مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳
صفحه: ۱۷۲۴-۱۷۱۲

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No.6, Jan-Feb 2015
Pages: 1712-1724

اثرات حفاظت‌کبدی بتائین در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از لوودوپا و بنسرازید در موش‌های صحرایی

مسعود علیرضایی*[۱]، کبری چهاری[۲]

چکیده:

مقدمه: بتائین دارای خواص‌دهندگی گروه متیل و آنتی‌اکسیدانی است. بنابراین، هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی غلظت پلاسمایی هموسیستئین و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بتائین به دنبال تجویز داروهای لوودوپا و بنسرازید در کبد موش‌های صحرایی است که معمولاً در درمان بیماری پارکینسون استفاده می‌شوند.

روش بررسی: موش‌های صحرایی نر از نژاد اسپراگ-داولی به وسیله لوودوپا (LD)، بتائین (.Bet)، لوودوپا+بتائین (LD/Bet)، لوودوپا+بنسرازید (LD/Ben) و لوودوپا+بتائین+بنسرازید (LD/Bet.-Ben) و آب مقطر برای گروه کنترل به مدت ده روز پیوسته به صورت خوراکی درمان شدند. غلظت هموسیستئین پلاسما به روش الیزا و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقدار پراکسیداسیون لیپید به روش‌های شیمیایی اندازه‌گیری شدند. همچنین غلظت دوپامین سرم با استفاده از روش HPLC تعیین گردید و نتایج با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: درمان موش‌های صحرایی با لوودوپا و بنسرازید، غلظت هموسیستئین کل پلاسما (tHcy) را به طور معنی‌داری در گروه لوودوپا+بنسرازید در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش داد ($p<۰/۰۵$) همچنین tHcy در گروه لوودوپا در مقایسه با گروه‌های کنترل، بتائین و لوودوپا+بتائین به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). میزان پراکسیداسیون لیپید (TBARS) در کبد به طور معنی‌داری در گروهای لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید نسبت به گروه کنترل افزایش داشت و این شاخص به وسیله درمان با بتائین کاهش یافت($p<۰/۰۵$). در حالی که، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (GPx, SOD) در کبد به طور معنی‌داری در موش‌های درمان شده با لوودوپا در مقایسه با گروه لوودوپا+بتائین+بنسرازید افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). غلظت دوپامین سرم به طور معنی‌داری در موش‌های درمان شده با لوودوپا+بنسرازید در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، بتائین به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان در خصوص کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف داروهای لوودوپا و بنسرازید عمل می کند و قادر است اثرات اکسیداتیو آنها را بر بافت کبد کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: هموسیستئین، دوپامین، بتائین، کبد، لوودوپا، بنسرازید

۱- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
* (نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۶۶۱-۶۲۰۰۱۰۹، پست الکترونیک: alirezaei_m54@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۲

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

مقدمه

بتائین به عنوان یک ترکیب چهارتایی آمونیوم که به اسامی تری‌متیل گلیسین، گلیسین بتائین و اکسی نورین هم شناخته شده است در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد. این ترکیب مشتقی از اسید آمینه گلیسین با فرمول شیمیایی $(CH3)3N+CH2COO^-$ است و به صورت متیل آمین دارای سه گروه فعال از نظر بیوشیمیایی می‌باشد(۱،۲). یکی از راه‌های سنتز متیونین استفاده از آنزیم بتائین-هموسیستئین متیل ترانسفراز (BHMT) است که این واکنش نیاز به ویتامین B_{12} یا تتراهیدروفولات ندارد و گروه‌های متیل از طریق جیره حاوی کولین فراهم می‌گردند. کولین در کبد توسط آنزیم کولین دهیدروژناز تبدیل به بتائین می‌گردد و آنگاه گروه متیل از آن به هموسیستئین منتقل می‌گردد(۳). هموسیستنمیا ملایم در کوتاه مدت و طولانی مدت به وسیله تجویز ترکیب ویتامین B6، اسید فولیک و بتائین یا بتائین به تنهایی با دوز روزانه ۶-۱/۵ گرم درمان شده است. همچنین بتائین و نه اسید فولیک در پیشگیری از افزایش هموسیستئین ناشی از تجویز متیونین موثر بوده است. استفاده از مکمل‌های بتائین در جیره مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که موجب اصلاح موارد غیرنرمال در الکیسم مزمن از جمله: افزایش هموسیستئین می‌شود(۱،۲). یکی دیگر از عملکردهای بتائین، به دام انداختن گروه کوئینون حاصل از متابولیسم لوودوپا (LD، داروی مورد استفاده در درمان بیماری پارکینسون) نیز می‌باشد که در این خصوص تجویز LD سبب کاهش *S*-آدنوزیل متیونین (SAM) حاصل از بتائین شده است(۴). همچنین لوودوپا باعث مرگ سلول‌های PC_{12} در محیط آزمایشگاه شده است(۵).

