*Journal of Police Medicine*

Winter 2016; Vol. 4, No. 4: 279-286

Original Article

# 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

Mohammad Khalaj-Kondori[1*]
Samira Amiri[2]
Mohammad Ali Hosseinpour Feizi[3]
Farzam Shaikhzadeh-Hesari[4]

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

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

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

[4]Associate 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

## ABSTRACT

***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 $AlCl_3$.

***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, $AlCl_3$ 20mg/kg, $AlCl_3$ (20 mg/kg) for 60 days and then $AlCl_3$ with the same dose plus aqueous extract of Olibanum (200 mg/kg) for another 60 days and , $AlCl_3$ (20 mg/kg) for 60 days and then $AlCl_3$ 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 $AlCl_3$ 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 $AlCl_3$. Comparing the effects of rivastigmin and aqueous extract of Olibanum showed that Olibanum but not rivastigmin decreases the expression of *App*.

***Conclusion:*** $AlCl_3$ treatment can impair learning and spatial memory in rats while Olibanum or rivastigmin might improve their performance. Moreover, Olibanum impedes $AlCl_3$-induced *App* up-regulation.

***Keywords:*** *App*, alzheimer, olibanum, rivastigmin

زمستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۴- صفحات ۲۸۶-۲۷۹

**مجله طب انتظامی**

مقاله تحقیقی

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

**تاریخ دریافت:** ۴ آذر ۱۳۹۴ **تاریخ اصلاح:** ۲۶ آذر ۱۳۹۴ **تاریخ پذیرش:** ۲ دی ۱۳۹۴

## چکیده

**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 ۳۰±۲۲۰ گرم به‌طور تصادفی در چهار گروه (n=۶) 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 ۲۰، گروه سوم به مدت دو ماه $AlCl_3$ با همان دوز و دو ماه دیگر عصاره آبی کندر با دوز mg/kg ۲۰۰، گروه چهارم مجدداً به مدت دو ماه $AlCl_3$ با همان دوز و دو ماه دیگر ریواستیگمین 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 ۸۰- 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) موردبررسی 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 رت های 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 AlCl3 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 AlCl3 را کاهش دهد.

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

**محمد خلج کندری**[1*]
**سمیرا امیری**[2]
**محمدعلی حسینپور فیضی**[3]
**فرزام شیخ زاده حصاری**[4]

[1]استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
[2]کارشناسی ارشد، ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران.
[3]استاد، رادیوبیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
[4]دانشیار فیزیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

**[*]نویسنده مسئول:**
محمد خلج کندری
تلفن: ۴۱۳۳۳۹۲۶۷۴(۹۸+)
پست الکترونیک:
khalaj@tabrizu.ac.ir

## مقدمه

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 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

*Journal of Police Medicine*
Winter 2016; Vol. 4, No. 4: 279-286

افزایش سن مرتبط است و در دهه‌های شش و هفت زندگی بروز پیدا می‌کند [۲ و ۱]. تجمع پپتید بتا آمیلوئید در فضای خارج سلولی و تشکیل کلاف‌های رشته‌ای حاوی پروتئین Tauدر داخل نورون‌ها 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 می‌باشند. کاهش سطح استیل کولین ناشی از تولید یک آنزیم بنام استیل کولین استراز می‌باشد که آن را تخریب می‌کند. درنتیجه انتشار استیل کولین در فضای سیناپسی کاهش می‌یابد. نشان داده شده است که مهارکننده‌های کولین استراز، افزایش‌دهنده عملکرد سیستم کولینرژیک هستند و تا حد زیادی در بهبود بسیاری از اختلال‌های رفتاری مشاهده‌شده در آلزایمر مفید می‌باشند [۵-۲].

آلومینیوم کلراید، یک فاکتور محیطی است که بر روی چندین آنزیم اثر می‌گذارد و به‌عنوان یک سم عصبی به حساب می‌آید. این ترکیب باعث افزایش نیتریک اکسید، یون کلسیم، لیپید و افزایش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می‌شود. 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 رت‌ها می‌شود و بدین ترتیب با تشدید التهاب عصبی و آسیب به نورون‌ها به‌ویژه نورون‌های ناحیه هیپوکمپ باعث ایجاد بیماری آلزایمر می‌شود [۷ و ۶]. استفاده از این ترکیب به‌عنوان یک ماده القاگر بیماری آلزایمر در مطالعات مختلف گزارش و تأیید شده است [۹-۶].

