

ارزیابی تاثیر عصاره آبی کندر بر بیان ژن های FMR1 و MAP1B در هیپوکامپ موش صحرایی

آسیه جبلی^۱، محمد خلیج کندی^{۲*}، الهام طالبی نژاد چاوشی^۳، سیدیونس میربیگی^۳

(۱) گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی ریح رشید، تبریز، ایران
(۲) گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۳۰

چکیده

مقدمه: خواص درمانی کندر از دیرباز در طب سنتی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات جدید نشان دهنده تاثیر کندر در تقویت حافظه و پیشگیری/درمان آلزایمر می باشد. FMRP، محصول ژن FMR1، با توسعه ارتباطات بین سلول های عصبی به تشکیل حافظه کمک می کند. MAP1B از mRNA های هدف FMRP بوده و ترجمه آن با تاثیر FMRP مهار می شود. نقص در بیان FMR1 باعث ابتلا به نشانگان X شکننده می شود. بر این اساس، هدف از این تحقیق بررسی تاثیر عصاره آبی کندر در بیان ژن های FMR1 و MAP1B در نمونه های بافت هیپوکامپ موش های صحرایی بود.

مواد و روش ها: ۱۸ راس موش صحرایی به سه گروه شش تایی شامل یک گروه کنترل و دو گروه تیمار با غلظت های ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم عصاره آبی کندر تقسیم شدند. پس از هشت هفته تیمار با عصاره کندر، هیپوکامپ موش ها جداسازی شد. RNA تام از آن استخراج شده و cDNA سنتز شد. سپس بیان ژن های FMR1 و MAP1B توسط real-time PCR بررسی شد.

یافته های پژوهش: غلظت ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم عصاره آبی کندر باعث افزایش بیان FMR1 شد. بیان MAP1B نیز در یک الگوی وابسته به غلظت پس از تیمار با عصاره کندر کاهش نشان داد. با این وجود، این تغییرات از نظر آماری معنادار نمی باشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: FMRP یک تنظیم کننده منفی ترجمه می باشد که با مهار ترجمه mRNA هدف MAP1B انتقال پیام سیناپسی را در نورون ها هدایت می کند. احتمالاً کندر از طریق افزایش بیان FMR1 در سلول های نورونی باعث افزایش انعطاف پذیری سیناپسی و تقویت حافظه می شود. این مطالعه می تواند چشم اندازهای درمانی جدیدی برای استفاده از کندر در درمان مبتلایان به نشانگان X شکننده در آینده بگشاید.

واژه های کلیدی: کندر، حافظه، FMR1، MAP1B

* نویسنده مسئول: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: khalaj@tabrizu.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

ژن FMR1 پروتئینی به نام FMRP تولید می کند که در چندین بافت از جمله مغز، بیضه و تخمدان بیان می شود. در مغز، این پروتئین با تنظیم پایداری و پیرایش متناوب mRNA، انتقال mRNA دندریتی، سنتز پروتئین های پس سیناپسی و پایداری پروتئین های میلین نقش مهمی در توسعه ارتباطات بین سلول های عصبی و تنظیم شکل پذیری سیناپسی بر عهده دارد و از این طریق به شکل گیری حافظه و یادگیری کمک می کند. علاوه بر این، این پروتئین قادر به پیرایش متناوب mRNA خود نیز می باشد. افزایش تکرارهای CGG و به دنبال آن افزایش میتیلاسیون این تکرارها در منطقه 5'-UTR ژن FMR1 منجر به خاموش شدن این ژن و بروز علائم مربوط به نشانگان X شکننده می شود (۷).

میکروتوبول ها یکی از اجزای اسکلت سلولی موجود در سیتوپلاسم همه سلول های یوکاریوتی به ویژه سیستم عصبی می باشد (۸). خانواده پروتئین های همراه میکروتوبول (MAP) نقش حیاتی در تنظیم سرعت پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول ها ایفا می کنند (۹). MAP1B، یکی از اعضای مهم خانواده MAP، بیان بالایی در آکسون های در حال رشد سیستم عصبی مانند نخاع، ساقه مغز، مخچه و مخ داشته و در تجمع میکروتوبول ها دخالت دارند (۱۰). بیان بیش از حد MAP1B علاوه بر رشد نورونی باعث آپوپتوز نورونی نیز می شود. در مقابل، حذف کامل ژن MAP1B منجر به از بین رفتن جسم پینه ای، عامل برقرار کننده ارتباط بین دو نیمکره مغز، می شود (۱۱). MAP1B یکی از mRNA های هدف FMR1 بوده و ترجمه آن با تاثیر FMRP طی دوران تکوین مهار می شود. در غیاب FMRP افزایش میزان پروتئین MAP1B منتهی به دینامیک غیرنرمال در میکروتوبول های نورونی و تغییر در انعطاف پذیری نورون ها می شود (۱۲).

