

## اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین در مقابل آسیب معده ناشی از اندومتاسین در موش‌های صحرایی

مسعود علیرضایی<sup>۱\*</sup>، نجمه خلیقیان<sup>۲</sup>، حمیدرضا شکرانی<sup>۳</sup>، نادر تنیده<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: بتائین (تری متیل گلیسین) به عنوان دهنده گروه متیل و آنتی‌اکسیدان در مطالعات قبلی شناخته شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین در آسیب‌های معدی ناشی از اندومتاسین بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش بالغ نر از نژاد اسپراگ-داولی به ۴ گروه کنترل، اندومتاسین، بتائین-اندومتاسین و آسکوربیک اسید-اندومتاسین به طور مساوی تقسیم شدند. به گروه‌های کنترل و اندومتاسین نرمال سالین و گروه‌های پیش‌درمان شده با بتائین و آسکوربیک اسید به ترتیب بتائین (۱/۵٪ وزنی جیره) و آسکوربیک اسید (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن) به مدت ۱۵ روز پیوسته به صورت خوراکی تجویز شد. پس از ۲۴ ساعت ناشتایی نیز تمام گروه‌ها به جز گروه کنترل، یک دوز اندومتاسین (۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی دریافت کردند.

نتایج: تجویز اندومتاسین سبب افزایش درصد وقوع زخم معده نسبت به گروه کنترل گردید و پیش‌درمانی با بتائین به طور معنی‌داری درصد وقوع زخم را در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش داد ( $p=0/0017$ ). فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز (GPx) در بافت دیواره معده به طور معنی‌داری در گروه اندومتاسین در مقایسه با سایر گروه‌ها کمتر بود ( $p=0/0012$ ) در حالی که پیش‌درمانی با بتائین و آسکوربیک اسید فعالیت آنزیم GPx را در مقایسه با گروه اندومتاسین افزایش داد ( $p=0/0012$ ). فعالیت آنزیم کاتالاز در موش‌های پیش‌درمان شده با بتائین نسبت به گروه‌های اندومتاسین و آسکوربیک اسید-اندومتاسین به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ( $p=0/0015$ ). میزان پراکسیداسیون لیپید به طور معنی‌داری در گروه‌های پیش‌درمان شده با بتائین و آسکوربیک اسید در مقایسه با گروه اندومتاسین کاهش یافت ( $p=0/0013$ ).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که بتائین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی مفیدی در برابر آسیب معدی ناشی از اندومتاسین است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بتائین، زخم معده، آسکوربیک اسید

۱- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت

۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و حیوانات ترانسژنیک، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۷۷۰۳۳۱۲۸، پست الکترونیکی: Alirezaei\_m54@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۲

## مقدمه

بتائین (تری متیل گلیسین) به عنوان یک ترکیب چهارتایی آمونیوم در میکروارگانسیم‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد (۱،۲). این ترکیب مشتقی از اسید آمینه گلیسین و به صورت متیل آمین دارای سه گروه فعال از نظر بیوشیمیایی است. بتائین یک گروه متیل را به وسیله آنزیم بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز (BHMT) منتقل می‌کند و تبدیل به دی متیل گلیسین می‌گردد (۳-۵). بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز، تنها آنزیم شناخته شده‌ای است که از بتائین به عنوان سوبستر استفاده می‌کند و هموسیستئین را به متیونین تبدیل می‌کند (۶). فعالیت BHMT در انسان در کبد بزرگسالان و کلیه فراوان است و در سطح کمتر در مغز، قلب و ماهیچه‌های اسکلتی دیده شده است (۱،۷). مطالعات اخیر ما فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دهندگی گروه متیل بتائین را در بافت‌های مغز، مخچه، کلیه، کبد و تخمدان موش‌های صحرایی نشان داد (۱، ۳-۵، ۸) و به نظر می‌رسد بتائین به عنوان دهنده گروه متیل و آنتی‌اکسیدان با غلظت ۱/۵٪ جیره در کاهش پیچیدگی‌های ناشی از استرس اکسیداتیو می‌تواند مؤثر باشد. نقش رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیژن و استرس اکسیداتیو در تکامل و پاتوژنز آسیب‌های معدی تجربی به وسیله اتانول و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی مانند اندومتاسین به خوبی شناخته شده است (۹-۱۴). در این خصوص، اندومتاسین به عنوان یک ماده اکسیدان در مطالعات اخیر مشخص شده است (۱۵،۱۶). به خوبی شناخته شده است که پاتوژنز آسیب معدی ناشی از اندومتاسین شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل است که این‌ها فاکتورهای اصلی ایجادکننده آسیب موکوسی ناشی از استرس اکسیداتیو هستند (۱۷، ۱۵). پراکسیداسیون لیپید یک پارامتر مهم دیگر برای آسیب به واسطه گونه‌های فعال اکسیژن در غشاءها است که در آسیب معدی به واسطه اندومتاسین افزایش یافته است (۱۸) و نقش مهمی به وسیله تداخل در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بازی می‌کند (۱۷). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گونه‌های فعال

