

بررسی اثر بتائین براختلال حافظه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مدل آلزایمری ناشی

از تزریق درون هیپوکمپی پروتئین آمیلوئید بتا

فاطمه علیپور فرد^۱، هومن شجیعی^{۲*}، فرزانه نظری سرنجه^۳، ویدا حجتی^۴، مسعود علیرضایی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

چکیده

مطالعات نشان می دهد که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد. بتائین دارای خواص پاداکسایشی و محافظت نوروئی است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر بتائین بر نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا (A β) به درون هیپوکمپ و ارزیابی فعالیت آنزیم پاداکسایشی (اندوژنی) سوپراکسید دیسموتاز است. در این تحقیق تجربی ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد ویستار به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه شاهد، گروه آلزایمری القاء شده با پروتئین آمیلوئید بتا، و گروه های آلزایمری دریافت کننده مقادیر مختلف بتائین (۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) تقسیم شدند. یک هفته پس از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا، ارزیابی حافظه با استفاده از روش یادگیری اجتنابی غیر فعال انجام شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز به روش شیمیایی اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد، تزریق آمیلوئید بتا میزان به یادآوری حافظه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. تزریق بتائین در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن، اثر ناشی از تزریق آمیلوئید بتا را مهار و سبب بهبود حافظه و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد که نشان دهنده کاهش اثر استرس اکسیداتیو است این مطالعه نشان می دهد که بتائین، با کاهش استرس اکسیداتیو می تواند سبب بهبود حافظه در موش های آلزایمری القایی گردد.

واژه های کلیدی: آلزایمر، بتائین، یادگیری اجتنابی غیر فعال، سوپراکسید دیسموتاز

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

* (نویسنده مسئول: drhshajee@gmail.com)

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۵- دانشیار، بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

مقدمه

بیماری آلزایمر، یک بیماری تحلیل برنده عصبی پیشرونده است که با از دست دادن حافظه، تغییرات شخصیتی، افسردگی، اضطراب و سایر اختلالات ذهنی همراه است. (Zhangetal,2012) تجمع و رسوب پروتئین آمیلوئید بتا در پلاک های آمیلوئیدی خارج سلولی و هیپرفسفریله شدن پروتئین تائو در داخل نورون ها بویژه در نواحی دخیل در یادگیری و حافظه مانند هیپوکمپ از عوامل اصلی تخریب نورونی و بروز بیماری آلزایمر شناخته می شوند (Wojsiatetal, 2018). علاوه بر این دو عامل اصلی، فاکتورهای پاتو فیزیولوژیکی دیگری همانند اختلال عملکردی میتوکندری، التهاب، تخریب اکسایشی، اختلال چرخه سلولی و اختلال در انتقال سلولی هم در شروع و پیشرفت بیماری موثرند (Zhu et al.,2013).

استرس اکسیداتیو که ناشی از برهم خوردن تعادل بین انواع فعال اکسیژن و خنثی شدن آنها توسط آنزیم های پاداکسایشی است، از جمله سازوکار های مهم در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر است. (Wojsiat et al., 2018; Huang et al., 2016) انواع فعال اکسیژن عمدتاً در میتوکندری سلول ها و در طی فرآیند فسفریلاسیون اکسایشی تولید می شوند. افزایش تولید انواع فعال اکسیژن و کاهش قدرت دفاعی پاداکساینده ها سبب اختلال در متابولیسم سلولی و اختلال در هومئوستازی کلسیم شده و در نهایت فعالیت و انتقال سیناپسی را تحت تاثیر قرار داده و سبب بروز اختلالات شناختی می گردد (Tonnie & Trushina, 2017). استرس اکسیداتیو، همچنین سبب اختلال در پردازش پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا شده و سبب افزایش تولید پروتئین آمیلوئید بتا می گردد (Cai et al., 2011). در شرایط طبیعی، ترکیبات پاداکساینده مانند گلوکاتایون، کاروتنوئیدها و ویتامین E و نیز آنزیم های پاداکساینده مانند سوپراکسید دیسمو تاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز میزان رادیکال آزاد در سلول را کنترل می کنند و مانع آسیب به ساختارهای سلولی می شوند (Su et al., 2008). سوپر اکسید دیسموتاز که اولین بار توسط مانا در سال ۱۹۳۸ خالص سازی شد (Das et al.,2005) با خنثی کردن یون سوپر اکسید در جلوگیری از استرس موثر است این آنزیم در یوکاریوت ها دارای دو فرم سیتوپلاسمی و میتوکندریایی است و اولین خط دفاعی در مقابل سمیت اکسیژن محسوب می شود و سوپر اکسید را که فراوان ترین رادیکال آزاد می باشد را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن کاتالیز می کند و سپس این پراکسید هیدروژن توسط کاتالاز یا گلوکاتایون پراکسیداز به آب تبدیل می شود. (Singh et al.,2010).