هیپرهموسیستنمیا (Hyperhomocysteinemia) بالا بودن میزان هموسیستئین در پلاسما یا سرم است که اغلب به علت باند شدن به پروتئین‌های پلاسما در پلاسما اندازه‌گیری می‌شود و افزایش آن بیانگر عدم توازن واکنش‌های متیلاسیون در بدن است(۱). خاصیت توکسیسیتی عصبی (Neurotoxicity) برای هموسیستئین گزارش شده است. هنگامی که در متابولیسم هموسیستئین توسط مسیرهای متیونین سنتاز و سیتاتیونین بتا-سنتاز اختلال ایجاد شود، واکنش‌های متیلاسیون متوقف می‌گردد(۱،۲). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که دو تا از آنزیم‌های متیل ترانسفراز وابسته به متیلاسیون کتکول آمین‌ها از جمله آنزیم کتکول O– متیل تراسفراز (Catechol O-methyl COMT: Transferase) و آنزیم فنیل اتانول آمین N-متیل ترانسفراز (Phenylethanol amine N-Methyl Transferase :PNMT) به طور معنی‌داری با افزایش غلظت هموسیستئین در بافت عصبی مهار می‌گردند. علاوه بر این غلظت *S*-ادنوزیل هموسیستئین (SAH) در بافت مغز افراد مبتلا به آلزایمر به طور معنی‌داری با میزان فعالیت آنزیم‌های COMT و PNMT وابسته است و مارکر مناسبی جهت بیان ضایعات نرودژنراتیو است(۶،۷). هموسیستئین باعث تسهیل خاصیت توکسیسیتی تحریکی (Excitotoxicity) گردیده و منجر به افزایش صدمه به اعصاب و مرگ سلولی می‌گردد. نوروتوکسیسیتی ممکن است به واسطه افزایش رادیکال‌های آزاد باشد و مطالعه با استفاده از کشت سلول‌های نورونی نشان داده است که هموسیستئین با فلزهای انتقالی از جمله آهن و مس وارد واکنش می‌شود و باعث تقویت توکسیسیتی اکسیداتیو و آسیب نورونی می‌گردد(۳،۶،۷).

نظر به اینکه بیماری پارکینسون (PD) جزء بیماری نرودژنراتیو محسوب می‌گردد، افزایش هموسیستئین پلاسما همراه با کاهش دوپامین در پلاسمای این افراد رخ می‌دهد. علاوه بر این تزریق سیستمیک هموسیستئین نیز سبب کاهش نوروترانسمیتر مغزی دوپامین در بیماری پارکینسون می‌گردد(۸). داروی رایج برای درمان بیماران PD، لوودوپا است که پس از عبور از سد خونی- مغزی در مغز تبدیل به دوپامین می‌گردد. مشخص شده است که تجویز LD خود باعث افزایش هموسیستئین می‌گردد و این افزایش خود در پیشرفت بیماری مؤثر است(۹،۱۰). همچنین میزان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

هموسیستئین در بیمارانی که با LD درمان شده‌اند، افزایش معنی‌داری نسبت به بیمارانی که درمان نشده‌اند، داشته است و افزایش هموسیستئین باعث مرگ و میر سلولی به واسطه اپوپتوز در مغز شده است(۱۰). از طرفی مشخص گردیده است که LD خود دچار اتواکسیداسیون می‌گردد و سبب افزایش رادیکال‌های آزاد از جمله هیدروکسیل می‌گردد. بنابراین در این بیماران اتواکسیداسیون LD و ایجاد استرس اکسیداتیو، بیماری را شدیدتر می‌کند و زمینه را برای بروز بیماری‌های قلبی فراهم می‌کند(۶،۱۰،۱۱). در سال‌های اخیر برای اینکه غلظت LD در قسمت نورون‌های دوپامینرژیک بالا باشد و این ترکیب در بافت‌های محیطی متابولیزه نگردد همراه با LD از مهارکننده‌های دوپا دکربوکسیلاز مانند بنسرازید (Bnserazide) استفاده شده است(۱۲،۱۳). گرچه استفاده از بنسرازید سبب بهبود علایم حرکتی در این بیماران شده است اما خود سبب افزایش هموسیستئین گردیده است(۹،۱۲،۱۳). افزایش هموسیستئین بیماری پارکینسون را پیچیده‌تر می‌کند(۱۴،۱۵).

