه هیپوکمپ می‌باشد که حافظه فرد به‌طور فزاینده‌ای در آن کاهش می‌یابد و بیشتر با

یادگیری، فرآیند کسب اطلاعات یا مهارت‌های جدید است. درحالی‌که حافظه فرآیند به‌کارگیری اطلاعات به‌دست‌آمده در طی زمان می‌باشد [۱]. امروزه مشخص شده است که اختلالات در

عادی تولید این پپتیدها متعادل است و به سرعت تجزیه می شوند. اما در بیماری آلزایمر این تعادل به هم می ریزد و نسبت $A\beta_{42}$ به $A\beta_{40}$ افزایش می یابد که نتیجه آن رسوب و تشکیل پلاک های آمیلوئیدی می باشد [۱۰-۱۳].

علی رغم پیشرفت های حاصل، هنوز درمان و مدیریت بیماران آلزایمری چالش زا است و درمان قطعی برای آن یافت نشده است. از طرف دیگر داروهای مورد استفاده در درمان آلزایمر از قبیل داروی ریواستیگمین، هرکدام مزایا و معایب خاص خود را دارند و تلاش برای یافتن دارو یا داروهای دیگر ادامه دارد. در این بین، فرآورده های گیاهی مختلف می توانند گزینه مناسبی برای درمان مطرح باشند. از جمله فرآورده های گیاهی که در طب سنتی برای تقویت حافظه و جلوگیری از ابتلا به فراموشی مورد استفاده قرار می گیرد، کندر می باشد که با نام های مختلف از جمله Frankinscence و Olibanum در کشورهای مختلف شناخته می شود. اثر عصاره های مختلف این فرآورده گیاهی بر تقویت حافظه در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۱۴-۱۹]. کندر صمغ رزینی است که از درختچه های خانواده بوسراسه و از جنس بوسولیا به دست می آید. از میان گونه های مختلف بوسولیا چهار گونه ای آن با نام های *Boswellia*, *Boswellia carteri*, *Boswellia serrate* و *Boswellia sacra*, *papyrifera* کندر بیشتری تولید می کنند. رزین کندر حاوی ترکیبات مختلف ترپنوئیدی و قندی می باشد. بوسولیک اسیدها از اجزای اصلی و مهم کندر می باشند به طوری که اثرات درمانی کندر به آن ها نسبت داده می شود [۱۴].

با توجه به اثرات تقویت کنندگی کندر در حافظه، در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی آن بر بیان ژن *App* و همچنین حافظه فضایی رت های مدل آلزایمری القاء شده با کلرید آلومینیوم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل با نتایج داروی ریواستیگمین مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

روش تهیه عصاره آبی کندر

رزین کندر مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت MOTHER HERBS PVT LTD هندوستان تهیه گردید. روش تهیه عصاره آبی کندر قبلاً گزارش شده است و بر اساس آن عمل شد [۱۵]. ۲۰۰ گرم کندر در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد تا به خوبی خیسانده شود. پس از آن کندر خیسانده شده در بن ماری ۶۰ درجه تا زمان حل شدن بخش محلول کندر حرارت داده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی

افزایش سن مرتبط است و در دهه های شش و هفت زندگی بروز پیدا می کند [۱ و ۲]. تجمع پپتید بتا آمیلوئید در فضای خارج سلولی و تشکیل کلاف های رشته ای حاوی پروتئین Tau در داخل نورون ها از عوامل اصلی ایجاد بیماری آلزایمر است. اگرچه علت اصلی شروع آلزایمر هنوز مشخص نیست. ولی عدم تعادل در استرس اکسیداتیو و کاهش سطح استیل کولین، از عوامل اولیه در ایجاد بیماری آلزایمر می باشند. کاهش سطح استیل کولین ناشی از تولید یک آنزیم بنام استیل کولین استراز می باشد که آن را تخریب می کند. در نتیجه انتشار استیل کولین در فضای سیناپسی کاهش می یابد. نشان داده شده است که مهارکننده های کولین استراز، افزایش دهنده عملکرد سیستم کولینرژیک هستند و تا حد زیادی در بهبود بسیاری از اختلال های رفتاری مشاهده شده در آلزایمر مفید می باشند [۳-۵].