امروزه با توجه به نقش شناخته شده استرس اکسیداتیو در شروع و پیشرفت بیماری آلزایمر استفاده از ترکیبات دارای خواص پاداکساینده و حفاظت نورونی جهت پیشگیری یا درمان مورد توجه قرار گرفته است. بتائین یا تری متیل گلیسین، یک ماده آلی است و ویژگی های آنتی اکسیدانی آن به طور گسترده شناخته شده است (Craig, 2004). بتائین بر روی میزان فعالیت آنزیم های پاداکساینده اثر گذاشته و سبب بهبود استرس اکسیداتیو ناشی از داروهایی مانند لوودوپا و بنسرازید

می‌گردد (Alirezaei *et al.*, 2015). این ترکیب به عنوان اسمولیت سلول‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را در شرایط استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. بتائین همچنین به عنوان یک دهنده متیل در متیلاسیون هموسیستئین و تبدیل آن به متیونین نقش دارد که توسط آنزیم بتائین-هموسیستئین متیل ترانسفراز کاتالیز می‌شود (Ho *et al.*, 2002). تجمع هموسیستئین سبب القاء استرس اکسیداتیو، تجمع آمیلوئید بتا، هیپرفسفریلاسیون پروتئین تائو و القاء آلزایمر می‌شود (Zhang *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2016). مطالعات قبلی اثر بتائین بر فرآیند حافظه را تأیید نموده است. در این رابطه نشان داده شده است که بتائین سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از تزریق هموسیستئین و لیپوپولی ساکاریدها می‌شود (Chai *et al.*, 2013; Miwa *et al.*, 2011). با این وجود تاکنون اثرات آنتی‌اکسیدان بتائین بر استرس اکسیداتیو که در بیماری آلزایمر اتفاق می‌افتد به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا با توجه به خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی بتائین و نیز با توجه به اهمیت فرآیندهای التهاب و استرس اکسیداتیو در بروز و پیشرفت بیماری آلزایمر، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر بتائین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و بهبود حافظه در موش‌های القایی آلزایمری در مدل یادگیری اجتنابی است.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوانات

ابتدا 40 سر موش نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 20 گرم و سن تقریبی ۱۰ هفته از مرکز حیوانات دانشکده علوم پزشکی شیراز خریداری گردید. حیوانات به ۵ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند گروه شاهد: یک میلی لیتر آب مقطر را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی و با استفاده از گاواژ قبل از تزریق داخل هیپوکمپی سالین (حلال آمیلوئیدبتا) دریافت نمودند. بر اساس مطالعه Miwa و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر تزریق بتائین به تنهایی بر روی حافظه مشابه با گروه کنترل است (Miwa *et al.*, 2011) گروه آلزایمری القایی: یک میلی لیتر آب مقطر را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی و با استفاده از گاواژ قبل از تزریق داخل هیپوکمپی آمیلوئید بتا دریافت نمودند. گروه‌های آلزایمری دریافت کننده بتائین: سه گروه از حیوانات مقادیر مختلف بتائین (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به مدت ۱۴ روز قبل از تزریق داخل هیپوکمپی آمیلوئیدبتا دریافت نمودند. مقادیر بتائین بر اساس مطالعات قبلی و نیز پاسخ دوزی - دارویی انتخاب شد (Chai *et al.*, 2013).