جهش در دو ژن *App* و *Psen1* که مسئول تولید بتا آمیلوئید هستند، برای آسیب رساندن به نورون‌های عصبی کفایت می‌کنند. بیش از ۳۰ جهش در *App* و ۱۸۰ جهش در دو ژن پرسیلین شناسایی شده است که تنها ۵٪ این جهش‌ها منجر به بیماری آلزایمر می‌شود. 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 می‌شود و پس‌ازآن گاما-سکرتاز قسمت درون غشایی باقیمانده *App* را که C99 نامیده می‌شود برش داده، باعث رهایی قسمت درون‌سلولی و بتا-آمیلوئید می‌شود. گاما-سکرتاز می‌تواند جایگاه‌های متفاوتی را در ناحیه کوچکی از C99 برش دهد که درنتیجه آن، پپتیدهای Aβ40 (دارای ۴۰ اسید آمینه) و Aβ42 (دارای ۴۲ اسید آمینه) تولید می‌شوند. پپتید Aβ40 دارای حلالیت بالا بوده، درصورتی‌که Aβ42 حلالیت پایینی دارد و راحت‌تر رسوب می‌کند. در حالت عادی تولید این پپتیدها متعادل است و به‌سرعت تجزیه می‌شوند. اما در بیماری آلزایمر این تعادل به هم می‌ریزد و نسبت Aβ42 به Aβ40 افزایش می‌یابد که نتیجه آن رسوب و تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی می‌باشد [۱۳-۱۰].

علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل، هنوز درمان و مدیریت بیماران آلزایمری چالش زا است و درمان قطعی برای آن یافت نشده است. از طرف دیگر داروهای مورداستفاده 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، فرآورده‌های گیاهی مختلف می‌توانند گزینه مناسبی برای درمان مطرح باشند. ازجمله فرآورده‌های گیاهی که در طب سنتی برای تقویت حافظه و جلوگیری از ابتلا به فراموشی مورداستفاده قرار می‌گیرد، کندر می‌باشد که با نام‌های مختلف ازجمله Frankinscence و Olibanum در کشورهای مختلف شناخته می‌شود. اثر عصاره‌های مختلف این فرآورده گیاهی بر تقویت حافظه در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۱۹-۱۴]. کندر صمغ رزینی است که از درختچه‌های خانواده بورسراسه و از جنس بوسولیا به دست می‌آید. از میان گونه‌های مختلف بوسولیا چهار گونه‌ی آن با نام‌های Boswellia serrate، Boswellia carteri، Boswellia papyrifera، Boswellia sacra کندر بیشتری تولید می‌کنند. رزین کندر حاوی ترکیبات مختلف ترپنوئیدی و قندی می‌باشد. بوسولیک اسیدها از اجزای اصلی و مهم کندر می‌باشند به‌طوری‌که اثرات درمانی کندر به آن‌ها نسبت داده می‌شود [۱۴].

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

## مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره آبی کندر

رزین کندر مورداستفاده 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 میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد تا به‌خوبی خیسانده شود. پس‌ازآن کندر خیسانده شده در بن ماری ۶۰ درجه تا زمان حل شدن بخش محلول کندر حرارت داده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی

**مجله طب انتظامی**
زمستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۴- صفحات ۲۸۶-۲۷۹

عبور داده شد و به‌عنوان 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.

گروه‌بندی رت‌ها و تیمار

۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۷ ماهه در محدوده وزنی ( ۳۰±۲۲۰) گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در طول آزمایش در شرایط استاندارد همراه با آب و غذای مناسب دردمای ۲۴±۲°c درجه سانتی نگهداری شدند. همه حیوانات در اتاق حیوانات دانشگاه تبریز درون قفس‌های n=6 تایی با رطوبت نسبی و ۱۲ ساعت چرخه نور/تاریکی (نور از ۶:۰۰ تا ۱۸:۰۰ ساعت) نگهداری شدند.