با توجه به اهمیت دو ژن FMR1 و MAP1B در سیستم عصبی و این که تاکنون مطالعه ای در جهت تاثیر کندر بر بیان این دو ژن انجام نشده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر عصاره آبی کندر بر بیان دو ژن FMR1 و MAP1B در نمونه های هیپوکامپ

بیماری های تحلیل عصبی از جمله آلزایمر و کاهش حافظه مرتبط با سن از جمله بیماری های قرن حاضر می باشد که افراد زیادی با آن دست و پنجه نرم می کنند. علت این بیماری ها عوامل ژنتیکی، محیطی و یا ترکیبی از هر دو می باشد که موجب نقص در عملکرد مغز و فرآیند حافظه می شود. حافظه به ذخیره سازی اطلاعات کسب شده و تداوم یادگیری اشاره می کند. در واقع، حافظه نتیجه یادگیری بوده و نشان دهنده تغییرات پایدار در سیستم عصبی می باشد که برگرفته از تجربیات زودگذر است (۱).

صمغ طبیعی کندر از گیاهان متعلق به راسته افرا (Sapindales)، خانواده بورسراسه (Burseraceae) و جنس بوسولیا (Boswellia) به دست می آید و به طور متداول با نام های Olibanum, Frankincense و Salai guggal شناخته می شود. کندر موجود در بازار ایران از دو گونه Boswellia به دست می آید: B. carteri، بومی سواحل دریای سرخ خصوصاً ناحیه شمال شرقی آفریقا می باشد و B. serrata، در مناطق مختلف هندوستان می روید. از دیرباز، کندر در درمان بیماری های مختلف از جمله ناراحتی های تنفسی، گوارشی، درد مفاصل و التهاب مورد استفاده قرار گرفته است (۲). علاوه بر این، در گذشته اعتقاد بر این بود که مصرف کندر در زنان باردار منجر به تقویت حافظه در فرزندان آن ها می شود. مطالعات علمی اخیر تاییدکننده این اعتقاد پیشینیان می باشد. مصرف کندر در دوران بارداری و شیردهی موش های صحرایی باردار، منجر به تقویت حافظه زاده های آن ها می شود (۳). هم چنین تیمار با استات اینسنسول، یکی از ترکیبات با ارزش کندر، باعث محافظت موش ها از آسیب های مغزی می شود (۴). تیمار موش های صحرایی مدل آلزایمر با کندر به طور قابل توجهی علائم مربوط به بیماری آلزایمر را تعدیل می کند (۵). در موش های صحرایی سالم که قبل از تزریق ترکیب القاء کننده آلزایمر، کندر دریافت کرده بودند، علائم مربوط به نقص حافظه فضایی القاء شده با این ترکیب کاهش می یابد. بنا بر این، احتمالاً کندر می تواند باعث پیشگیری ابتلا به بیماری آلزایمر شود (۶).

موش صحرایی نر بالغ انجام شده است.

مواد و روش ها

روش تهیه عصاره آبی کندر: رزین کندر مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت Mother Herbs هندوستان تهیه گردید. عصاره آبی کندر طبق پروتکل مورد استفاده در آزمایش قبلی تهیه شد (۱۳). به این منظور قطعات کندر تا حد ممکن ساییده شده و به صورت پودر در آمدند. ۲۰۰ گرم از پودر حاصل در ۲۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس محلول کندر در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت یافت و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول حاصل با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد و به عنوان محلول اصلی تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. این محلول به صورت خوراکی با عبور سوزن مخصوص تغذیه (Feeding needle) از دهان به داخل مری تزریق گردید.