در مطالعات اخیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دهندگی گروه متیل بتائین در بافت‌های مخچه، بیضه و تخمدان موش‌های صحرایی مشاهده شد(۱،۲،۱۶،۱۷) و به نظر می رسد بتائین با غلظت ۱/۵٪ جیره در کاهش پیچیدگی‌های ناشی از تجویز LD مؤثر باشد. در این خصوص مطالعه اخیر نویسندگان بیانگر استفاده از بتائین برای پیشگیری اثرات جانبی هموسیستئین ناشی از لوودوپا و بنسرازید در بافت کلیه می‌باشد(۱۸). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات جانبی لوودوپا و بنسرازید (به عنوان دو داروی مهم در درمان بیماری پارکینسون) بر سطح هموسیستئین و دوپامین در خون و فعالیت آنتی اکسیدانی بافت کبد به عنوان مهمترین ارگان در متابولیسم این داروها است. در این خصوص، میزان هموسیستئین در پلاسما و دوپامین در سرم اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (GPx, SOD) و میزان پراکسیداسیون لیپید (از طریق ارزیابی TBARS) در بافت کبد نیز سنجیده شد. در واقع در این مطالعه بررسی شد که آیا استرس اکسیداتیو ناشی از لوودوپا و بنسرازید در م غز و مخچه باعث آسیب اکسیداتیو در کبد موش‌های صحرایی نیز می گردد و اثر درمانی بتائین در این خصوص چگونه است.

روش بررسی

۴۲ موش صحرایی بالغ نر از نژاد اسپراگ-داولی (وزن ۱۷۰-۱۵۰ گرم) در یک شرایط طبیعی از نظر نور و دما با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها به طور کاملاً اخلاقی و طبق پروتکل اخلاقی (SM 90.36) دانشگاه علوم پزشکی لرستان درمان شدند. همه آزمایشات در ساعات ۸ صبح تا ۵ عصر برای جلوگیری از تغییرات ریتم شبانه روزی انجام گردید.

موش‌های صحرایی به شش گروه مساوی تقسیم گردیدند. وزن‌گیری و مصرف غذا در فواصل ۵ روزه مشخص گردید و به مدت ۱۰ روز پیوسته به صورت خوراکی با استفاده از گاواژ درمان گردیدند. گروه‌ها به صورت زیر درمان شدند: گروه کنترل دریافت یک میلی لیتر آب مقطر، گروه لوودوپا که با لوودوپا به میزان ۱۰۰×۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی در ساعات ۸/۵ صبح، ۱۲/۵ ظهر و ۴/۵ عصر درمان شدند، گروه بتائین که بتائین ۱/۵ درصد وزنی به وزنی جیره را در ساعت ۸ صبح دریافت کردند، گروه لوودوپا+بتائین با لوودوپا ۱۰۰× ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در فواصل ۴ ساعته + بتائین ۱/۵ درصد وزنی به وزنی جیره در ساعت ۸ صبح درمان شدند، گروه لوودوپا+بنسرازید که با لوودوپا ۱۰۰×۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بنسرازید ۲۵×۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم در فواصل ۴ ساعته دریافت نمودند و در نهایت گروه لوودوپا+ بتائین+بنسرازید که با لوودوپا، بتائین و بنسرازید مطابق با دوزهای ذکر شده فوق درمان شدند. روزانه قبل از تجویز، بتائین، لوودوپا و بنسرازید در آب مقطر محلول گردیدند. دوزهای لوودوپا و بنسرازید بر اساس گزارش قبلی مشخص شد(۹) و دوز بتائین با توجه به کارهای قبلی نویسندگان تعیین گردید(۱،۱۲،۵،۲). ۲ ساعت پس از آخرین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

گاواژ موش‌ها با استفاده از بیهوشی خفیف با دی اتیل اتر کشته شدند. نمونه‌های خون از قلب برای تهیه سرم و پلاسما گرفته شد، سپس کبد از داخل محوطه شکمی خارج گردید و با استفاده از بافر فسفات تمیز شد. نمونه‌های سرم، پلاسما و کبد در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات به مدت ۲ ماه نگهداری شدند.

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل: دوپامین هیدروکلراید، متانول و تیوباربیتوریک اسید (مرک- آلمان)، کیت‌های ارزیابی آنزیم‌های SOD, GPx (راندوکس – انگلیس)، و بنسرازید (روش- نیوزلند)، بتائین (بتافین ۹۶٪) (بیوکم- آلمان)، کیت ارزیابی هموسیستئین اگزیس (اگزیس شیلد- انگلیس) بود و لوودوپا با حمایت معنوی شرکت جالینوس استان البرز- کرج فراهم گردید. بقیه مواد از درجه خالص بودند.