رت‌ها به‌صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم و به مدت چهار ماه مورد تیمار قرار گرفتند. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل روزانه 1ml آب مقطر، گروه دوم به‌عنوان گروه مدل آلزایمر روزانه $AlCl_3$ با دوز ۲۰ mg/kg، گروه سوم به مدت دو ماه $AlCl_3$ و سپس دو ماه دیگر عصاره آبی کندر با دوز ۲۰۰ mg/kg به همراه $AlCl_3$ با همان دوز، گروه چهارم به مدت دو ماه $AlCl_3$ و دو ماه دیگر ریواستیگمین با دوز ۰/۳ mg/kg به همراه $AlCl_3$ با همان دوز دریافت نمودند. تمام تیمارها در ساعت مشخصی از روز (۱۳-۱۱ قبل از ظهر) از طریق گاواژ به رت‌ها خورانده شد.

تست رفتاری ماز آبی موریس

برای سنجش بهبود حافظه فضایی در موش‌های 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 سیاه‌رنگی به قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است که تا عمق ۲۵ سانتی‌متری با آب پر شده است و درواقع این تانک به چهار قطب (شمال، جنوب، شرق، غرب) تقسیم‌بندی گردیده است. سکوی مخفی (Platform) با قطر ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۴ سانتی‌متری در حدود ۱ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز شمال شرقی قرار گرفت و موقعیت سکو در طول هر آزمایش ثابت و دمای آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. آزمایش به مدت ۶ روز متوالی برای تمام گروه‌ها تکرار گردید. در هر کار آزمایی حیوان از یکی از ۴ قطب به‌طور تصادفی و درحالی‌که 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 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 سپری‌شده و مسافت طی شده و سرعت شنا برای ارزیابی عملکرد هر موش در آزمون حافظه مورداستفاده قرار گرفت.

تشریح و جداسازی هیپوکمپ موش‌های صحرایی

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

استخراج RNA از بافت‌های 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 ml ۱ محلول RNX-Plus هموژنیزه شد و مراحل استخراج طبق پروتکل پیشنهادی شرکت اجرا شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده، توسط الکتروفورز و نانودراپ بررسی و غلظت RNA محاسبه شد.

سنتز cDNA و بررسی نیمه کمی بیان ژن *App*

جهت حذف آلودگی‌های احتمالی با DNA، ابتدا تیمار با DNase I انجام شد. بدین منظور، یک میکروگرم RNA، µl ۱ آنزیم DNase I، µl ۱ بافر آنزیم DNase I، µl ۰/۵ مهارکننده آنزیم RNase به یک ویال ۰/۵ میکرولیتری انتقال و با آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) به حجم µl ۱۰ رسانده شد و به مدت ۳۰min در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس µl ۱ 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 درنهایت مقدار µl ۱ از cDNA سنتز شده برای انجام هر واکنش PCR به کار رفت. در این پژوهش از ژن *Gapdh* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای تکثیر ژن *App* از پرایمرهای رفت با توالی
5'-TCCAACCGTGGCATCCT-3 و برگشت
5-TGATGGCGGACTTCGAAG-3 و برای تکثیر Gapdh از پرایمر رفت
5-AACGACCCCTTCATTGACC-3 و برگشت

*Journal of Police Medicine*
Winter 2016; Vol. 4, No. 4: 279-286

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، به‌صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه، ۳۵ چرخه به‌صورت واسرشت سازی ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه ۳۰ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه و درنهایت 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 الکتروفورز شد و شدت باندهای حاصل به‌وسیله نرم‌افزار Imag J بررسی و نسبت شدت باندهای App به‌شدت باندهای Gapdh به‌عنوان شاخص میزان بیان در نظر گرفته شد. شاخص میزان بیان در نمونه‌های آزمایش و کنترل به‌وسیله نرم‌افزار SPSS باهم مقایسه شد. بدین منظور مقدار ارزش $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان آستانه معنی‌داری تفاوت بیان در گروه‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Excel و یا SPSS رسم شدند.