القاء آلزایمر در موش های آزمایشگاهی

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن) بیهوش و در دستگاه استرئوتاکسی قرار گرفتند. مختصات ناحیه CA1 بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون به دست آمد: ۳/۸- میلی متر از برگما به سمت عقب، $\pm 1/8$ میلی متر از طرفین شکاف سائیتال و ۲/۲ میلی متر به طرف پایین از سطح از مجمه (Paxinos & Watson, 2007). بعد از مشخص نمودن محل های کانول گذاری، حیوانات در ناحیه هیپوکامپ پشتی کانول گذاری شدند و آمیلوئید بتا به صورت دو طرفه و با استفاده از سرنگ همیتلون تزریق شد. حیوانات ۷ روز دوره بهبودی را سپری کرده و سپس حافظه و یادگیری آن ها به روش یادگیری اجتنابی غیرفعال ارزیابی شد.

مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال

یک هفته پس از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا به درون ناحیه هیپوکامپ حیوانات وارد آزمون رفتاری شدند. جهت ارزیابی حافظه از مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال استفاده شد. دستگاه یادگیری اجتنابی غیر فعال از دو قسمت تاریک و روشن تشکیل شده است و بررسی حافظه در آن طی دو مرحله و در دو روز متوالی انجام می شود.

در روز اول و در مرحله سازش، حیوان به آرامی درون قسمت روشن دستگاه قرار می گیرد و به آن اجازه داده می شود به مدت ۵ ثانیه در این قسمت بماند تا با آن آشنا شود بعد از گذشت ۵ ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز می شود و به حیوان اجازه داده می شود تا وارد قسمت تاریک شود حیواناتی که ورود آن ها به قسمت سیاه بیش تر از ۱۰۰ ثانیه طول می کشید، از ادامه آزمایش حذف می شدند. پس از ۳۰ دقیقه مرحله آموزش انجام می شد. در این مرحله حیوان در بخش روشن دستگاه قرار می گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز و مدت زمانی که طول می کشید تا حیوان وارد بخش تاریک دستگاه شود، ثبت می شد. به محض ورود حیوان به قسمت تاریک، درب گیوتینی بسته شده و به کف پای حیوان شوک وارد می شد. پس از ۲۰ ثانیه حیوان از دستگاه خارج شده و پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله فوق تکرار می شد. چنانچه حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه به قسمت تاریک وارد می شد، برای بار دوم شوک دریافت می کرد، در غیر این صورت آموزش موفق برایش ثبت می شد. حداکثر دفعات آموزش سه مرتبه انجام می شد (Nazari-Serenjeh *et al*, 2019)

۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش حیوانات وارد مرحله آزمون می شدند. در این مرحله ابتدا حیوان را در قسمت روشن دستگاه قرار داده و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز می شد. مدت زمانی که طول می کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک دستگاه شود زمان تاخیر یا (Step-Through Latency) STL نام داشت و به عنوان معیاری برای اندازه گیری میزان حافظه ثبت می شد. بیش ترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می شد.

سنجش سوپر اکساید دیسموتاز

پس از پایان آزمون رفتاری، ناحیه هیپو کامپ استخراج و با استفاده از بافر فسفات ۱/ مولار شستشو داده شد و با استفاده از ازت مایع هموژنیزه گردید. بافت هموژنیزه شده را درون میکروتیوب ریخته و با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در دمای 70 درجه نگهداری شد. محلول بیرونی با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. (Alirezaei, 2011) فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز بر اساس دستور العمل سازنده کیت (Kiazist, life science, Iran) اندازه گیری شد. یک واحد از سوپر اکساید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که موجب مهار ۵۰ درصد از واکنش احیا (۲-۴-یدوفینیل) (۳-۴-نیتروفنیل) (۵-فنیل تترازولیوم کلراید) تحت شرایط آزمایش گردد ارزیابی فعالیت با دستگاه اسپکتروفوتومتری در مقابل بلانک در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت و به صورت واحد در میلی گرم پروتئین بافت بیان گردید (Alirezaei, 2012).