غلظت دوپامین در سرم با استفاده از روش HPLC همچنان که قبلاً توضیح داده شده است(۱۹) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۲۵۰ میکرولیتر سرم با استفاده از ۱۲۵ میکرولیتر اسید پرکلریک ۲ مولار رسوب داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ RPM سانتریفیوژ گردید و مایع رویی ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC (شیمادزو- ژاپن) تزریق گردید. کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس با دتکتور UV و ستون فاز معکوس ۱۸mm -۲۵۰×۴/۶RP و ۵µM قطر ذرات در این مطالعه استفاده گردید. مخلوطی از بافر فسفات KH_2PO4؛ PH=۲/۵ و متانول با نسبت مساوی و جریان یک میلی لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. دمای ستون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آون (CTO -10 ASVP) نگهداری شد. غلظت دوپامین به صورت میلی‌مولار در میلی‌لیتر از سرم (mmol/ml) بیان شد.

هموسیستئین کل از پلاسما که به مجموع باند شده به پروتئین، فرم اکسید شده و فرم احیاء آن برمی‌گردد به وسیله یک کیت آنزیماتیک هموسیستئین بر اساس روش الیزا رقابتی مشخص گردید(۱،۲۰،۲۱) و غلظت هموسیستئین کل به صورت میکرومول در لیتر پلاسما بیان گردید.

نمونه‌های کبد موش‌های صحرایی از حالت انجماد خارج و لوب های یکسانی از کبد به صورت دستی با استفاده از بافر فسفات (۱/. مولار با PH=۷/۴)، حاوی ۵ میلی‌مولار EDTA بر روی ازت مایع هموژنیزه شدند(۱،۲). محلول رویی به وسیله سانتریفیوژ در ۲۰۰۰ RPM به مدت ۱۵ دقیقه برای ارزیابی شاخص پراکسیداسیون لیپید (غلظتTBARS)، فعالیت آنزیم‌های GPx و SOD و اندازه‌گیری پروتئین برداشته شد. محتوای پروتئین از هموژنیزه‌ها با استفاده از روش لوری و به وسیله سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد انجام گردید(۲۲).

میزان پراکسیداسیون لیپید در بافت هموژنیزه کبد به وسیله تعیین مقدار مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک بر اساس روش قبلی اندازه‌گیری شد(۱،۲،۱۲). 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 تری‌کلرواستیک اسید ۱۲/۵٪ بود، واکنش متوقف گردید. پس از اضافه نمودن ۷۸۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید 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 نوری 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.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در بافت کبد با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده کیت اندازه‌گیری شد(۱،۲،۱۲). ارزیابی فعالیت آنزیم به وسیله اسپکتروفتومتر (S2000 UV model- WPA- UK Cambridge,) در مقابل بلانک در طول موج ۳۴۰ نانومتر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

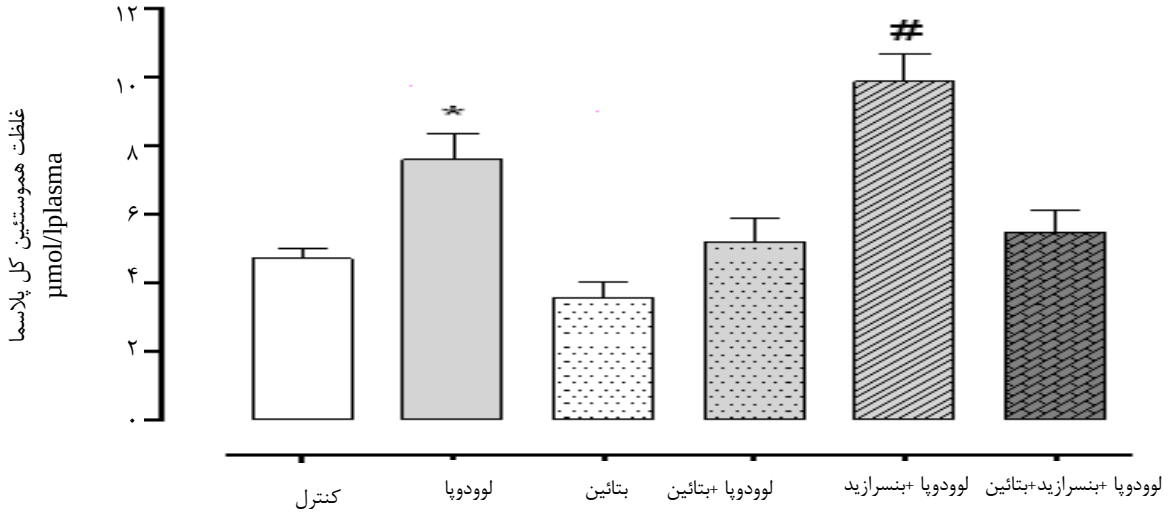
انجام گرفت. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به صورت واحد (U/mg protein) بیان گردید. (یک واحد از آنزیم چنین تعریف می‌شود: میزانی از آنزیم در میلی‌گرم پروتئین بافت که یک میکرومول از NADH را در واحد زمان (یک دقیقه) تبدیل به NAD می‌کند).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده کیت اندازه‌گیری شد(۲،۱،۱۲). یک واحد از سوپراکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که موجب مهار ۵۰٪ از واکنش احیاء ۲-۴-یدوفنیل۳-۴نیتروفنل۵-فنیل تترازولیوم (I.N.T) تحت شرایط آزمایش می‌شود. ارزیابی فعالیت به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵ نانومتر انجام گرفت و به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg protein) بیان گردید.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ انجام گردید. تمام متغیرها برای نرمال بودن واریانس‌ها به وسیله تست آماری لوون بررسی شدند. همه نتایج به صورت میانگین± خطای معیار بیان شدند. تفاوت آماری بین همه گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و تست پشتیبان توکی انجام گرفت و سطح آماری کمتر از p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