موش های صحرایی و تیمار آن ها با کندر: برای انجام این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ راس موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با سن تقریبی ۸ هفته و محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از انیستیتو پاستور تهران تهیه شد. حیوانات به طور تصادفی به سه گروه شش تایی تقسیم شده و در دمای 23 ± 3 درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی و ۱۲ ساعت چرخه نور-تاریکی (از ساعت ۶:۰۰ تا ۱۸:۰۰) در قفس هایی از جنس پلی کربنات نگهداری شدند. گروه کنترل یک میلی لیتر آب مقطر، گروه تیمار یک ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه تیمار دو ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره آبی کندر به وسیله گاواژ و روزانه در ساعت خاصی به مدت ۸ هفته دریافت کردند. در طول آزمایش، آب و غذای کافی در اختیار حیوانات قرار گرفت و آزمایش های انجام شده بر روی حیوانات مطابق با اعلامیه اخلاقی هلسینکی و دستورالعمل های کمیته اخلاق دانشکده علوم دانشگاه تبریز صورت گرفت. انتخاب غلظت های مورد استفاده برای تیمار با عصاره آبی کندر بر اساس مطالعات قبلی و آزمایش های انجام شده در گروه ما که برای غلظت های ۵۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم انجام شده است، صورت گرفته است.

جداسازی هیپوکامپ موش های صحرایی: بعد از اتمام دوره تیمار با عصاره آبی کندر، حیوانات گروه های کنترل و تیمار، توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و گزیلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بی هوش شدند. پس از بیهوشی عمیق، سر حیوانات قطع شد و مغز از مجمله خارج گردید. جداسازی هیپوکامپ به طور مجزا بر روی پلیت سرد صورت گرفت و در ازت مایع منجمد شد. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA از بافت های هیپوکامپ و بررسی کمی و کیفی آن: جهت استخراج RNA تام از نمونه های هیپوکامپ از محلول RNX-Plus (شرکت سیناکلون-RN7713C) استفاده شد. ابتدا نمونه های هیپوکامپ در هاون استریل له گردید و به میکروتیوپ های فاقد RNase و دارای یک میلی لیتر محلول RNX-Plus اضافه شد. سپس نمونه بافتی توسط همگن ساز یا سرنگ استریل به مدت ۵ دقیقه همگن شد. ادامه مراحل استخراج طبق دستورالعمل شرکت سازنده اجرا شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن به ترتیب توسط نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید و تا زمان سنتز cDNA در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنتز cDNA و واکنش Real-time PCR جهت حذف آلودگی های احتمالی DNA، ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با یک یونیت آنزیم DNase I تیمار شد. سنتز cDNA از نمونه های RNA تیمار شده توسط کیت سنتز cDNA (شرکت Thermo Scientific-K1621) و پرایمر رندوم هگزامر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. محلول حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

واکنش Real-time PCR به صورت واکنش سه مرحله ای با استفاده از رنگ فلوروسنت سایبر گرین در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و در دستگاه Illumina (San Diego, California, United States) Real-time PCR (2X) انجام شد. به این منظور از کیت cDNA (یکتا تجهیز-YT2551-5)،

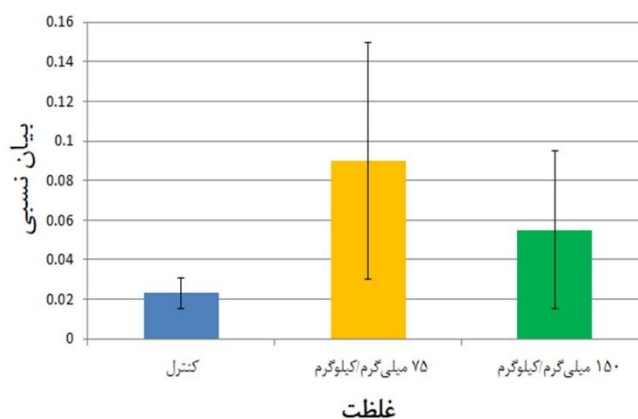
ذوب محصولات PCR صورت گرفت. در نهایت، نتایج حاصل از این واکنش ها با روش $2^{-\Delta CT}$ مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان نسبی به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری: نتایج Real-time PCR با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون T.test student بررسی شدند. $P < 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. رسم نمودارهای مربوط به بیان ژن توسط برنامه Excel صورت گرفت. تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش یافتند.