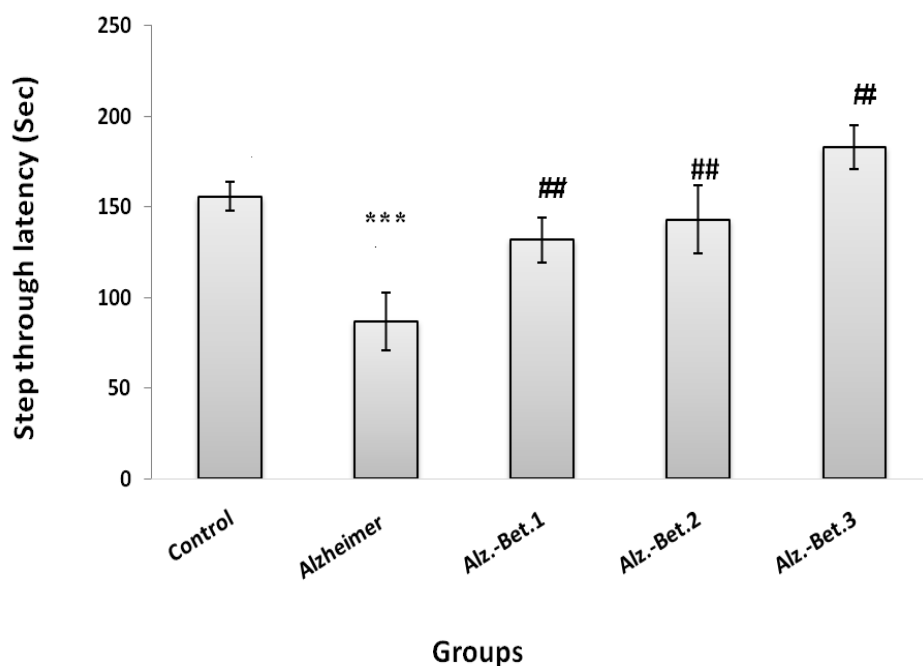
آنالیز آماری داده ها

به منظور تحلیل آماری، همه متغیرها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با هم مقایسه شدند و در صورت معنی دار بودن تفاوت ها از آزمون Tukey برای مقایسه جفت گروه ها استفاده گردید. تمام آنالیزها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر بتائین بر اختلال حافظه ناشی از تزریق آمیلوئید بتا به درون ناحیه هیپوکمپ پستی