اکسیژن آسیب اکسیداتیو در لیپیدهای غشاء و پروتئین‌ها را القاء می‌کنند و سطح دفاع آنتی‌اکسیدانی را در زخم‌های معده تخلیه می‌کنند (۹،۱۷).

برخلاف اینکه تعدادی از مقالات اخیر بر روی اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین منتشر شده است، هیچ‌کدام بر تأثیر بتائین بر پیشگیری از زخم معده ناشی از اندومتاسین کار نشده است؛ بنابراین، در مطالعه حاضر اثرات حفاظتی بتائین (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان آنتی‌اکسیدان) در آسیب‌های مخاط معدی ناشی از اندومتاسین بررسی شده است. در این مطالعه بررسی شد که چگونه زخم معده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سطح پراکسیداسیون لیپید بافت معده، به وسیله درمان با بتائین و آسکوربیک اسید (به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان شناخته شده) در موش‌های صحرایی تغییر می‌کند.

## روش بررسی

بتائین ۹۶٪ از شرکت بیوکم آلمان تهیه گردید و تیوباربی‌توریک اسید و آسکوربیک اسید از شرکت مرک آلمان فراهم گردیدند. یک کیت آنزیمی GPx به وسیله شرکت راندوکس انگلیس فراهم شد. بتائین و اسکوربیک اسید روزانه در آب مقطر حل شدند و همه درمان‌ها به صورت خوراکی به وسیله گاوآژ انجام گرفت.

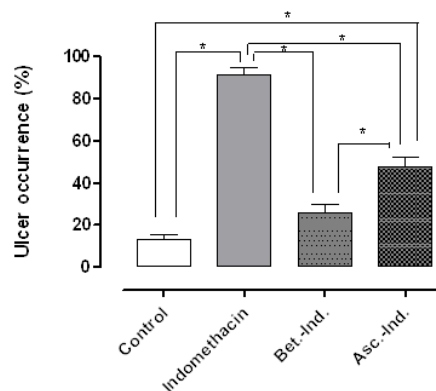
## حیوانات

این مطالعه بر اساس آئین‌نامه نحوه استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به اجرا درآمد و همه درمان‌ها به صورت داخل معدی در ساعات ۱۲-۱۱ هر روز صبح انجام گرفت. در یک مطالعه تجربی ۳۲ عدد موش صحرایی نر بالغ از نژاد اسپراگ-داولی با وزن ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و در شرایط کنترل شده از نور و دما (۲۴-۲۱ درجه سانتی‌گراد) و دوره تاریکی/روشنایی نیز شامل ۱۲/۱۲ ساعت و تهویه مناسب برخوردار بوده) با دسترسی کافی به آب و غذا نگهداری شدند.

## طرح آزمایش‌ها

(۱،۴،۵،۸). میزان مصرف غذا و وزن‌گیری در پایان هر هفته محاسبه گردید و با توجه به وزن به دست آمده میزان بتائین و آسکوربیک اسید محاسبه شد. تمام موش‌ها چهار ساعت پس از تجویز اندومتاسین و بعد از بیهوشی خفیف با دی اتیل اتر کشته شدند. بلافاصله معده آن‌ها از سمت مری و دریچه پیلور با پنس بسته شد و از محوطه شکمی خارج گردید. آنگاه ۲ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژی داخل بافت معده تزریق گردید و به مدت نیم ساعت در بشر حاوی نرمال سالین گذاشته شد. از محل خم بزرگ معده‌ها باز شدند و داخل معده با نرمال سالین جهت پاک شدن محتویات و لخته‌های خون آبکشی شد. شاخص زخم با استفاده از فرمول زیر و به کمک لوپ (Panasonic WV-GP240/G Suzhon, China) بر اساس مطالعه قبلی (۱۸) به دست آمد و مقادیر درصد وقوع زخم در نمودار ۱ نشان داده شده است.