یافته های پژوهش

عصاره آبی کندر باعث تغییر بیان ژن FMR1 در نمونه های تیمار شده و کنترل شد. پس از تیمار موش های صحرائی با عصاره آبی کندر و تهیه cDNA از نمونه های هیپوکامپ موش ها، میزان بیان نسبی ژن FMR1 مورد بررسی قرار گرفت. عصاره آبی کندر بیان ژن FMR1 را در نمونه های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش داد. این افزایش برای غلظت ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم مشاهده شد (نمودار شماره ۱). ۱ میلی گرم/کیلوگرم مشاهده شد (نمودار شماره ۱). احتمالاً کندر در غلظت بالا تاثیر مهاری دارد. با این وجود، این افزایش از نظر آماری معنادار نبود ($P > 0.05$).

رقیق شده (رقت ۱/۱۰) و آغازگرهای اختصاصی (۱۰ پیکومول) استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم افزارهای Primer 3 و Gene Runner طراحی شد و با استفاده از Blast تایید شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن FMR1 شامل پرایمر پیشرو 5'-ACTGAGAAATGAAGAAGCCAG-3' و پرایمر برگشتی 5'-AAATGTGCAGGTATCCTCATC-3' ژن MAP1B شامل پرایمر پیشرو 5'-GACCGAAGAGCACCTGAGG-3' و پرایمر برگشتی 5'-GCGGAGTGTGCGAGACACG-3' و در نهایت ژن کنترل داخلی Gapdh شامل پرایمر پیشرو CATAGACAAGATGGTGAAGGTCG-3' و پرایمر برگشتی 5'-CCGTGGGTAGAGTCATACTGG-3' می باشد. تمام واکنش ها به صورت تکرار دوتایی انجام شد. برنامه زمانی واکنش Real-time PCR به صورت دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ چرخه برای دناتوراسیون در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۳ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و طولی سازی در ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه اجرا شد. اختصاصی بودن واکنش ها با آنالیز دمای

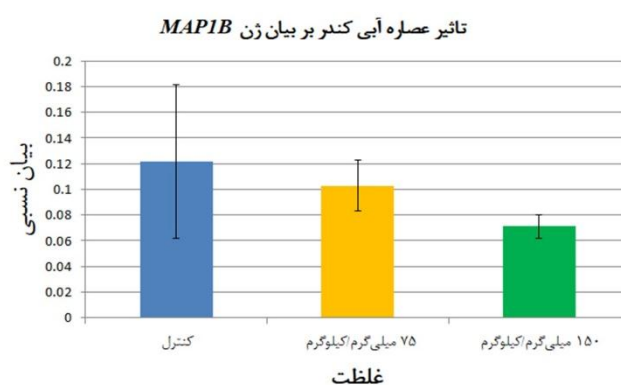
تاثیر عصاره آبی کندر بر بیان ژن FMR1



نمودار شماره ۱. تاثیر عصاره آبی کندر بر بیان ژن FMR1. بیان این ژن در نمونه های تیمار شده با دو غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم عصاره بیشتر از نمونه کنترل مشاهده شد. غلظت بالای عصاره نسبت به غلظت کم ظاهراً اثر مهاری بر بیان ژن FMR1 دارد. با این وجود، تغییرات بیان ژن از نظر آماری معنادار نیست ($P > 0.05$).

در نمونه های کنترل مشاهده شد. علاوه بر این، با افزایش غلظت کندر میزان بیان این ژن کاهش یافت، به طوری که میزان آن در نمونه تیمار شده با غلظت ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم کندر بیشتر از نمونه تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم کندر بود. با این وجود، تغییرات مشاهده شده در میزان بیان ژن MAP1B در نمونه های کنترل و تیمار شده از نظر آماری معنادار نمی باشد ($P>0.05$).

ژن MAP1B پس از تیمار با عصاره آبی کندر کاهش بیان نشان داد. مشابه با ژن FMR1، مراحل آماده سازی برای انجام واکنش Real-time PCR برای ژن MAP1B انجام شد. نتایج Real-time PCR نمونه های کنترل و نمونه های تیمار شده با دو غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم/کیلوگرم کندر در نمودار شماره ۲ قابل مشاهده می باشد. مقایسه این نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان بیان ژن MAP1B



نمودار شماره ۲. مقایسه نتایج مربوط به بیان ژن MAP1B در نمونه های کنترل و تیمار شده با عصاره آبی کندر. اگر چه تغییرات مشاهده شده در بیان ژن MAP1B بین نمونه های کنترل و تیمار شده از نظر آماری معنادار نمی باشد ($P>0.05$); ولی بیشترین میزان بیان این ژن در نمونه کنترل مشاهده شد. علاوه بر این، با افزایش میزان غلظت عصاره کندر، بیان ژن MAP1B کاهش نشان داد.