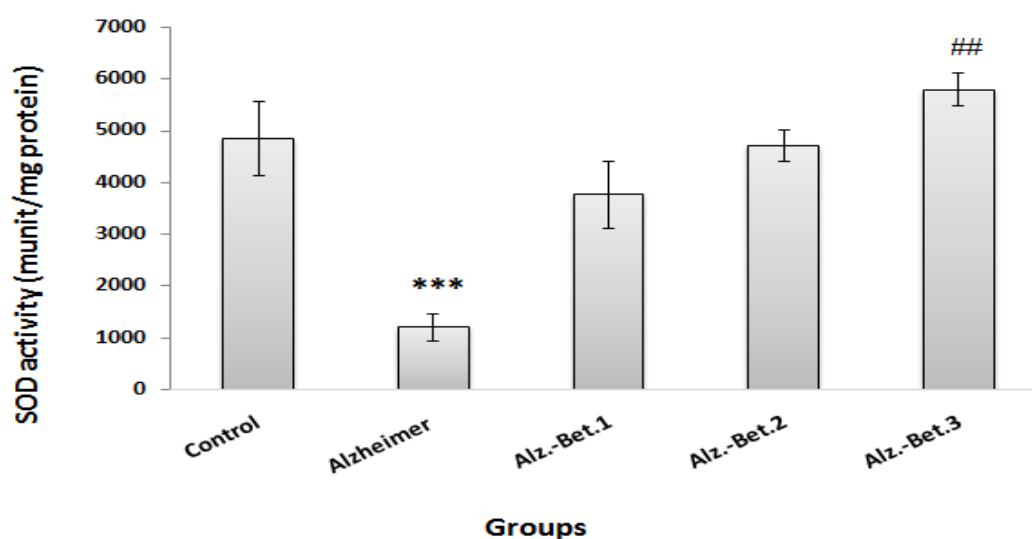
همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است در این مطالعه تزریق یک میکرولیتر از پروتئین آمیلوئید بتا در دوز ۵ میکروگرم در میکرولیتر به درون ناحیه هیپوکمپ پستی به صورت معنی داری سبب کاهش زمان ورود به اتاق تاریک در مقایسه با گروه کنترل شده است که بیانگر کاهش حافظه است ($P < 0.001$) همچنین درمان با بتائین در مقادیر استفاده شده (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) زمان ورود به اتاق تاریک را به صورت معنی دار در گروه های آلزایمری دریافت کننده بتائین در مقایسه با گروه القایی آلزایمر افزایش داده است ($P < 0.01$)



شکل ۱: اثرات درمان با بتائین بر حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیر فعال. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است ($P < 0.001$) *** تفاوت آماری بین گروه آلزایمر القایی و کنترل را نشان می دهد و ($P < 0.1$) ## تفاوت آماری بین گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین و گروه آلزایمر القایی را نشان می دهد. **Alz-Bet.1** (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) **Alz-Bet.2** (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) **Alz-Bet.3** (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) می باشد

اثر بتائین بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به طور معنی داری در موش های دریافت کننده آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.001$) همچنین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در موش های درمان شده با بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه آلزایمر القایی به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.001$)



شکل ۲: اثرات درمان با بتائین بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است ($P < 0.001$) * * * تفاوت آماری بین گروه آلزایمر القایی و کنترل را نشان می دهد. و ($P < 0.01$) ## تفاوت بین گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر وزن بدن) و گروه آلزایمر القایی را نشان می دهد. Alz-Bet.1 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.2 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.3 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) می باشد.

بحث

شواهد متعدد نشان می دهد استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر دارد به طوری که نشانگرهای آسیب اکسایشی در مغز افراد مبتلا به آلزایمر افزایش می یابد (Chang, *et al.*, 2014). بنابراین کاهش استرس اکسیداتیو، می تواند به عنوان یک هدف مناسب جهت درمان و پیشگیری از بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان داد، در مغز حیوانات مبتلا به آلزایمر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش می یابد و بتائین به عنوان یک ماده پاداکساینده، سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و بهبود نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا شده است. بیشترین اثر پاداکساینده بتائین در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد.

Wang در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای به بررسی مطالعات انجام شده در زمینه درمان بیماری آلزایمر با آنتی اکسیدان ها پرداخت. این محقق گزارش کرد که استرس اکسیداتیو نه تنها شدیداً در مراحل اولیه بیماری آلزایمر نقش دارد، بلکه نقش مهمی در افزایش و فعال سازی مسیرهای پیام رسانی سلولی چندگانه دارند که این روند در شکل گیری آسیب های ترکیبات سمی و سپس ایجاد بیماری آلزایمر نقش دارند (Wang, 2010). بافت مغز، به دلیل فعالیت بیوشیمیایی و آناتومی خاص در