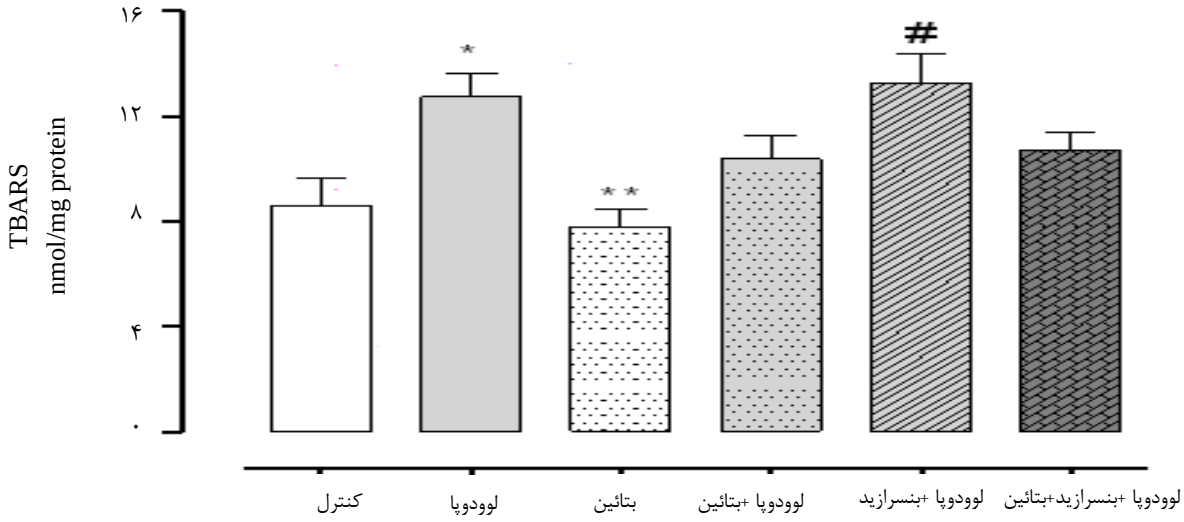
درمان موش‌های صحرایی با لوودوپا+بنسرازید (لوودوپا+ مهارکننده دوپا دکربوکسیلاز) به طور معنی‌داری غلظت هموسیستئین کل پلاسما (tHcy) را در گروه لوودوپا+ بتائین(LD/Ben) در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش داد (p<۰/۰۵). در حالی که تجویز بتائین در گروه LD/Bet توانست از افزایش tHcy نسبت به گروه لوودوپا LD جلوگیری کند (p<۰/۰۵) (شکل ۱).



شکل ۱: اثرات درمان با لوودوپا، بتائین و بنسرازید بر غلظت هموسیستئین پلاسما در میان گروه‌های درمان و کنترل (تعداد ۷ موش در هر گروه)
مقادیر بیانگر میانگین± خطای معیار از هموسیستئین کل (میکرو مول در لیتر پلاسما) است. # تفاوت آماری بین گروه لوودوپا+بنسرازید و بقیه گروه‌ها را نشان می‌دهد(p<۰/۰۵) * تفاوت آماری بین گروه لوودوپا با گروه‌های کنترل، بتائین و لوودوپا+بتائین را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

پراکسیداسیون لیپید (غلظت TBARS) به طور معنی‌داری در موش‌های درمان شده با لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (p<۰/۰۵). همچنین غلظت TBARS در موش‌های درمان شده با بتائین در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید کاهش یافت (p<۰/۰۵)، (شکل ۲).