Ulcer Index ((UI= [ulcerated area (mm<sup>2</sup>)/total stomach area (mm<sup>2</sup>)] × 100)



نمودار ۱: مقایسه درصد وقوع زخم معدی در بین گروه‌های درمان شده و کنترل. مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده است. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه است (p=۰/۰۰۱۷).

با استفاده از سانتریفوژ، ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ RPM، مواد جامد آن ته‌نشین و محلول بالائی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی جدا گردید. میزان پروتئین در محلول بالائی بافت برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز و تعیین میزان مواد واکنش‌دهنده به اسید تیوباربی‌توریک با استفاده از روش لوری تعیین گردید (۲۰).

تعیین فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)

موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل (نرمال سالین به مدت ۱۵ روز پیوسته به صورت خوراکی)، گروه اندومتاسین (نرمال سالین به مدت ۱۵ روز + اندومتاسین)، گروه بتائین-اندومتاسین (بتائین ۱/۵٪ وزنی جیره روزانه به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی + اندومتاسین) و گروه آسکوربیک اسید-اندومتاسین (آسکوربیک اسید با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی + اندومتاسین). آنگاه به همه موش‌ها یک شبانه‌روز (۲۴ ساعت) گرسنگی داده شد ولی دسترسی به آب آزاد بود. در روز هفدهم یک دوز اندومتاسین (۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی از طریق لوله معدی (گاواژ) به همه گروه‌ها به جز گروه کنترل داده شد و گروه کنترل آب مقطر دریافت کردند. دوز اندومتاسین و آسکوربیک اسید بر اساس مطالعات قبلی انتخاب گردید (۱۹، ۱۵). دوز بتائین با توجه به مطالعات منتشر شده و بر اساس میزان مصرف غذا در آزمایشگاه محاسبه گردید

برای اندازه‌گیری‌های آنتی‌اکسیدانی، بافت مخاط معده از قسمت قدامی جدا گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری گردید.

آماده‌سازی بافت

در زمان انجام آزمایش‌ها بافت معده از حالت انجماد خارج گشته و به صورت دستی با بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۵ میلی‌مولار EDTA، pH=۷/۴ بر روی ازت مایع هموژنیزه شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

همه نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شده است. میانگین مربوط به تمام مقادیر به دست آمده در گروه‌های چهارگانه برای نرمال و هموزن بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون مقایسه شدند. همه متغیرها با استفاده از واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با هم مقایسه شدند و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از آزمون Tukey's برای مقایسه جفت گروه‌ها استفاده گردید. تمام آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۹ صورت گرفت و سطح معنی‌دار  $P < 0.01$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

در این مطالعه تجویز اندومتاسین در موش‌ها آسیب شدید قابل رویت در قسمتی از معده که اسید و پپسین ترشح می‌کند، ایجاد کرد. درحالی‌که پیش‌درمانی با بتائین به طور معنی‌داری باعث کاهش درصد وقوع زخم معده در مقایسه با گروه اندومتاسین گردید ( $p = 0.0017$ ). اگرچه آسکوربیک اسید (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش وقوع زخم معده گردید اما به صورت کامل موفق به پیشگیری نبود (نمودار ۱). نظر به مدل القاء آسیب به وسیله گرسنگی (fasting) و اندومتاسین در هر دو گروه کنترل و اندومتاسین، وقوع زخم دیده شد گرچه تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و اندومتاسین وجود داشت ( $p = 0.0017$ ).

برای تعیین اثرات بتائین و اسکوربیک اسید بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی بافت معده، فعالیت آنزیم‌های گلوکاتاتیون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT) در همه گروه‌ها اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۲، ۳). فعالیت آنزیم GPx به طور معنی‌داری در گروه اندومتاسین نسبت به بقیه گروه‌ها پایین‌تر بود ( $p = 0.0012$ ). در واقع پیش‌درمانی با بتائین و آسکوربیک اسید توانست فعالیت GPx را به صورت معنی‌داری در گروه‌های پیش‌درمان شده نسبت به گروه اندومتاسین افزایش دهد ( $p = 0.0012$ ). فعالیت CAT به طور معنی‌داری در گروه اندومتاسین نسبت به کنترل و بتائین - اندومتاسین پایین‌تر بود ( $p = 0.0015$ ). درحالی‌که فعالیت کاتالاز به طور معنی‌داری در

فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) و گزارش قبلی (۹) اندازه‌گیری شد. ارزیابی فعالیت به وسیله اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت. فعالیت گلوکاتاتیون پراکسیداز به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg protein) بیان گردید.

### تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

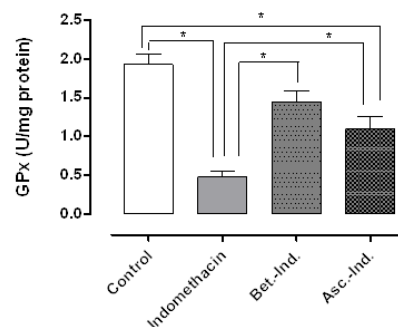
کاتالاز بافتی با استفاده از مدل کلیبورن (۲۱) که قبلاً گزارش شده است (۹)، انجام گرفت. مخلوط واکنش ۱ میلی‌لیتر حاوی ۵ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=7)، ۱۹ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۵۰-۲۰ میکرو لیتر از نمونه هموژنیزه بود و واکنش با اضافه شدن آب اکسیژنه شروع گردید و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد و با استفاده از ضریب خاموشی مولی ۴۳/۶ مول در سانتی‌متر فعالیت آنزیم محاسبه گردید. فعالیت آنزیم به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg protein) بیان گردید.

### تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید

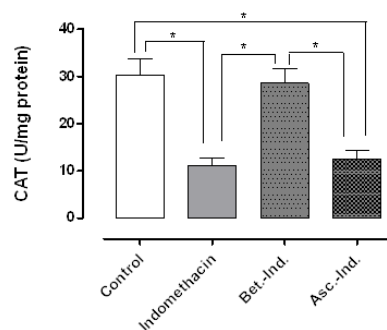
میزان پراکسیداسیون لیپید در بافت معده به وسیله تعیین مقدار مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک بر اساس روش سوبارو و همکاران اندازه‌گیری شد (۲۲). به طور خلاصه ۴۰ میکرولیتر از بافت هموژنیزه به ۴۰ میکرولیتر سدیم کلرید ۰/۹٪ و ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس با استفاده از ۶۰۰ میکرولیتر اسید هیدروکلریک ۰/۸ مولار که حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۱۲٪ است واکنش متوقف گردید. پس از اضافه نمودن ۷۸۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۱٪، محلول به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد گردید. محلول سرد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید و میزان جذب نور آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک، برای محاسبه مقدار مواد واکنش دهنده به اسید تیوباربیتوریک بکار گرفته شد. این میزان به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بافت (nmol/mg protein) بیان گردید.

ایجاد زخم معده در موش‌ها با اندومتاسین به طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپید (TBARS) را در گروه اندومتاسین در مقایسه با دیگر گروه‌ها در بافت معده افزایش داد ( $p=0/0013$ ). در حالی که پیش‌درمانی با بتائین و یا آسکوربیک اسید توانست غلظت TBARS را کاهش دهد و مانع از پراکسیداسیون لیپید گردد ( $p=0/0013$ ).

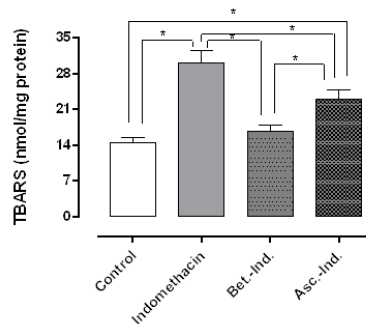
گروه بتائین- اندومتاسین نسبت به گروه اندومتاسین و حتی آسکوربیک اسید- اندومتاسین افزایش یافت ( $p=0/0012$ ). در مجموع سطوح GPx و CAT در گروه‌های کنترل و پیش‌درمان شده نسبت به گروه اندومتاسین بالاتر بودند و درمان‌های بتائین و آسکوربیک اسید قادر بودند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در بافت معده نسبت به گروه اندومتاسین افزایش دهند، اگرچه بعضی از آن‌ها معنی‌دار نبودند ( $p>0/05$ ).



نمودار ۲: مقایسه فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان GPx در بین گروه‌های درمان شده و کنترل. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از فعالیت آنزیم (U/mg protein) بیان شده است. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه است ( $p=0/0012$ ).