بحث و نتیجه گیری

بررسی سمیت کندر در حیوانات مختلف نشان دهنده عدم بروز اثرات پاتولوژیک، هماتولوژیک و ژنوتوکسیک معنی دار کندر تا دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/کیلوگرم می باشد (۱۶). دوز کشندگی حاد برای کندر بالای ۲ گرم/کیلوگرم گزارش شده است. عوارض جانبی آن در انسان بسیار کم و قابل چشم پوشی است و صرفاً در موارد محدودی تهوع، رفلاکس و اختلالات گوارشی گزارش شده است. در مورد این ماده هیچ تداخل دارویی جدی با سایر داروها گزارش نشده است (۱۷).

مطالعه حاضر برای اولین بار مکانیسم مولکولی تاثیر کندر در دو ژن درگیر در انعطاف سیناپسی و تقویت حافظه، FMR1 و MAP1B، را مورد بررسی قرار داده است. نتایج حاصل از این مطالعه در راستای مطالعه های مولکولی قبلی می باشد که در آن ها تاثیر

مطالعات فیزیولوژیکی متعدد نشان دهنده تاثیر مثبت کندر بر تقویت حافظه در مدل های حیوانی می باشد. صادقی و همکاران (۱۳) با استفاده از آزمایش ماز آبی موریس نشان دادند مصرف عصاره آبی کندر به مدت دو ماه، می تواند باعث تقویت حافظه فضایی موش های صحرایی شود. ممانعت از کاهش شدید حافظه در موش های صحرایی بالغ مبتلا به کم کاری تیروئید در اثر مصرف عصاره الکلی کندر و افزایش شاخه دار شدن آکسونی و پلیمریزاسیون توبولی در سلول های هیپوکمپ زاده ها به دنبال مصرف بتا بوسیلیک اسید، یکی دیگر از اجزای اصلی کندر، توسط موش های بارداری یکی دیگر از تاثیرات مثبت گزارش شده کندر می باشد (۱۴، ۱۵). مطالعات انجام شده جهت

کندر یا ماده موثره آن در تنظیم بیان چند ژن مهم حافظه از جمله Bdnf، App، Camk4، Camk2، CREB1 و CREB2 بررسی شد. تیمار موش های صحرائی با عصاره آبی کندر و استات اینسنسول به طور قابل توجهی بیان ژن Bdnf را افزایش داد (۱۸،۱۹). علاوه بر این، کندر توانست افزایش بیان مشاهده شده در ژن App را که با اثر AIC13 در موش های مدل آلزایمری القاء شده بود، خنثی کرده و تقریباً تا سطح بیان App در گروه کنترل کاهش دهد (۲۰). بیان ژن های Camk4 و Camk2 نیز با تاثیر عصاره آبی و اتانولی کندر در رده های سلولی مدل سیستم عصبی افزایش معناداری نشان داد (۲۱-۲۳). BDNF عضوی از خانواده فاکتورهای نوتروفیک و زیرمجموعه ای از مسیر انتقال پیام وابسته به CaMKIV می باشد. این دو پروتئین با مشارکت در انتقال و شکل پذیری سیناپسی نقش مهمی در تشکیل حافظه و یادگیری دارند (۲۴، ۲۵). ایزوفرم های مختلف ژن App نیز با بیان در سیستم عصبی در رشد نورونی، انتقال پیام و ایجاد سیناپس نقش مهمی ایفا می کنند، به طوری که به هم خوردن تنظیم آن منجر به بیماری آلزایمر می شود (۲۶). علاوه بر این، عصاره الکلی کندر و ماده موثر آن بتابوسولیک اسید باعث تنظیم بیان دو ژن مهم حافظه CREB1 و CREB2 شدند (۲۷). یکی دیگر از مسیرهای انتقال پیام مهم در مغز با استفاده از FMR1 و MAP1B می باشد که تاکنون مطالعه ای مبنی بر تاثیر کندر در تنظیم بیان ژن های این مسیر صورت نگرفته است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره آبی کندر، به خصوص در غلظت پایین، قادر به افزایش بیان ژن FMR1 و کاهش بیان MAP1B در موش های صحرائی می باشد. با این وجود، نتایج این مطالعه از نظر آماری معنادار نیست. FMRP یک پروتئین سیتوپلاسمی متصل شونده به RNA می باشد و تخمین زده شده است که به چهار درصد mRNA های مغز متصل می شود. پروتئین FMRP پس از ترجمه در سیتوپلاسم وارد هسته شده و در هسته با اتصال به mRNA و پروتئین های ویژه کمپلکس mRNA-FMRP تشکیل می دهد. سپس این کمپلکس از هسته وارد سیتوپلاسم شده و در آن جا