آلومینیوم کلراید، یک فاکتور محیطی است که بر روی چندین آنزیم اثر می گذارد و به عنوان یک سم عصبی به حساب می آید. این ترکیب باعث افزایش نیتریک اکسید، یون کلسیم، لیپید و افزایش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می شود. همچنین مشاهده شده است که این ترکیب باعث افزایش سطح پپتیدهای بتا-آمیلوئید و نیز افزایش سطح فاکتورهای التهابی از قبیل فاکتورهای آلفا و اینترلوکین ۱-بتا در بخش هیپوکمپ رت ها می شود و بدین ترتیب با تشدید التهاب عصبی و آسیب به نورون ها به ویژه نورون های ناحیه هیپوکمپ باعث ایجاد بیماری آلزایمر می شود [۷ و ۶]. استفاده از این ترکیب به عنوان یک ماده القاگر بیماری آلزایمر در مطالعات مختلف گزارش و تأیید شده است [۶-۹].

جهش در دو ژن *App* و *Psen1* که مسئول تولید بتا آمیلوئید هستند، برای آسیب رساندن به نورون های عصبی کفایت می کنند. بیش از ۳۰ جهش در *App* و ۱۸۰ جهش در دو ژن پرسیلیین شناسایی شده است که تنها ۵٪ این جهش ها منجر به بیماری آلزایمر می شود. بتا-سکرتاز و گاما-سکرتاز، عامل شکافتن *App* در مسیر تولید بتا آمیلوئید هستند. بتا-سکرتاز *App* را در جایگاه ۶۷۱ برش داده، باعث آزاد شدن دمین خارج سلولی و محلول آن می شود و پس از آن گاما-سکرتاز قسمت درون غشایی باقیمانده *App* را که C99 نامیده می شود برش داده، باعث رهایی قسمت درون سلولی و بتا-آمیلوئید می شود. گاما-سکرتاز می تواند جایگاه های متفاوتی را در ناحیه کوچکی از C99 برش دهد که در نتیجه آن، پپتیدهای $A\beta_{40}$ (دارای ۴۰ اسید آمینه) و $A\beta_{42}$ (دارای ۴۲ اسید آمینه) تولید می شوند. پپتید $A\beta_{40}$ دارای حلالیت بالا بوده، در صورتی که $A\beta_{42}$ حلالیت پایینی دارد و راحت تر رسوب می کند. در حالت

رت به مدت ۱۰ ثانیه روی سکوی پنهان قرار داده شد تا یک توصیف کلی از محیط اطراف خود به دست آورد. سه فاکتور مهم زمان سپری شده و مسافت طی شده و سرعت شنا برای ارزیابی عملکرد هر موش در آزمون حافظه مورد استفاده قرار گرفت.

تشریح و جداسازی هیپوکمپ موش های صحرایی

بعد از انجام آزمایش ماز آبی موریس، حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۱۰۰ mg/kg) و گزیزلین (۵ mg/kg) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی عمقی، سر قطع شد و مغز حیوانات از مجامه خارج گردید و هیپوکمپ بر روی پلیت سرد جدا و در ازت مایع فریز گشت و نمونه ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA از بافت های هیپوکمپ و بررسی کمی و کیفی آن

برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus شرکت سیناژن استفاده شد. ابتدا نمونه بافتی فریز شده در هاون استریل له گردید و سپس در میکروتیوپ حاوی ۱ ml محلول RNX-Plus هموژنیزه شد و مراحل استخراج طبق پروتکل پیشنهادی شرکت اجرا شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز و نانودراپ بررسی و غلظت RNA محاسبه شد.

سنتز cDNA و بررسی نیمه کمی بیان ژن *App*

جهت حذف آلودگی های احتمالی با DNA، ابتدا تیمار با DNase I انجام شد. بدین منظور، یک میکروگرم RNA، ۱ μl آنزیم DNase I، ۱ μl بافر آنزیم DNase I، ۰/۵ μl مهارکننده آنزیم RNase به یک ویال ۰/۵ میکرولیتری انتقال و با آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) به حجم ۱۰ μl رسانده شد و به مدت ۳۰min در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۱ μl EDTA به آن اضافه و در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا آنزیم DNase I غیرفعال شود. RNA تیمار شده با DNase I برای سنتز cDNA به کار رفت. جهت سنتز cDNA از رندوم هگزامر استفاده شد و در نهایت مقدار ۱ μl از cDNA سنتز شده برای انجام هر واکنش PCR به کار رفت. در این پژوهش از ژن *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای تکثیر ژن *App* از پرایمرهای رفت با توالی

3'-TCCAACCGTGGCCTCCT-5' و برگشت

3'-TGATGGCGGACTTCGAAG-5' و برای تکثیر

Gapdh از پرایمر رفت

3'-AACGACCCCTTCATTGACC-5' و برگشت

عبور داده شد و به عنوان محلول ذخیره تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. تجویز خوراکی با عبور سوزن مخصوص تغذیه (Feeding needle) از دهان و تزریق عصاره به داخل مری انجام گردید.