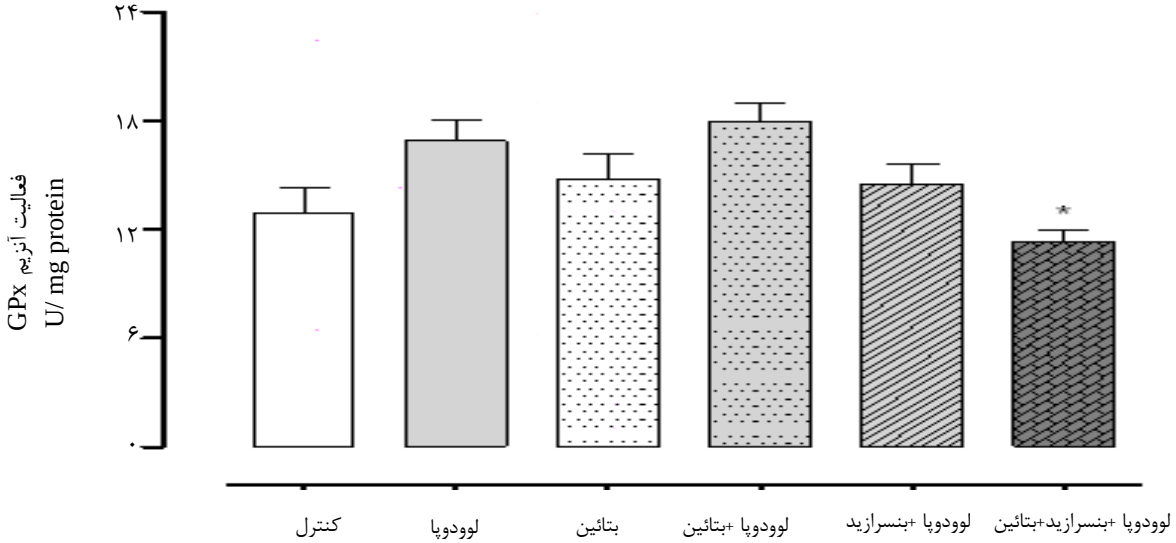
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]



شکل ۲: اثرات درمان با لوودوپا، بتائین و بنسرازید بر غلظت مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک (شاخص پراکسیداسیون لیپید) در گروه‌های درمان و کنترل (تعداد ۷ موش در هر گروه)

مقادیر بیانگر میانگین±خطای معیار از غلظت مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک (نانومول در میلیگرم پروتئین از بافت کبد) است. * تفاوت آماری را بین گروه لوودوپا با گروه کنترل نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$). # تفاوت آماری بین گروه لوودوپا+بنسرازید با گروه کنترل را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$). ** تفاوت آماری را بین گروه بتائین با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

میانگین فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز(SOD) از بافت کبد در گروه کنترل و گروه‌های مورد آزمایش در شکل‌های ۳ و ۴ ارائه شده است. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان مهمترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در موش‌های درمان شده با لوودوپا+ بتائین+ بنسرازید به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین کاهش یافته است ($p<۰/۰۵$)، (شکل ۳).