مقابل استرس اکسیداتیو آسیب پذیر است (Wojtsial *et al.*, 2018). یکی از مهمترین سازوکارهای پاداکسایشی بدن در برابر حمله انواع فعال اکسیژن، حضور و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیمی است که واکنش دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن را کاتالیز می کند. حضور مقدار کافی از این آنزیم در سلول ها و بافت ها، غلظت آنیون سوپراکسید را در سطح بسیار پایین نگه می دارد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سلول و محیط های خارج سلولی، برای جلوگیری از بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو و نیز پیشگیری از سایر اختلالات نورودژنراتیو مانند بیماری آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون حیاتی است (Yao *et al.*, 2006). مطالعات متعدد اثرات آنتی اکسیدان بتائین را در بافت های مختلف بدن نشان داده است (Alirezai, 2013; Ganesan *et al.*, 2010). در مطالعه صورت گرفته توسط Detopoulou در سال ۲۰۱۰، مشخص گردید که مصرف بتائین خوراکی ۱/۵ درصد، استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد و میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می دهد (Deto poulou, ۲۰۱۰). مطالعه حاضر نیز نشان داد بتائین ظرفیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز ناحیه هیپوکامپ مغز را که ارتباط تنگاتنگی با حافظه و یادگیری دارد، بهبود بخشید. این آنزیم با اثر بر روی پردازش آمیلوئید بتا در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش دارد در حقیقت سوپراکسید دیسموتاز سبب کاهش تشکیل پلاک های آمیلوئید بتا می شود و در مقابل بر میزان تشکیل آمیلوئید بتا محلول و رشته ای اثر ندارد (Massaad *et al.*, 2009).

Chai و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند بتائین نقص حافظه ناشی از هموسیستئین را بهبود بخشیده و تعداد شاخه های دندریتی و تراکم خارهای دندریتی را در ناحیه هیپوکامپ افزایش می دهد. افزایش هموسیستئین در پلاسما سبب کاهش LTP (Long-Term Potentiating) در هیپوکامپ می شود و این اثر توسط بتائین مهار می شود (Chai *et al.*, 2013). به علاوه مطالعه Chai و همکارانش نشان داد که بتائین سبب کاهش میزان آمیلوئید بتا در هیپوکامپ می شود (Chai *et al.*, 2013). با توجه به اثر بتائین در افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز این احتمال وجود دارد که بتائین از طریق افزایش فعالیت این آنزیم سبب کاهش پلاک های آمیلوئید بتا می گردد. قابل ذکر است که این اثرات بتائین در دوز ۱۲,۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات، مشاهده شده است که تقریباً مشابه با دوز استفاده شده در مطالعه حاضر است.

از سویی مطالعات نشان می دهد در بیماری آلزایمر سطح هموسیستئین پلاسما افزایش می یابد (Van Dam & Van Gool, 2008) بررسی های ایمونوهیستوشیمی نشان می دهد هموسیستئین، استرس اکسیداتیو را افزایش می دهد که به علت اکسیداسیون گروه سولفیدریل می باشد در نتیجه باعث تولید سوپراکسید و هیدروژن پراکسید می شود (Cacciapuoti, 2013). هموسیستئین بیان آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز را نیز مهار کرده و اثرات سمی رادیکال های آزاد را افزایش می دهد. (Hungetal, ۲۰۱۰). مطالعات انجام شده توسط علیرضایی و همکاران نشان داد بتائین سبب کاهش میزان هموسیستئین پلاسما می گردد (Alirezai *et al.*, 2014). بنابراین این احتمال وجود دارد که بتائین از طریق کاهش هموسیستئین نیز

سبب بهبود حافظه گردد در تأیید این فرض نشان داده شده است که بتائین نقص حافظه القاء شده توسط هموسیستئین در ماز آبی موریس را کاهش می دهد (Chai *et al.*, 2013).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که بتائین ممکن است یک پتانسیل آنتی اکسیدانی محافظت کننده در پیشگیری از نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا داشته باشد. پیشنهاد می شود جهت تأیید بتائین به عنوان یک داروی موثر در پیشگیری و درمان آلزایمر، اثرات بتائین بر مسیرهای مولکولی و سیگنالینگ مهمی مانند (cAMP response element-binding protein) CREB و (calmodulin-dependent protein kinase II) CaMKII که در فرآیند یادگیری و حافظه نقش دارند مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه حاصل رساله دکتری فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می باشد بدین وسیله از تمامی عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند، تشکر می شود.