گروه بندی رت ها و تیمار

۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۷ ماهه در محدوده وزنی (۲۲۰±۳۰) گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در طول آزمایش در شرایط استاندارد همراه با آب و غذای مناسب دردمای ۲۴±۱°C درجه سانتی نگهداری شدند. همه حیوانات در اتاق حیوانات دانشگاه تبریز درون قفس های n=6 تایی با رطوبت نسبی و ۱۲ ساعت چرخه نور/تاریکی (نور از ۶:۰۰ تا ۱۸:۰۰ ساعت) نگهداری شدند.

رت ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم و به مدت چهار ماه مورد تیمار قرار گرفتند. گروه اول به عنوان گروه کنترل روزانه 1ml آب مقطر، گروه دوم به عنوان گروه مدل آلزایمر روزانه AICl₃ با دوز ۲۰ mg/kg، گروه سوم به مدت دو ماه AICl₃ و سپس دو ماه دیگر عصاره آبی کندر با دوز ۲۰۰ mg/kg به همراه AICl₃ با همان دوز، گروه چهارم به مدت دو ماه AICl₃ و دو ماه دیگر ریواستیگمین با دوز ۰/۳ mg/kg به همراه AICl₃ با همان دوز دریافت نمودند. تمام تیمارها در ساعت مشخصی از روز (۱۳-۱۱ قبل از ظهر) از طریق گاواژ به رت ها خوراندند شد.

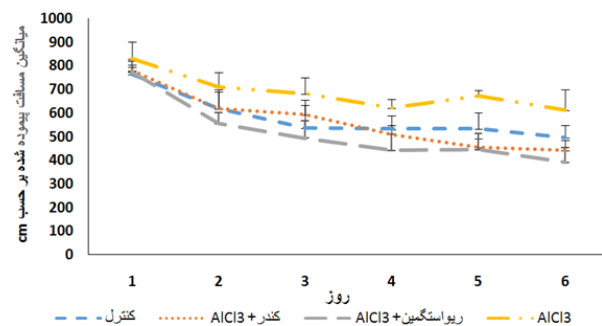
تست رفتاری ماز آبی موریس

برای سنجش بهبود حافظه فضایی در موش های صحرایی از تست ماز آبی موریس (Morris Water Maze) استفاده شد. این آزمایش بر اساس گزارش صادقی و همکاران انجام شد [۱۵]. این وسیله تانک سیاه رنگی به قطر ۱۳۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر است که تا عمق ۲۵ سانتی متری با آب پر شده است و در واقع این تانک به چهار قطب (شمال، جنوب، شرق، غرب) تقسیم بندی گردیده است. سکوی مخفی (Platform) با قطر ۱۰ سانتی متر و ارتفاع ۲۴ سانتی متری در حدود ۱ سانتی متر زیر سطح آب در مرکز شمال شرقی قرار گرفت و موقعیت سکو در طول هر آزمایش ثابت و دمای آب ۲۸ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. آزمایش به مدت ۶ روز متوالی برای تمام گروه ها تکرار گردید. در هر کار آزمایشی حیوان از یکی از ۴ قطب به طور تصادفی و در حالی که سر حیوان را به سمت دیوار حوضچه قرار داشت در آب رها گردید و حیوان ۴۰ ثانیه فرصت داشت تا سکوی پنهان را پیدا کند. در شروع هر آزمایش هر