مانع ترجمه mRNA ها با ریبوزوم می شود. ژن های هدف این پروتئین در انتقال پیام سیناپسی نقش دارند. بنا بر این FMRP به عنوان یک تنظیم کننده منفی ترجمه با تسخیر mRNA های هدف نظیر MAP1B مانع ترجمه آن ها شده و سنتز موضعی پروتئین ها در محل سیناپس ها را تنظیم می کند (۱۲). علاوه بر این، FMRP با تعدادی از miRNA ها نیز میان کنش برقرار می کند. این miRNA ها با همکاری کمپلکس RISC ترجمه ژن های هدف FMRP را تنظیم می کنند (۲۸). مشخص شده است که اختلال در ژن FMR1 باعث ابتلا به نشانگان X شکننده، شایع ترین عقب ماندگی ذهنی ارثی و دومین بیماری ژنتیکی پس از تریزومی ۲۱، می شود. افزایش تعداد تکرارهای CGG تا بیش از ۲۰۰ تکرار در ناحیه پروموتور ژن FMR1 و متیلاسیون این تکرارها مکانیسم اصلی غیر فعال شدن این ژن می باشد. در افراد طبیعی، در نشانگان X شکننده، نقص در عملکرد مهار پروتئین FMRP منجر به افزایش بیان و سنتز بی رویه پروتئین MAP1B شده، در نتیجه طویل شدن دندریت ها منجر به ظهور ساختارهای نابالغ می گردد. به عبارت دیگر فقدان مکانیسم خودتنظیمی منفی هدایت شده توسط FMRP در این بیماران منجر به بروز علائم بیماری می شود (۲۹).

با توجه به تاثیر مثبت کندر در تنظیم بیان ژن FMR1 و ژن هدف آن، MAP1B، به نظر می رسد کندر از طریق مسیر مربوط به FMRP قادر به تنظیم بیان ژن های مختلف این مسیر باشد. احتمالاً کندر از طریق افزایش بیان ژن FMR1 و در نتیجه افزایش غلظت FMRP در سلول های نورونی باعث افزایش انعطاف پذیری سیناپسی و نهایتاً تقویت حافظه می شود. این مطالعه در تایید نتایج حاصل از مطالعات قبلی نشان دهنده تاثیرات مثبت کندر بر روند تکامل مغز و احتمالاً شکل گیری مناسب شاخه های دندریتی و اکسون و نیز برقراری ارتباطات صحیح بین آن ها می باشد و دریچه جدیدی برای بررسی تاثیر درمانی کندر در افراد مبتلا به نشانگان X شکننده می گشاید. با این وجود به مطالعات تکمیلی بیشتری به ویژه در مدل های حیوانی مربوط به نشانگان X شکننده نیاز

می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز و دانشکده علوم طبیعی که امکانات این

پژوهش را فراهم کردند، قدردانی می کنند. این پژوهش دارای تاییدیه اخلاقی IR.TBZMED.REC.1396.1000 با کد می باشد.