منابع

- Alirezaei, M. , Jelodar, G. Niknam, P. Ghayemi, Z. and Nazifi, S. (2011). Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* 67(4): 605-612.
- Alirezaei, M. , Dezfoulian, O. Sookhtehzari, A. Asadian, P. and Khoshdel, Z. (2014). Antioxidant effects of oleuropein versus oxidative stress induced by ethanol in the rat intestine. *Comp Clin Pathol* 23:1359-1365
- Alirezaei, M. , Jelodar, G. Niknam, P. Ghayemi, Z. and Nazifi, S. (2011). Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* 67(4): 605-612.
- Alirezaei, M., Jelodar, G. and Ghayemi, Z. (2012). Antioxidant defense of betaine against oxidative stress induced by ethanol in the rat testes. *Int J Pept Res Ther*; 18(3): 239-47.
- Aoi, Enokishima ., Toshitaka, Nabeshima. Yumiko Nog, uchi. Masaya, Miw a. Mizuki, Tsubo i. and ki, Hiramatsu. (2017). Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter. *796(5) :122-130.*
- Bo, Su. Xinglong, Wang. Akihiko, Nunomura. Paula I, Moreira. Hyoun-gon, Lee.. George, Perry. Mark A, Smith. and Xiongwei, Zhu. (2008). Oxidative Stress Signaling in Alzheimer's Disease. *5(9) :525-532.*
- Cacciapuoti, F. (2013). Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins4 do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Thromb Thrombolysis* 36:258-262.

- Cai, Z., Zhao, B., and Ratka, A. (2011). Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 13(4): 223-50.
- Chai, GS, Jiang, X, Ni, ZF, Ma, ZW, Xie, AJ, Cheng, XS, Wang, Q, and Wang, JZ. (2013). Liu GP. Betaine attenuates hcy-induced cognitive deficits induced by homocysteine. *International Society for Neurochemistry. J. Neurochem* 124: 388—396.
- Chaieb, I. (2010). Saponins as insecticides. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5(1):39-50.
- Craig, S.A. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:539-549.
- Das, SK., Vasudevan, DM. (2005). Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems; a dose dependent study. *Indian Journal of Clinical Biochemistr*, 20(1):80-84.
- Deto, poulou p, panagiotak os, DB. and pitsavos, c. (2008). Stefandisc. dietary choline and betaine takes in relation concentrations of in flamm atory markers in healthy anults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5):424-430.
- Fang, Xie., Yu n, Z h a o. Jing, Ma .Jing-Bo, Gong .Sh i- Da ,Wa ng .Liang, Zhang .Xiu-Jie, Gao .and Ling-Jia, Qia.(2016). The involvement of homocysteine in stress-induced A β precursor protein misprocessing and related cognitive decline in rats. *Cell Stress Chaperones*, Sep;21(5):915-26
- Ganesan ,B., Buddhan, S .Anandan, R.Sivakumar, R.and Anbinezhilan, R.(2010). Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Mole Biol Rep*,37(3): 1319-27
- Heim, KE .and Taglia Ferro, AR. and Bobilya DJ. (2012). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J Nutr Biochemical* ,13(10): 572-84
- Ho, PI, .Ortiz, D .Rogers, E.and Shea ,TB(.2002.)Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res*, 70: 694-702.
- Hung, s .(2010).Rozmaric acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro 236: 211- 280.
- Joanna, W .Katarzyna Marta, Z .Katarzyna LK .and Urszula, W .(2018) .Oxidant/A ntioxidant Imbalance in Alzheimer' s Disease: Therapeu tic and Diagnostic Prospe cts .*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 22: 1-17.
- Massaad, CA. , Washington, TM.Pautler, RG .and Klann, E .(2009) .Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*,106(32):13576-13581
- Nazari-Serenjeh, F, .Darbandi, N .Majidpour ,S.and Moradi ,P .(2019).Ghrelin modulates morphine/nicotine interaction in avoidance memory: involvement of CA1 nicotinic receptors. *Brain Research*, 1720:1420-1436.
- Paxinos ,G., and Watson ,C .(2007) .*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Academic Press San Diego.
- Reisi, P, .Alaei, H ., Babri ,S ., Sharifi, MR.,and Mohaddes, G ., (2009).Effects of treadmill running on spatial learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett*, 455(2): 79-83.
- Singh ,Gill., S. and Tuteja, N .(2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance .*Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.
- Tanzi, R.,and Bertram, L. , (2005).Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis. a genetic perspective *Cell*. 120:545-555.