## یافته‌ها

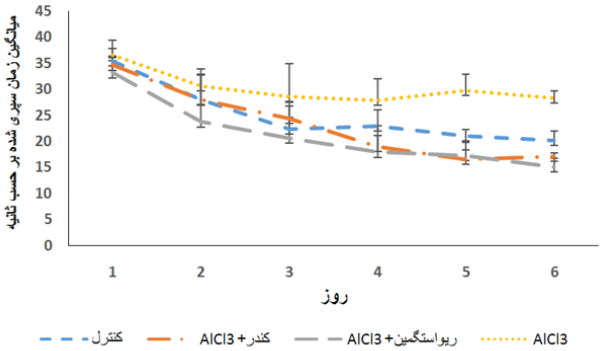
آزمایش ماز آبی موریس

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 سپری‌شده و مسافت طی شده را بین گروه‌ها باهم مقایسه کرد.

بررسی شاخص زمان سپری‌شده

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

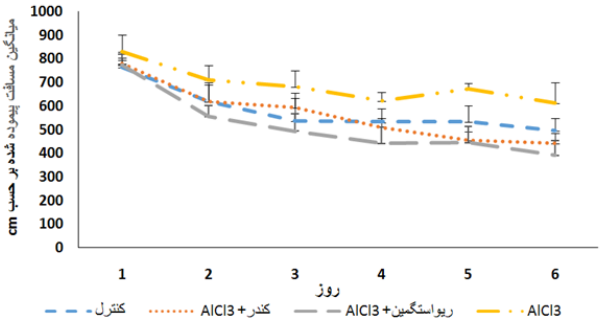



**شکل ۱:** نمودار حاصل از مقایسه شاخص میانگین زمان سپری‌شده در گروه کنترل، مدل آلزایمر ($AlCl_3$)، تیمار با کندر (کندر +$AlCl_3$) و گروه تیمار با ریواستیگمین (ریواستیگمین+$AlCl_3$) در طول شش روز کارآزمایی ماز آبی موریس. داده‌ها به‌صورت Mean±SEM ارائه شده است.

موریس 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 به‌جز گروه مدل آلزایمر (گروه تیمار شده با $AlCl_3$) معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). 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 سپری‌شده در طول شش روز تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل، گروه مدل آلزایمر، گروه تیمار با کندر و نیز گروه تیمار با ریواستیگمین نشان نداد ($p > ۰/۰۵$). علی‌رغم اینکه اختلاف مشاهده‌شده بین گروه مدل آلزایمر با هر سه گروه مذکور معنی‌دار نبود اما این اختلاف در مقایسه با تفاوت مشاهده‌شده 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 سپری‌شده در همه گروه‌ها به‌جز گروه مدل آلزایمر تا روز سوم شدید می‌باشد که نشان از یادگیری نسبی در سه گروه دیگر است. بااین‌وجود، 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.

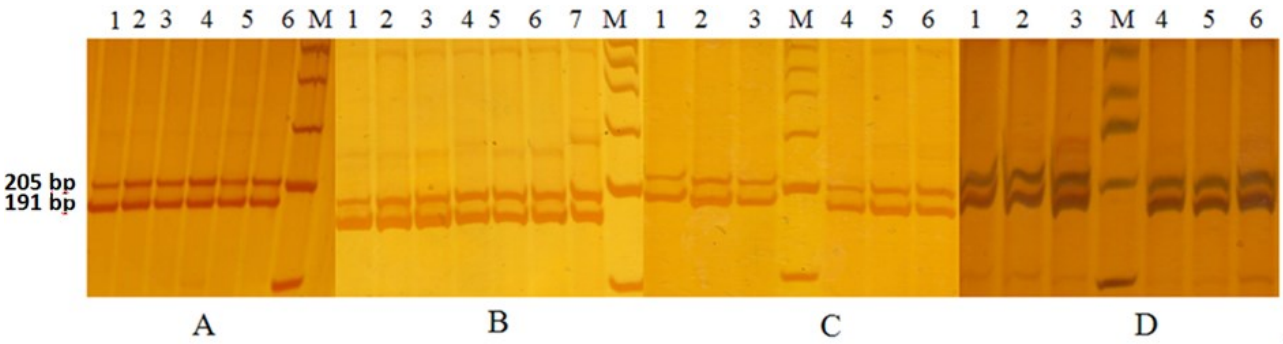
بررسی شاخص مسافت طی شده

شکل ۲، نمودار حاصل از مقایسه داده‌های مربوط به شاخص زمان سپری‌شده در گروه‌های مختلف طی شش روز را در آزمایش ماز آبی موریس 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 به‌جز گروه مدل آلزایمر (گروه تیمار شده با $AlCl_3$) معنی‌دار می‌باشد (




**شکل ۲:** نمودار حاصل از مقایسه شاخص میانگین زمان سپری‌شده 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 موریس. داده‌ها به‌صورت Mean±SEM ارائه شده است.