References

1. Wood R, Baxter P, Belpaeme T. A review of long term memory in natural and synthetic systems. *Adap Behavior* 2012;20:81-103. doi: 10.1177/1059712311421219
2. Lemenith M, Teketay D. Frankincense and myrrh resources of Ethiopia II Medicinal and industrial uses. *Ethiopian J Sci* 2003;26:161-72. doi: 10.4314/sinet.v26i2.18213.
3. Mohammad Hs, Ebrahim E. [The effects of maternal administration of boswellia gum resin frankincense during lactation on stereological parameters of Rat Hippocampus]. *IUMS* 2012;29:198-207. (Persian)
4. Moussaieff A, Yu J, Zhu H, Gattonicelli S, Shohami E, Kindy MS. Protective effects of incense acetate on cerebral ischemic injury. *Brain Res* 2012;1443:89-97. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.001
5. Yassin N, Elshenawy S, Mahdy KA, Gouda N, Marrie A, Farrag A, et al. Effect of boswellia serrata on Alzheimers disease induced in Rats. *J Arab Soc Med Res* 2013;8:1-11. doi: 10.7123/01.JASMR.0000429323.25743.cc
6. Estelami N, Khalajkondori M, Sheikhzadehhesari F, Hosseinpourfeizi M. Aqueous extract of frankincense impedes aluminum chloride induced memory impairment in adult male Rats. *J Physiol Pharmacol Adv* 2016;6:839-45. doi: 10.5455/jppa.20160211060059
7. Sitzmann AF, Hagelstrom RT, Tassone F. Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: A review. *Am J Med Gene* 2018;176:11-18. doi: 10.1002/ajmg.a.38504.
8. Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the neuronal microtubule cytoskeleton. *Neuron* 2015;87:492-506. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.046.
9. Marchisella F, Coffey ET, Hollos P. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* 2016;73:596-611. doi: 10.1002/cm.21300.
10. Tortosa E, Galjart N, Avila J, Sayas CL. MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J* 2013;32:1293-306. doi: 10.1038/emboj.2013.76.
11. Satoyoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N. Microtubule-associated protein 1B: molecular structure localization and phosphorylation dependent expression in developing neurons. *Neuron* 1989;3:229-38. doi: 10.1016/0896-6273(89)90036-6
12. Dolen G, Carpenter RL, Ocain TD, Bear MF. Mechanism based approaches to treating fragile X. *Pharmacol Therap* 2010;1: 27-93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.02.008.
13. Sadeghi F, Khalajkondori M, Hosseinpourfeizi M, Shaikhzadehhesari F. [The effect of aqueous extract of boswellia on spatial learning and memory in adult male Rats]. *J Zanjan Uni Med Sci* 2014;22:131-22. (Persian)
14. Hosseini M, Hadjzadeh MAR, Derakhshan M, Havakhah S, Rassouli FB, Rakhshandeh H, et al. The beneficial effects of olibanum on memory deficit induced by hypothyroidism in adult Rats tested in Morris water maze. *Arch Pharm Res* 2010;33:463-68. doi: 10.1007/s12272-010-0317-z.
15. Karima O, Riazi G, Yousefi R, Movahedi AAM. The enhancement effect