موريس را نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار پیداست در تمامی گروه‌ها زمان طی شده برای پیدا کردن سکوی مخفی طی شش روز کارآزمایی کاهش نشان می‌دهد و این کاهش در همه گروه‌ها به جز گروه مدل آلزایمر (گروه تیمار شده با $AlCl_3$) معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). این یافته نشان می‌دهد که یادگیری و حافظه فضایی در گروه مدل آلزایمری در اثر مصرف کلرید آلومینیوم دچار اختلال شده است اما در سه گروه دیگر یادگیری اتفاق افتاده است. مقایسه بین گروهی میانگین زمان سپری شده در طول شش روز تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل، گروه مدل آلزایمر، گروه تیمار با کندر و نیز گروه تیمار با ریواستیگمین نشان نداد ($p > 0.05$). علی‌رغم اینکه اختلاف مشاهده شده بین گروه مدل آلزایمر با هر سه گروه مذکور معنی‌دار نبود اما این اختلاف در مقایسه با تفاوت مشاهده شده بین سه گروه دیگر زیاد بوده است و این تفاوت زیاد را می‌توان به اثر سمیت عصبی کلرید آلومینیوم نسبت داد. همچنین کاهش میانگین زمان سپری شده در همه گروه‌ها به جز گروه مدل آلزایمر تا روز سوم شدید می‌باشد که نشان از یادگیری نسبی در سه گروه دیگر است. با این وجود، علی‌رغم اینکه این یادگیری نسبی تا روز ششم در هر دو گروه تیمار با کندر و تیمار با ریواستیگمین با شیب کمتری ادامه یافته است، در گروه کنترل این کاهش نسبی تا روز ششم تداوم نداشته است.

بررسی شاخص مسافت طی شده

شکل ۲، نمودار حاصل از مقایسه داده‌های مربوط به شاخص زمان سپری شده در گروه‌های مختلف طی شش روز را در آزمایش ماز آبی موريس نشان می‌دهد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در تمامی گروه‌ها مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی مخفی طی شش روز کارآزمایی دچار کاهش شده است و این کاهش در همه گروه‌ها به جز گروه مدل آلزایمر (گروه تیمار شده با $AlCl_3$) معنی‌دار می‌باشد (



شکل ۲: نمودار حاصل از مقایسه شاخص میانگین زمان سپری شده در گروه کنترل، مدل آلزایمر ($AlCl_3$)، تیمار با کندر (کندر + $AlCl_3$) و گروه تیمار با ریواستیگمین (ریواستیگمین + $AlCl_3$) در طول شش روز کارآزمایی ماز آبی موريس. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه شده است.

5-CCACGACATACTCAGCACC-3 استفاده شد. چرخه مناسب تکثیر برای هر دو ژن ۳۵ چرخه تعیین شد و شرایط PCR برای هر دو ژن یکسان بوده، به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه، ۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه ۳۰ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه اجرا شد. محصولات PCR ژن‌ها *App* و *Gapdh* هر نمونه در ژل پلی آکریل آمید الکتروفورس شد و شدت باندهای حاصل به وسیله نرم افزار *Imag J* بررسی و نسبت شدت باندهای *App* به شدت باندهای *Gapdh* به عنوان شاخص میزان بیان در نظر گرفته شد. شاخص میزان بیان در نمونه‌های آزمایش و کنترل به وسیله نرم افزار *SPSS* با هم مقایسه شد. بدین منظور مقدار ارزش $p < 0.05$ به عنوان آستانه معنی‌داری تفاوت بیان در گروه‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها به وسیله نرم افزار *Excel* و یا *SPSS* رسم شدند.