**مجله طب انتظامی**
زمستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۴- صفحات ۲۸۶-۲۷۹




**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.

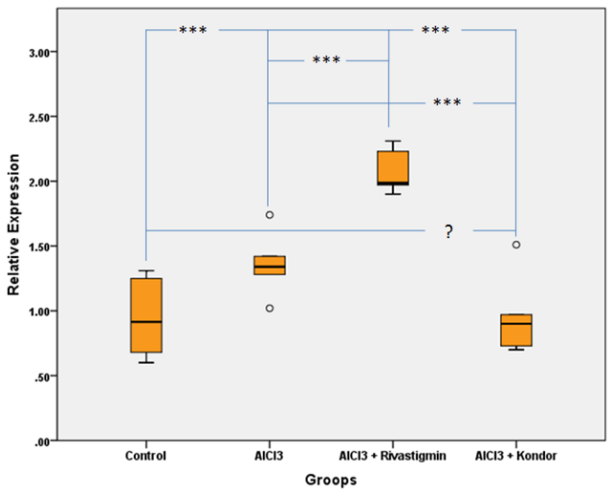
($p < ۰/۰۵$). این یافته تأییدی بر نتایج حاصل از شاخص زمان سپری‌شده می‌باشد که حاکی از وقوع اختلال در یادگیری و حافظه فضایی در گروه مدل آلزایمری در اثر مصرف کلرید آلومینیوم بوده است. مقایسه بین گروهی میانگین مسافت طی شده در طول شش روز تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل، گروه مدل آلزایمر، گروه تیمار با کندر و نیز گروه تیمار با ریواستیگمین نشان نداد ($p > ۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی شاخص مسافت طی شده، نتایج مربوط به شاخص زمان سپری‌شده 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 Imag 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 $p = ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$). درصورتی‌که بیان *App* در گروه تیمار با کندر تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد ($p = ۰/۹۶۴$). 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 $p = ۰/۰۱۱$ و $p < ۰/۰۰۱$) و بالاخره میزان بیان *App* در گروه تیمار با ریواستیگمین نسبت به گروه مدل آلزایمر هم بیشتر بود ($p < ۰/۰۰۱$). نمودار مقایسه بیان نسبی *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 مورداستفاده قرار می‌گیرد [۲۰]. اثرات ضدالتهابی و همچنین تقویت عملکرد حافظه عصاره‌های مختلف کندر توسط پژوهش‌های مختلف مورد تأیید قرار گرفته است [۲۱-۱۴ و ۱۶]. یکی از مهم‌ترین اختلالات مغزی-شناختی که حافظه افراد را تحلیل و از بین می‌برد بیماری آلزایمر می‌باشد. بااین‌وجود




**شکل ٤:** 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 ($p < ۰/۰۵$) بین گروه‌های مربوطه و (؟) نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بیان ($p > ۰/۰۵$) می‌باشد.

*Journal of Police Medicine*
Winter 2016; Vol. 4, No. 4: 279-286

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 مورداستفاده 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 موریس 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 موریس 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 پس‌ازآن شاخص زمان سپری‌شده 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 درصورتی‌که 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 مشاهده‌شده در مورد افزایش بیان *App* در اثر مصرف $AlCl_3$ منطبق با گزارش‌های قبلی [۹ و ۸ و ۶] است. زکی[1] و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که تیمار ۴ الی ۸ هفته‌ای رت‌ها با AlCl3 باعث افزایش بیان ژن‌های *App* و *Bace1* می‌شود. *App* و *Bace1* ازجمله 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[2] و همکارانش، سطح پپتیدهای بتا-آمیلوئید را در رت‌های مدل آلزایمری القاء شده با $AlCl_3$ و D-galactos- توسط وسترن 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 [۲۴ و ۲۳]، 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 [۲۴ و ۲۳] 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 بخشد. 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,



1: Zaky, 2: Zong-Zheng

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 Acetylcholinestrase. 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/apyrimidinic 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 Aβ 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 Agueous 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.