- of beta-boswellic acid on hippocampal neurites outgrowth and branching an in vitro study. *Neurol Sci* 2010;31:315-20. doi: 10.1007/s10072-010-0220-x
- 16.Sharma ML, Kaul A, Khajuria A, Singh S. Immunomodulatory activity of boswellic acids pentacyclic triterpene acids from *boswellia serrata*. *Phytotherap Res*1996;10:107-12. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573
- 17.Singh GB, Atal CK. Pharmacology of an extract of salai guggal ex *boswellia serrata* a new non steroidal anti inflammatory agent. *Age Ac* 1986;18:407-12.
- 18.Khalajkondori M, Sadeghi F, Hosseinpourfeizi MA, Shaikhzadehhesari F, Nakhband A. *Boswellia serrata* gum resin aqueous extract upregulates BDNF but not CREB expression in adult male Rat hippocampus. *Turk J Med Sci* 2016;46:1573-78. doi: 10.3906/sag-1503-43.
- 19.Moussaieff A, Gross M, Nesher E, Tikhonov T, Yadid G, Pinhasov A. Incense acetate reduces depressive like behavior and modulates hippocampal BDNF and CRF expression of submissive animals. *J Psychopharmacol* 2012;26:1584-93. doi: 10.1177/0269881112458729.
- 20.Khalajkondori M, Amiri S, Hosseinpourfeizi MA. [Comparing the effects of rivastigmin and aqueous extract of Olibanum on gene expression of amyloid precursor protein in Rats treated with aluminum chloride]. *J Pol Med* 2016;4:279-86. (Persian)
- 21.Jebelli A, Khalajkondori M, Bonyadi M, Hosseinpourfeizi MA, Rahmatiyamchi M. [Aqueous extract of Frankincense increases the expression of Camk4 gene in PC12 and B65 cell lines]. *Koomesh J* 2018;20:161-68. (Persian)
- 22.Jebelli A, Khalajkondori M, Bonyadi M, Hosseinpourfeizi MA, Rahmatiyamchi M. [Investigating quantitative analysis of the gene expression of calcium calmodulin dependent protein kinase IV by the effect of Olibanum alcoholic extract in PC12 cell line]. *J Fasa Uni Med Sci* 2018;8:93:48-8. (Persian)
- 23.Jebelli A, Khalajkondori M, Bonyadi M, Hosseinpourfeizi MA, Rahmatiyamchi M. [Effect of the ethanolic extract of Olibanum on the expression of CaMKII α gene in B65 and PC12 cells]. *J Mazandaran Uni Med Sci*2019;28:169-74. (Persian)
- 24.Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Reviews BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 2008;14:147-56. doi: 10.1177/1073858407305850.
- 25.Shieh PB, Ghosh A. Molecular mechanisms underlying activity dependent regulation of BDNF expression. *J Neurobiol*1999;41:127-34.
- 26.Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimers disease. *Mole Brain* 2011;4:3. doi: 10.1186/1756-6606-4-3.
- 27.Jebelli A, Khalajkondori M, Bonyadi M, Hosseinpourfeizi M, Rahmatiyamchi M. Beta boswellic acid and ethanolic extract of Olibanum regulate the expression levels of CREB-1 and CREB-2 genes. *Iranian J Pharmaceut Res* 2019;18:877-86. doi: 10.22037/ijpr.2019.1100665.
- 28.Sethna F, Moon C, Wang H. From FMRP function to potential therapies for fragile x syndrome. *Neurochem Res* 2014;39:1016-31. doi: 10.1007/s11064-013-1229-3.
- 29.Dockendorff TC, Labrador M. The fragile x protein and genome function. *Mole Neurobiol*2018;1:711-21. doi: 10.1007/s12035-018-1122-9.

Evaluation of the Effect of Aqueous Extract of Olibanum on the Expression of FMR1 and MAP1B Genes in the Rat Hippocampus

Jebelli A¹, Khalajkondori M^{2*}, Talebinejadchavoshi E³, Mirbeygi Y³

(Received: June 20, 2018

Accepted: September 24, 2018)

Abstract

Introduction: The therapeutic properties of Olibanum have been considered in traditional medicine since ages past. Recent studies indicated the effect of Olibanum on memory enhancement and prevention/treatment of Alzheimer's disease. Fragile X mental retardation protein is the product of the FMR1 gene that mediates memory formation through the development of communications between nerve cells. MAP1B is the FMRP target mRNA and its translation is inhibited by the effect of FMRP. Disturbance in the expression of FMR1 causes fragile X syndrome. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of aqueous extract of Olibanum on the expression of FMR1 and MAP1B genes in hippocampal tissue samples of rats.

Materials & Methods: This study was conducted on 18 rats which were divided into groups of control (n=6) and two treatment groups with 75 (n=6) and 150 mg/kg (n=6) concentrations of aqueous extract of Olibanum. The hippocampus of rats was isolated after eight weeks of treatment by Olibanum extract. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized

in this study. Subsequently, the expression of FMR1 and MAP1B genes was evaluated by a real-time polymerase chain reaction. *Ethics code:* IR.TBZMED.REC.1396.1000

Findings: According to the results, the aqueous extract of Olibanum at a concentration of 75 mg/kg increased the expression of FMR1. In addition, MAP1B gene expression decreased in a dose-dependent manner following treatment with Olibanum extract. However, these changes are not statistically significant (P>0.05).

Discussion & Conclusions: The FMRP is a negative translation regulator that mediates synaptic neuronal transmission through inhibition translation of target mRNA, such as MAP1B. Olibanum probably leads to synaptic flexibility and memory improvement through increasing the expression of FMR1 in neuronal cells. This study could pave the way on the use of Olibanum in the treatment of patients with fragile X syndrome in the future.

Keywords: FMR1, MAP1B, Memory, Olibanum

1. Dept of Biology, Higher Education Institute of Rab-Rashid, Tabriz, Iran

2. Dept of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author Email: khalaj@tabrizu.ac.ir