نمودار ۳: مقایسه فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان CAT در بین گروه‌های درمان شده و کنترل. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از فعالیت آنزیم (U/mg protein) بیان شده است. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه است ( $p=0/0015$ ).



نمودار ۴: مقایسه مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتریک (TBARS) در بین گروه‌های درمان شده و کنترل. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میزان مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتریک (nmol/mg protein) بیان شده است. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه است ( $p=0/0013$ ).

بحث

در مطالعه حاضر تجویز اندومتاسین به موش‌های گرسنه، باعث ایجاد زخم‌های شدیدی گردید که حتی از بیرون از معده هم به صورت یک‌سری نقاط سیاه‌رنگ دیده شدند، درحالی‌که گرسنگی به‌تنهایی سبب خونریزی‌های سطحی در بافت معده گردید. بتائین به طور معنی‌داری سبب کاهش درصد وقوع زخم شد و بهترین نتیجه در گروه بتائین- اندومتاسین فراهم گردید؛ بنابراین، نتایج ما نشان دادند که زخم‌های معده ناشی از اندومتاسین ممکن است به طور موفقیت‌آمیزی با بتائین، احتمالاً به‌وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی و توقف استرس اکسیداتیو درمان گردند. در این تنظیم مشخص گردید که بتائین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دیواره معده را بهبود می‌بخشد و پایداری غشاء سلول را افزایش داده، میزان پراکسیداسیون لیپید (نشان داده شده به وسیله میزان TBARS) در دیواره معده را کاهش می‌دهد. نتایج ما همچنین اثرات آسکوربیک اسید را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده در برابر آسیب معده ناشی از اندومتاسین نشان داد، اگرچه به طور کامل موفق نبود. در مجموع این نتایج از گزارش‌های قبلی در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین در مقابل استرس اکسیداتیو در مدل‌های حیوانی پشتیبانی می‌کنند (۱، ۳-۶، ۸، ۲۳).

به خوبی می‌دانیم که زخم معده نتیجه عدم توازن سیستم‌های پراکسیداسیون و آنتی‌اکسیدان به نفع پراکسیداسیون در معده است (۹، ۱۰). صدمه به بافت معده همراه با التهاب حاد و مزمن به خاطر مسمومیت با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در معده است (۲۴، ۲۵) و رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن نقش مهمی در پاتوژنز آسیب‌های گوارشی بازی می‌کنند (۲۴، ۲۶)؛ بنابراین، درگیری گونه‌های فعال اکسیژن به خوبی در پاتوژنز آسیب‌های مخاطی ایجاد شده به‌وسیله اتانول، اندومتاسین و ترکیبات دیگر علاوه بر مهار آنزیم سیکلواکسیژناز مشخص شده است (۹، ۱۶، ۱۷، ۲۹-۲۷). در این خصوص مشخص شده است که اندومتاسین سنتز پروستاگلندین‌های محافظتی سلول تولید شده به وسیله آنزیم‌های سیکلواکسیژناز

(Cyclooxygenase) COX-1, COX-2 در بافت معده را مهار می‌کند (۳۰، ۱۶، ۹). از یک طرف تجویز اندومتاسین سبب کاهش سطح پروستاگلندین‌ها و تولید موکوس و ترشح بیکربنات شده و از طرف دیگر آزاد شدن اسید کلریدریک را افزایش می‌دهد (۳۱، ۳۰)؛ بنابراین افزایش اسیدیته معده و کاهش تولید پروستاگلندین‌ها سبب ایجاد زخم می‌گردد (۱۹، ۱۵). در مطالعه حاضر، اثرات حفاظت معده‌ای بتائین نسبت به اثرات فراهم شده به وسیله پیش‌درمانی با آسکوربیک اسید (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بکار گرفته شده دقیقاً ۱۵ روز قبل از تجویز اندومتاسین بهتر بود. به خوبی می‌دانیم که آسکوربیک اسید یک ترکیب آنتی‌اکسیدان است و بعضاً به عنوان یک داروی کمکی در آزمایش‌های تجربی و درمان کلینیکی انسان استفاده می‌شود. اگرچه آسکوربیک اسید ساختار لازم را برای به دام انداختن رادیکال‌های آزاد دارا هست، اسیدی بودن آن ممکن است در تکامل زخم‌ها در معده شرکت کند (۱۹)؛ بنابراین ممکن است یک رژیم ترکیبی از هر دو داروهای آنتی‌اکسیدان و آنتی‌اسید در پیشگیری از آسیب مستقیم مخاطی سودمند باشد.