یافته‌ها

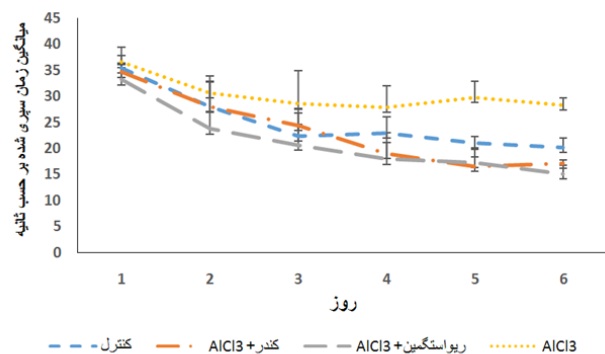
آزمایش ماز آبی موريس

بررسی شاخص سرعت شنا

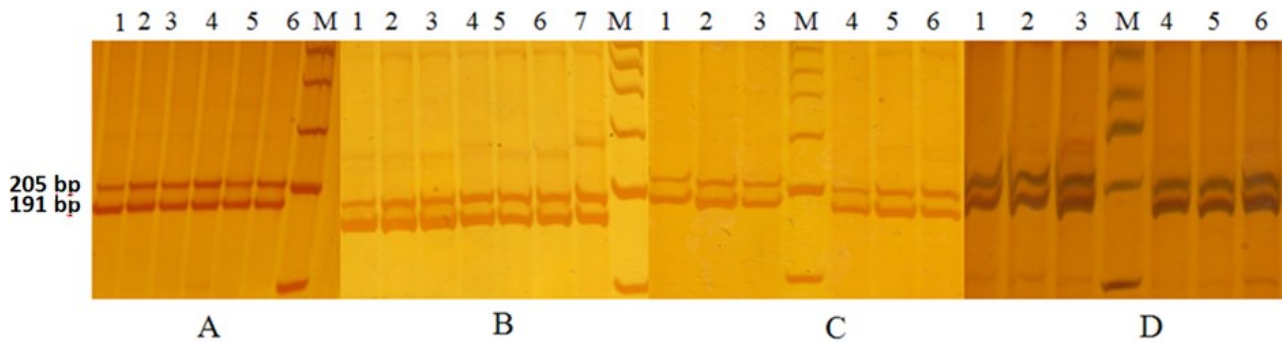
بررسی سرعت شنا در طی کارآزمایی در بین تمامی گروه‌ها تغییر معنی‌داری نشان نداد که این امر نشان می‌دهد که هیچ اختلال حرکتی در حیوانات تحت آزمایش در اثر مصرف کندر و ریواستیگمین به وجود نیامده است و می‌توان دو فاکتور زمان سپری شده و مسافت طی شده را بین گروه‌ها با هم مقایسه کرد.

بررسی شاخص زمان سپری شده

شکل ۱، نمودار حاصل از بررسی و مقایسه داده‌های مربوط به زمان سپری شده در گروه‌های مختلف طی شش روز متوالی در ماز آبی



شکل ۱: نمودار حاصل از مقایسه شاخص میانگین زمان سپری شده در گروه کنترل، مدل آلزایمر ($AlCl_3$)، تیمار با کندر (کندر + $AlCl_3$) و گروه تیمار با ریواستیگمین (ریواستیگمین + $AlCl_3$) در طول شش روز کارآزمایی ماز آبی موريس. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه شده است.

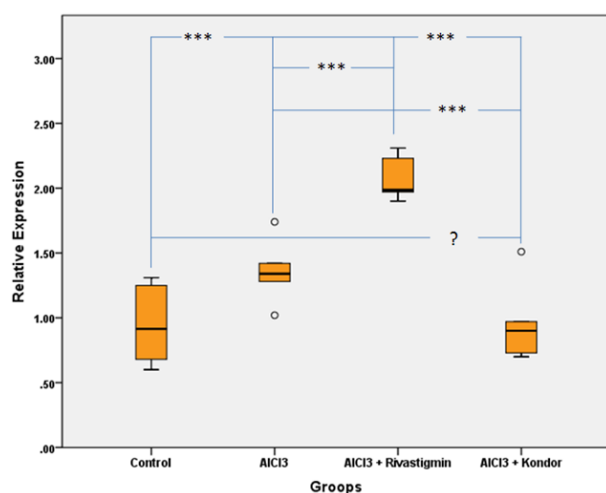


شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های *App* (۲۰۵ bp) و *Gapdh* (۱۹۱ bp) مربوط به (A) گروه مدل آلزایمر (B) گروه تیمار با عصاره آبی کندر (C) گروه کنترل (D) گروه تیمار با داروی ریواستیگمین. در هر ژل شماره‌های ۱ تا ۶ محصولات PCR نمونه‌های همان گروه و M اندازه نما را نشان می‌دهد.

App در گروه‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

صمغ رزینی کندر خاصیت‌های درمانی مختلفی دارد و در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی از قبیل آسم، برونشیت، سرطان و تقویت عملکرد حافظه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۰]. اثرات ضدالتهابی و همچنین تقویت عملکرد حافظه عصاره‌های مختلف کندر توسط پژوهش‌های مختلف مورد تأیید قرار گرفته است [۲۱-۱۴]. یکی از مهم‌ترین اختلالات مغزی-شناختی که حافظه افراد را تحلیل و از بین می‌برد بیماری آلزایمر می‌باشد. با این وجود



شکل ۴: نمودار مقایسه میزان بیان نسبی ژن *App* در گروه‌های مختلف؛ گروه‌های مختلف در محور افقی و میزان بیان نسبی ژن *App* در محور عمودی نشان داده شده است. Control نشان‌دهنده گروه کنترل، $AlCl_3$ نشان‌دهنده گروه مدل آلزایمر، $AlCl_3 + Rivastigmin$ نشان‌دهنده گروه تیمار با داروی ریواستیگمین، $AlCl_3 + Kondor$ نشان‌دهنده گروه تیمار با عصاره آبی کندر می‌باشد. *** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت بیان ($p < 0.05$) بین گروه‌های مربوطه و (?) نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بیان ($p > 0.05$) می‌باشد.