- Van, Dam. ,and Van, Gool .(2008). Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. Archives of Gerontology and Geriatrics, 48(3) 425-430.
- Wang, M.(2010).Functions and Biotechnology of plant secondary Metabolites. Second edition.Inc. New Delhi, India. 20-30. with poor prognosis. Tumour Biol,37:5911–5917
- YaTing C, hang ., Wen-Neng Chang, Nai-Wen .Tsai Chih-Cheng, Huang .Chia,Te Kung. Yu-Jih, Su .Wei-Che, Lin .Ben-Chung, C .heng, Chih.Min .Su .Yi-Fang, Chiang.and C heng-Hsien, Lu.(2014). The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease.A Systematic Review. BioMed Research Internationa ,2014:182303.
- Yao, P. , Li, k .jin,Y .Song,F.Zho.S .Sun, X .Nussler ,A. K. andLiu, L .(2006).Oxidative damage after chronic ethanoi intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. Food chemistry, 99(2) :305-314.
- Zhang ,C. E., Tian, Q .Wei ,W .Peng, J. H .Liu, G. P.Zhou, X. W .Wang ,Q .Wang, D. W .and Wang, J. Z .(2008) .Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. Neurobiol Aging, 29: 1654–1665.
- Zhang, C. E., Wei, W .Liu ,Y. H .Peng, J. H .Tian, Q .Liu ,G. P.Zhang, Y .and Wang ,J. Z .(2009). Hyperhomocysteinemia increases beta amyloid by enhancing expression of gamma-secretase and phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain. Am. J.Pathol, 174, 1481–1491.
- Zhang, H. Ma Q., Zhang, Yw.and Xu, H. (2012) .Proteolyticprocessing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein.J Neurochem, 120(1): 9-21.
- Zhu , X., Perry, G .Smith, MA .andWang , X.(2013). Abnor- 885 mal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of 886 Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis ,33(Suppl 1), S253- 887.

Effect of Betaine on memory dysfunction and Activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme in Alzheimer's model induced by intra-hippocampal Beta-Amyloid Protein Injection

F. Alipourfard¹, H. Shajiee^{2*}, F. Nazari-Serenjeh³, V. Hojati⁴, M. Alirezaie⁵

Received: 2020.2.9

Accepted: 2020.7.26

Abstract

Studies indicate that oxidative stress has important role in the pathogenesis of Alzheimer disease. Betaine has neuroprotective and antioxidant properties. The purpose of this study was to investigate the effect of betaine on memory dysfunction induced by intra-hippocampal injection of amyloid beta and measurement of superoxide dismutase (SOD) activity. In this experimental study, animals were divided into 5 groups (n=8 in each group) including: control group, Alzheimer group and betaine (5, 10, and 15 mg/kg body weight + A β) groups. Seven days after A β injection memory was assessed by avoidant learning. The activity of antioxidant enzyme was measured via chemical methods. Data were analyzed by One-way ANOVA test. Results: The results showed in the Alzheimer's group, A β impaired memory and reduced SOD activity in comparison with control group. In contrast, betaine pretreatment significantly improved memory and increased SOD activity. This study shows that betaine as an antioxidant can improve memory by decreasing the oxidative stress.

Keywords: Alzheimer, Betaine, Passive avoidance learning, Superoxide dismutase

1- Ph.D. Student, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

*(corresponding author: drhshajiee@gmail.com)

3- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

5- Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Khorram Abad, Iran