همه سلول‌ها قادرند تا خود را از رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی محافظت نمایند (۳۲). گلوکاتیون پراکسیداز و کاتالاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیدی هستند که می‌توانند آب‌اکسیژنه را به آب تجزیه کنند (۳۴، ۳۳). سوپراکسید دیسموتاز آنزیم آنتی‌اکسیدان دیگر در سلول‌ها سریعاً سوپراکسید را به محصولات کم‌خطرتر مانند آب‌اکسیژنه تبدیل می‌کند. آنگاه CAT و GPx آب‌اکسیژنه را به آب تجزیه می‌کنند (۳۵، ۲۳). اگرچه آب‌اکسیژنه به خودی خود ترکیب فعالی نیست اما می‌تواند به متابولیت رادیکال هیدروکسیل و یا اکسیژن تک‌احیاء شود (۳۶). در مطالعه حاضر، بتائین سبب افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (CAT, GPx) برای گروه بتائین- اندومتاسین در مقایسه با گروه اندومتاسین شد. درحالی‌که درمان با آسکوربیک اسید تنها

معنی‌داری از پراکسیداسیون لیپید در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. اعتقاد بر این است که بتائین نقش مهمی در نگهداری پایداری و کارکرد غشاء سلول‌ها بازی می‌کند (۸،۳۸). بتائین به وسیله شرکت کردن در پروسه‌های متیلاسیون در داخل غشاء سلول‌ها باعث نگهداری تعادل بین اتانول آمین و فسفاتیدیل کولین می‌گردد، بنابراین باعث نگهداری غشاء شده و مانع از پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (۲،۳۱،۳۹).

#### نتیجه‌گیری

همان‌طور که گفته شد، زخم معده یک مرحله اکسیداتیو در معده است که اسید و پپسین به تکامل این شرایط شرکت می‌کنند و بنابراین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین غلظت پراکسیداسیون لیپید چگونگی سیستم آنتی‌اکسیدانی را توضیح می‌دهند. در این مطالعه مشخص گردید که اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین توانست مانع از افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپید گردد. با این حال جالب است در مدل‌های حیوانی آزمایش شود آیا رژیم‌درمانی ترکیبی شامل ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد اسید ممکن است در پیشگیری از آسیب‌های مخاطی ناشی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی نظیر اندومتاسین مؤثر باشد.

#### سپاسگزاری

منابع مالی این مطالعه از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت فراهم شده است و نویسندگان برخوردار می‌دانند از ریاست محترم مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر همکاری صمیمانه شان تقدیر و تشکر کنند.

سبب افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتیون پراکسیداز گردید و فعالیت کاتالاز احتمالاً بخشی به خاطر خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از اندومتاسین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت؛ به عبارت دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی معده در موش‌های درمان شده با اولئوروپئین و آسکوربیک اسید تخلیه نشد که نشان می‌دهد بتائین و آسکوربیک اسید دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و ذخایر آنتی‌اکسیدانی سلول را حفظ کرده‌اند.

به طور کلی پذیرفته شده است که افزایش پراکسیداسیون لیپید نتیجه آسیب به دیواره سلول است (۱۸،۳۷)؛ بنابراین ما غلظت مواد واکنش دهنده به اسید تیوباربیتریک (TBARS) را به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپید در بافت دیواره معده اندازه‌گیری کردیم. نتایج نشان داد که افزایش معنی‌داری از پراکسیداسیون لیپید در موش‌های درمان شده با اندومتاسین در مقایسه با گروه‌های دیگر وجود دارد. در مقابل، کاهش معنی‌داری در غلظت پراکسیداسیون لیپید به وسیله تجویز بتائین و آسکوربیک اسید مشاهده شد ولی پیش‌درمانی با آسکوربیک اسید نتوانست به طور کافی مانع از افزایش پراکسیداسیون لیپید گردد؛ به عبارت دیگر تفاوت‌های معنی‌داری بین گروه اندومتاسین و دیگر گروه‌ها برای مارکر پراکسیداسیون لیپید وجود داشت که نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو در موش‌های درمان شده با اندومتاسین است. درحالی‌که بتائین توانست مانع از افزایش پراکسیداسیون لیپید گردد، گروه آسکوربیک اسید-اندومتاسین سطح افزایش یافته

#### References:

- Alirezaei M, Khoshdel Z, Dezfoulian O, Rashidipour M, Taghadosi V. *Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats*. J Physiol Sci 2015; 65(3): 243-52.
- Alirezaei M, Chehari K. *Hepatoprotective effects of betaine against oxidative stress induced by levodopa and benserazide in rats*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 22(6): 1712-24.