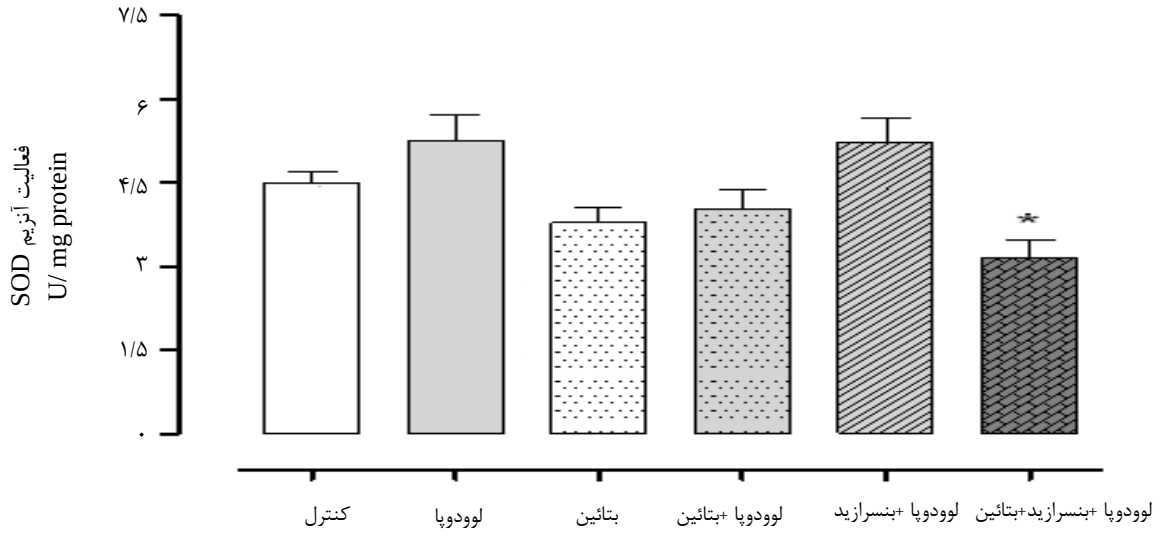


شکل ۳: اثرات درمان با لوودوپا، بتائین و بنسرازید بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های درمان و کنترل (تعداد ۷ موش در هر گروه)

مقادیر بیانگر میانگین±خطای معیار از فعالیت آنزیم GPx (واحد در میلی‌گرم پروتئین از بافت کبد) است. * تفاوت آماری بین گروه لوودوپا+بتائین+بنسرازید با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

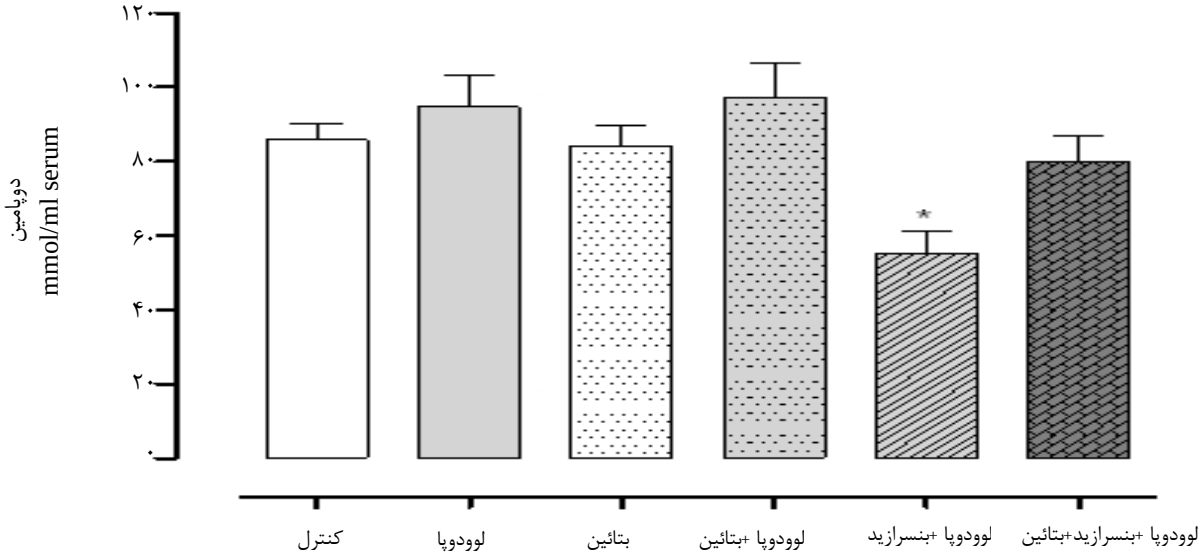
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدان دیگر نیز در گروه لوودوپا+بتائین+بنسرازید به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین کاهش یافت (p<۰/۰۵)، (شکل ۴).



شکل ۴: اثرات درمان با لوودوپا، بتائین و بنسرازید بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های درمان و کنترل (تعداد ۷ موش در هر گروه)
مقادیر بیانگر میانگین±خطای معیار از فعالیت آنزیم SOD (واحد در میلیگرم پروتئین از بافت کبد) است. * تفاوت آماری بین گروه لوودوپا+بتائین+بنسرازید با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

در رابطه با متابولیسم لوودوپا در بافت‌های محیطی، غلظت دوپامین سرم به طور معنی‌داری در موش‌های درمان شده با لوودوپا در مقایسه با گروه لوودوپا+بنسرازید افزایش یافت (p<۰/۰۵). علاوه بر این، درمان با لوودوپا+بتائین سطح دوپامین سرم را به صورت معنی‌دار در مقایسه با درمان لوودوپا+بنسرازید افزایش داد (p<۰/۰۵) (شکل ۵).