این یافته تأییدی بر نتایج حاصل از شاخص زمان سپری شده می‌باشد که حاکی از وقوع اختلال در یادگیری و حافظه فضایی در گروه مدل آلزایمری در اثر مصرف کلرید آلومینیوم بوده است. مقایسه بین گروهی میانگین مسافت طی شده در طول شش روز تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل، گروه مدل آلزایمر، گروه تیمار با کندر و نیز گروه تیمار با ریواستیگمین نشان نداد ($p > 0.05$). نتایج حاصل از بررسی شاخص مسافت طی شده، نتایج مربوط به شاخص زمان سپری شده را تأیید می‌کند.

بررسی بیان ژن *App*

در مطالعه حاضر برای بررسی بیان ژن *App* از روش نیمه کمی استفاده شد. محصولات PCR ژن‌های *App* و *Gapdh* هر نمونه در یک چاهک بارگذاری و الکتروفورز شدند. در شکل ۳ قسمت‌های A، B، C و D به ترتیب محصولات PCR مربوط به گروه‌های مدل آلزایمر، گروه تیمار با عصاره آبی کندر، گروه کنترل و گروه تیمار با ریواستیگمین را نشان می‌دهند. شدت باند *APP* هر نمونه با شدت باند *GAPDH* آن توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و نسبت *App* به *Gapdh* به‌عنوان شاخص بیان نسبی *App* برای هر نمونه محاسبه شد. مقایسه میانگین شاخص نسبی بیان *App* بین گروه‌های مختلف نشان داد که میزان بیان *App* در گروه‌های مدل آلزایمر و گروه تیمار با ریواستیگمین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد (مقدار ارزش P به ترتیب $p = 0.01$ و $p < 0.001$). در صورتی که بیان *App* در گروه تیمار با کندر تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد ($p = 0.964$). همچنین میزان بیان *App* در گروه مدل آلزایمری و گروه تیمار با ریواستیگمین نسبت به گروه تیمار با کندر افزایش معنی‌داری نشان داد (مقدار ارزش p به ترتیب $p = 0.011$ و $p < 0.001$) و بالاخره میزان بیان *App* در گروه تیمار با ریواستیگمین نسبت به گروه مدل آلزایمر هم بیشتر بود ($p < 0.001$). نمودار مقایسه بیان نسبی

بلات بررسی کردند و نشان دادند که سطح پپتیدهای بتا- آمیلوئید در کورتکس و هیپوکمپ رت‌ها دچار افزایش شده است [۹].

در پژوهش حاضر مشاهده شد که مصرف داروی ریواستیگمین که یکی از داروهای منتخب در معالجه بیماران مبتلا به آلزایمر می‌باشد [۲۳ و ۲۴]، نمی‌تواند بیان ژن *App* را تعدیل یا کاهش دهد و بنابراین تأثیری بر عامل ایجاد و پیشرفت بیماری یعنی پلاک‌های بتا-آمیلوئیدی نخواهد داشت. لذا می‌توان استنباط کرد که تأثیر آن موقتی بوده و با پیشرفت بیماری اثرگذاری آن کاهش خواهد یافت. می‌توان این مشاهده را این‌گونه توجیه نمود که داروی ریواستیگمین یک داروی اختصاصی مهارکننده استیل کولین استراز است و از این طریق، دوام و انتشار استیل کولین را افزایش و از این طریق باعث تقویت عملکرد حافظه می‌شود [۲۳ و ۲۴] و احتمالاً دخالتی در مسیر بیوسنتز پپتیدهای بتا-آمیلوئید ندارد. اما نتایج حاصل نشان می‌دهند که مصرف کندر افزایش بیان القاء شده *App* در اثر آلومینیوم کلرید را خنثی کرده، سطح بیان آن را تقریباً تا سطح بیان *App* در گروه کنترل کاهش داده است (شکل ۴). این یافته بسیار می‌تواند حائز اهمیت باشد چراکه کندر سطح یکی از فاکتورهای اصلی در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر را کاهش داده است که می‌تواند از منظر پاتولوژیک بااهمیت باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که مصرف $AlCl_3$ باعث آسیب یادگیری و عملکرد حافظه فضایی در رت‌ها می‌شود ولی تجویز عصاره آبی کندر و یا ریواستیگمین می‌تواند فرآیند یادگیری و عملکرد حافظه فضایی آسیب‌دیده در رت‌های مدل را نسبتاً بهبود ببخشد. همچنین مصرف $AlCl_3$ باعث افزایش بیان *App* می‌شود و داروی ریواستیگمین نمی‌تواند افزایش بیان القاء شده توسط آن را کاهش دهد. بااین‌وجود، مصرف کندر قادر است افزایش بیان القاء شده *App* توسط $AlCl_3$ را کاهش و تعدیل نماید.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز و تمامی عزیزانی که در اجرای این پژوهش نویسندگان مقاله را یاری نمودند به ویژه آقای کریم اکبری قدردانی می‌شود.