- 3- Alirezaei M. *Betaine as a methyl donor and an antioxidant agent in levodopa-induced hyperhomocysteinemia and oxidative stress in rat's kidney*. Iran J Vet Med 2014; 8(2): 91-99.
- 4- Alirezaei M. *Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats*. Iran J Basic Med Sci 2015; 18(10): 950-57.
- 5- Alirezaei M, Jelodar G, Niknam P, Ghayemi Z, Nazifi S. *Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum*. J Physiol Biochem 2011; 67(4): 605-612.
- 6- Alirezaei M, Saeb M, Javidnia K, Nazifi S, Saeb S. *Hyperhomocysteinemia reduction in ethanol-fed rabbits by oral betaine*. Comp Clin Pathol 2012; 21(4):421-427.
- 7- Craig SAS. *Betaine in human nutrition*. Am J Clin Nutr 2004; 80(3): 539-549.
- 8- Alirezaei M, Niknam P, Jelodar G. *Betaine elevates ovarian antioxidant enzyme activities and demonstrates methyl donor effect in non-pregnant rats*. Int J Pept Res Ther 2012; 18(3): 281-290.
- 9- Alirezaei M, Dezfoulian O, Neamati S, Rashidipour M, Tanideh N, Kheradmand A. *Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats*. J Physiol Biochem 2012; 68(4): 583-592.
- 10- Bandyopadhyay SK, Pakrashi SC, Pakrashi A. *The role of antioxidant activity of Phyllanthus emblica fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer*. J Ethnopharmacol 2000; 70(2): 171-176.
- 11- De Barros MP, Sousa JPB, Bastos JK, De Andrade SF. *Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats*. J Ethnopharmacol 2007; 110(3): 567-571.
- 12- Hetil O. *Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases*. J Clin Biol 1993; 134: 675-83.
- 13- Itoh M, Guth PH. *Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat*. Gastroenterology 1985; 88(5 Pt 1): 1165-67.
- 14- Isenberg JI, McQuaid KR, Laine L, Walsh JH. *Acid-peptic disorders*. Textbook of gastroenterology 1995; 1: 1347-430.
- 15- Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. *A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical*. J Biol Chem 2003; 278(13): 10993-1001.
- 16- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. *Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats*. J Ethnopharmacol 2006; 103(1): 59-65.
- 17- Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. *Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration*. Free Rad Biol Med 1997; 23(1): 8-18.



- 18- Dekanski D, Janicijevic-Hudomal S, Ristic S, Radonjic NV, Petronijevic ND, Piperski V, et al. *Attenuation of cold restraint stress-induced gastric lesions by an olive leaf extract*. Gen Physiol Biophys 2009; 28: 135-142.
- 19- Farris PK. *Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions*. Dermatol Surge 2005; 31(s1): 814-18.
- 20- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75.
- 21- Claiborn A. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC press Boca Raton, FL: 1986.
- 22- Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC. *Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro*. J Neurochem 1990; 55(1): 342-45.
- 23- Alirezaei M, Gheisari HR, Ranjbar VR, Hajibemani A. *Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality*. Brit Poult Sci 2012; 53(5): 699-707.
- 24- Lee JH, Lee DU, Jeong CS. *Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats*. Food Chem Toxicol 2009; 47(6):1127-131.
- 25- Leirisalo-Repo M, Paimela L, Koskimies S, Repo H. Functions of polymorphonuclear leukocytes in early rheumatoid arthritis. Inflammation 1993; 17(4): 427-42.
- 26- Santra A, Chowdhury A, Chaudhuri S, Gupta JD, Banerjee PK, Guha Mazumder DN, et al. *Oxidative stress in gastric mucosa in Helicobacter pylori infection*. Ind J Gastroenterol 2000; 19(1): 21-23.
- 27- Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. *Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals*. Biochem Pharmacol 2002; 63(11): 2069-074.
- 28- Smith SM, Kvietyts PR. *Gastric ulcers: role of oxygen radicals*. Crit Care Med 1988; 16(9): 892-98.
- 29- Wallace JL. *Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research*. Am J Med 2001; 110(1): S19-S23.
- 30- De Souza GEP, Cardoso RA, Melo MCC, Fabricio ASC, Silva VMS, Lora M, et al. *A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats*. Inflamm Res 2002; 51(1): 24-32.
- 31- Ganesan B, Anandan R, Lakshmanan PT. *Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats*. Cell Stress Chap 2011; 16(6): 641-52.
- 32- Neamati S, Alirezaei M, Kheradmand A. *Ghrelin Acts as an Antioxidant Agent in the Rat Kidney*. Int J Pep Res Therap 2011; 17(3): 239-45.
- 33- Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Alavi ER, Joorabi S. *Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin*. Andrologia 2009; 41(6): 335-40.
- 34- Kheradmand A, Alirezaei M, Birjandi M. *Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary*. Regul Pept 2010; 162(1): 84-9.