منابع

1. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports*. 2004 Aug 1;24(4-5):475-522.
2. Liu YH, Zeng F, Wang YR, Zhou HD, Giunta B,

درمان قطعی برای این بیماری در حال حاضر وجود ندارد و تحقیقات پیرامون مشخص کردن جوانب ناشناخته بیماری و یافتن درمان‌های مناسب در حال انجام است. یکی از داروهایی که در درمان بیماران آلزایمری مورد استفاده قرار می‌گیرد داروی ریواستیگمین می‌باشد که یک مهارکننده استیل کولین استراز می‌باشد [۴]. هرچند این دارو درمان‌کننده بیماری آلزایمر نیست بااین‌حال در تقویت نسبی عملکرد حافظه با مهار استیل کولین استراز و تقویت سیستم کولینرژیک مغز مؤثر می‌باشد.

در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی کندر با اثر ریواستیگمین به‌عنوان یک داروی منتخب در درمان بیماری آلزایمر، بر روی رت‌های مدل آلزایمری القاء شده با آلومینیوم کلرید مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش ماز آبی موريس نشان داد که مصرف $AlCl_3$ باعث آسیب حافظه فضایی و یادگیری رت‌ها شده است. القاء آلزایمر در رت‌ها در اثر مصرف $AlCl_3$ توسط پژوهش‌های مختلفی به اثبات رسیده است [۸-۶] و نتایج حاصل از ماز آبی موريس در پژوهش حاضر هم تأییدی بر آن گزارش‌ها است. مقایسه عملکرد حافظه فضایی رت‌های گروه‌های مختلف طی شش روز کارآزمایی نشان داد که آسیب حاصله از مصرف کلرید آلومینیوم فرآیند یادگیری را در گروه‌های تیمار شده با ریواستیگمین و یا عصاره آبی کندر کند نموده است چراکه در حالت طبیعی یادگیری در سه روز اول اتفاق می‌افتد و پس‌از آن شاخص زمان سپری شده و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان تقریباً ثابت می‌ماند اما در گروه‌های تیمار با ریواستیگمین و تیمار با کندر این شاخص‌ها تا روز ششم با شیب نسبتاً ملایمی تداوم داشته است.

بررسی میزان بیان نسبی ژن *App* در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که $AlCl_3$ باعث افزایش بیان آن می‌شود در صورتی که مصرف عصاره آبی کندر افزایش بیان القاء شده در اثر $AlCl_3$ را برطرف می‌نماید. بااین‌وجود مصرف داروی ریواستیگمین تأثیری برافزایش بیان القاء شده توسط $AlCl_3$ ندارد. نتایج مشاهده شده در مورد افزایش بیان *App* در اثر مصرف $AlCl_3$ منطبق با گزارش‌های قبلی [۹ و ۸ و ۶] است. زکی^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که تیمار ۴ الی ۸ هفته‌ای رت‌ها با $AlCl_3$ باعث افزایش بیان ژن‌های *App* و *Bace1* می‌شود. *App* و *Bace1* از جمله ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز پپتیدهای بتا-آمیلوئید هستند که افزایش بیان آن‌ها می‌تواند به تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی و بروز آلزایمر بیانجامد [۸]. گذشته از این، ژنگ-ژنگ^۲ و همکارانش، سطح پپتیدهای بتا-آمیلوئید را در رت‌های مدل آلزایمری القاء شده با $AlCl_3$ و D-galactos- توسط وسترن