- 35- Alirezaei M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati S, Rashidipour M. *Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis*. *Mediterr J Nutr Metab* 2011; 5(3): 205-11.
- 36- Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T, Ahotupa M. *Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis*. *Endocrinology* 1996; 137(1): 105-12.
- 37- Dekanski D, Ristic S, Mitrovic DM. *Antioxidant effect of dry olive (Olea europaea L.) leaf extract on ethanol-induced gastric lesions in rats*. *Mediterr J Nutr Metab* 2009; 2(3): 205-11.
- 38- Ahn M, Kang Y, Moon J, Kim S, Moon C, Shin T. *Oral administration of betaine ameliorates ethanol-induced gastric injury in rats through its antioxidant effects*. *Orient Pharm Experim Med* 2014; 14(3): 237-43.
- 39- Ganesan B, Yathavamoorthy R, Farvin KSH, Anandan R. *Supplementation of betaine attenuates HCl-ethanol induced gastric ulcer in rats*. *Int J Biol Chem* 2010; 4(2): 79-89.

## ***Antioxidant effects of betaine against Indomethacin-induced gastric damage in rats***

**Masoud Alirezaei (PhD)<sup>\*1</sup>, Najmeh Khalighian (MSc)<sup>2</sup>  
Hamidreza Shokrani (PhD)<sup>3</sup>, Nader Tanideh(PhD)<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad, Iran.

<sup>2</sup> Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran.

<sup>3</sup> Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad, Iran.

<sup>4</sup> Stem cell and Transgenic Research Center, Pharmacology Department, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

**Received:** 10 Apr 2016

**Accepted:** 20 Oct 2016

### ***Abstract***

**Introduction:** Betaine (trimethyl glycine) is known as methyl group donor and antioxidant in previous reports. The aim of this study was to assess the antioxidant effects of betaine in Indomethacin-induced gastric damages.

**Methods:** Thirty-two adult male Sprague–Dawley rats in an experimental study were divided into four equal groups as follow: Control, Indomethacin, Betaine-indomethacin and Ascorbic acid-indomethacin. Control and indomethacin groups received normal saline and betaine and ascorbic acid-pretreated rats were administrated betaine (1.5% of the total diet) and ascorbic acid (50 mg/kg body weight) for 15 consecutive days, respectively. After 24 h fasting, all of the groups received indomethacin (48 mg/kg body weight) and control group received distilled water.

**Results:** Indomethacin administration increased gastric ulcer occurrence (%) in comparison with control group and betaine pretreatment significantly decreased ulcer occurrence (%) when compared to the other groups (P=0.0017). Gastric wall glutathione peroxidase (GPx) activity was significantly lower in indomethacin group in comparison with the other groups (P=0.0012) while, betaine and ascorbic acid pretreatment increased GPx activity in comparison with indomethacin group (P=0.0012). Catalase activity was significantly higher in betaine-pretreated rats in comparison with indomethacin and ascorbic acid-indomethacin groups (P=0.0015). Lipid peroxidation significantly decreased in betaine and ascorbic acid pretreated groups (P=0.0013).

**Conclusion:** These results showed beneficial antioxidant effects of betaine against gastric damages induced by indomethacin in rats.

**Key words:** Antioxidant Enzymes; Betaine; Gastric Ulcer; Ascorbic Acid

#### ***This paper should be cited as:***

Masoud Alirezaei, Najmeh Khalighian, Hamidreza Shokrani, Nader Tanideh. *Antioxidant effects of betaine against indomethacin-induced gastric damage in rats*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(7): 565-75.

**\*Corresponding author: Tel: 09177033128, email: Alirezaei\_m54@yahoo.com**