- Tan J, Wang YJ. Immunity and Alzheimer's disease: immunological perspectives on the development of novel therapies. *Drug discovery today*. 2013 Dec 31;18(23):1212-20.
3. Perry NS, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. In vitro Inhibition of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* Essential Oil and Constituent Terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2000 Jul 1;52(7):895-902.
 4. Bejar C, Wang RH, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *European journal of pharmacology*. 1999 Nov 3;383(3):231-40.
 5. Esmaeili S, Riazi GH, Afrasiabi A, Modaresi SMS, Dadras A, Naeini FB, Nezhati MN. Design, Synthesis and the Inhibitory Effects of Amino Acid Derivatives of β -Boswellic Acid on Acetylcholinesterase. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2014;28(1): 200-206.
 6. Lin WT, Chen RC, Lu WW, Liu SH, Yang FY. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model. *Scientific reports*. 2015 Apr 15; 5:9671.
 7. Abdalla MS, Mannaa FA, Abdel-Wahhab KG, Elhennamy RE, EL-Kassaby MI. Effect of some Nutraceutical Agents on Aluminum-Induced Functional Neurotoxicity in Senile Rats: II. Effect of L-Serine and Methionine. *J Appl Sci Res* 2013; 9: 2909-17.
 8. Zaky A, Mohammad B, Moftah M, Kandeel KM, Bassiouny AR. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of aluminum-induced neuroinflammation. *BMC neuroscience*. 2013 Mar 11;14 (1):26.
 9. Sun ZZ, Chen ZB, Jiang H, Li LL, Li EG, Xu Y. Alteration of A β metabolism-related molecules in predementia induced by AlCl₃ and D-galactose. *Age*. 2009 Dec 1;31(4):277-84.
 10. Iwatsubo T, Saido TC, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Full-length amyloid-beta (1-42 (43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42 (43) deposit in diffuse plaques. *The American journal of pathology*. 1996 Dec;149(6):1823.
 11. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010 Dec 24;330 (6012):1774.
 12. Lahiri DK, Greig NH. Lethal weapon: amyloid β -peptide, role in the oxidative stress and neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2004 Jun 30;25(5):581-7.
 13. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):387-90.
 14. Sultana A, Rahman KU, Padmaja AR, Rahman SU. *Boswellia serrata* Roxb. A traditional herb with versatile pharmacological activity: A review. *Int J Pharm Sci Res*. 2013 Jun 1;4:2106-17.
 15. Sadeghi F, Khalaj-Kondori M, Hosseinpour-Feizi MA, Shaikhzadeh-Hesari F. The Effect of Aqueous Extract of *Boswellia* on Learning and Spatial Memory in Adult Male Rats. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences*. 2014; 22(95):122-131. (Persian)
 16. Hosseini-Sharifabad M, Esfandiari E. Effect of *Boswellia serrata* Triana & Planch. gum resin administration during lactation on morphology of pyramidal neurons in hippocampus of rat. *Journal of Herbal Drugs*. 2011;2(1):45-52. (Persian)
 17. Karima O, Riazi G, Yousefi R, Movahedi AA. The enhancement effect of beta-boswellic acid on hippocampal neurites outgrowth and branching (an in vitro study). *Neurological Sciences*. 2010 Jun 1;31 (3):315-20.
 18. Jalili C, Salahshoor MR, Pourmotabbed A, Moradi S, Roshankhah SH, Darehdori AS, Motaghi M. The effects of aqueous extract of *Boswellia Serrata* on hippocampal region CA1 and learning deficit in kindled rats. *Research in pharmaceutical sciences*. 2014 Sep;9(5):351.
 19. Mahmoudi A, Hosseini-Sharifabad A, Monsef-Esfahani HR, Yazdinejad AR, Khanavi M, Roghani A, Beyer C, Sharifzadeh M. Evaluation of systemic administration of *Boswellia papyrifera* extracts on spatial memory retention in male rats. *Journal of natural medicines*. 2011 Jul 1;65(3-4):519-25.
 20. Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M. Frankincense (乳香 Rǔ Xiāng; *Boswellia* Species): From the selection of traditional applications to the novel phytotherapy for the prevention and treatment of serious diseases. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2013 Oct;3 (4):221.
 21. Singh GB, Atal CK. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and actions*. 1986 Jun 1;18(3-4):407-12.
 22. Onor ML, Trevisiol M, Aguglia E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical interventions in aging*. 2007 Mar;2(1):17-32.
 23. Annicchiarico R, Federici A, Pettenati C, Caltagirone C. Rivastigmine in Alzheimer's disease: Cognitive function and quality of life. *Therapeutics and clinical risk management*. 2007 Dec;3(6):1113-23.
 24. Su J, Liu Y, Liu Y, Ren L. Long-term effectiveness of rivastigmine patch or capsule for mild-to-severe Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Expert review of neurotherapeutics*. 2015 Sep 2;15(9):1093-103.