شکل ۵: اثرات درمان با لوودوپا، بتائین و بنسرازید بر میزان دوپامین سرم در گروه‌های درمان و کنترل (تعداد ۷ موش در هر گروه)
مقادیر بیانگر میانگین±خطای معیار از دوپامین (میلی مول در میلی لیتر سرم) است.* تفاوت آماری بین گروه لوودوپا+بنسرازید با گروه‌های لوودوپا+بتائین و لوودوپا را نشان می‌دهد(p< ۰/۰۵).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

بحث

شواهد فراوانی برای وجود استرس اکسیداتیو ناشی از لوودوپا در بیماران مبتلا به پارکینسون وجود دارند(۱۴) و بر اساس مطالعات قبلی مشخص گردید که مصرف مزمن لوودوپا و بنسرازید سبب افزایش استرس اکسیداتیو در کلیه(۱۸) و همچنین در بخش خاکستری مغز و مخچه می‌گردد. با این حال، هنوز تأثیر استرس اکسیداتیو افزایش یافته به وسیله لوودوپا و بنسرازید در بیماران مبتلا به پارکینسون سبب القاء استرس اکسیداتیو در بافت کبد، به عنوان مهمترین ارگان مسئول متابولیسم داروها، مشخص نیست. نتایج این مطالعه برای اولین بار اثرات آنتی‌اکسیدانی بتائین را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از لوودوپا و بنسرازید در کبد موش‌های صحرایی نشان داد. در مطالعه حاضر مشخص گردید که بتائین سطح آنتی‌اکسیدانی کبد را افزایش و بالطبع آن پراکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهد. نتایج نشان دادند که درمان با لوودوپا+بنسرازید به عنوان داروی جدید در درمان بیماری پارکینسون استرس اکسیداتیو را در بافت کبد القاء می‌کند. علاوه بر این ترکیب لوودوپا+بنسرازید همچنین باعث افزایش هموسیستئین پلاسما می‌گردد و این اثر نسبت به درمان با لوودوپا به تنهایی قابل توجه است. در مقابل، بتائین به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان در استرس اکسیداتیو القاء شده به وسیله لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید در کبد عمل کند. بتائین همچنین مانع از افزایش هموسیستئین خون گردید و این نتیجه در توافق با مطالعات قبلی است(۱،۲،۱۶).

مشخص شده لوودوپا به عنوان مؤثرترین داروی شناخته شده در درمان بیماری پارکینسون باعث القاء افزایش‌هایی در غلظت کل هموسیستئین پلاسما می‌گردد(۹). فرآیندهای از انتقال گروه‌های متیل در متابولیسم لوودوپا درگیر هستند(۱۰،۲۳). همچنین کاتابولیسم لوودوپا در چندین مرحله با متابولیسم هموسیستئین تداخل می‌کند. در واقع شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند مصرف لوودوپا سطح هموسیستئین را در پلاسما افزایش می‌دهد و قادر است باعث افزایش S-آدنوزیل هموسیستئین (SAH) مغزی گردد(۲۴،۲۵).

در این مطالعه بتائین به عنوان دهنده گروه متیل که به طور پیوسته S-آدنوزیل متیونین (SAM) تولید می‌کند، توانست سطح کل هموسیستئین پلاسما را به صورت معنی‌داری در گروه لوودوپا+بتائین در مقایسه با موش‌های درمان شده با لوودوپا کاهش دهد. این اثر بتائین با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد(۱،۲،۱۶). در مطالعه حاضر لوودوپا در حضور بنسرازید به وسیله آنزیم کتکول o-متیل ترانسفراز (COMT) به ۳-o-متیل دوپا متابولیزه شده است. COMT آنزیم ضروری برای o-متیلاسیون لوودوپا است که نیازمند انتقال یک گروه متیل از SAM بوده(۱۲) و پیامد آن SAM به SAH تبدیل و سپس به هموسیستئین تبدیل می‌گردد. در این مطالعه، نتیجه هموسیستئین برای موش‌های درمان شده با لوودوپا+بنسرازید به خوبی قابلیت در دسترس بودن لوودوپا و افزایش هموسیستئین را در این گروه به صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان می‌دهد. بنابراین تصور می‌شود که یک تعادل مشخص بین لوودوپا و بتائین در طول این پروتکل درمانی انجام شده است. در واقع بتائین به عنوان یک ماده پیشگیری کننده از افزایش هموسیستئین خون در گروه‌های لوودوپا+بتائین و لوودوپا+بتائین+بنسرازید عمل کرده است.

در مطالعه حاضر، مصرف لوودوپا و بنسرازید به طور معنی‌داری غلظت TBARS را به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در موش‌های درمان شده با لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید را نسبت به گروه کنترل افزایش داد و درمان با بتائین توانست این غلظت افزایش یافته را نزدیک به گروه کنترل بازگرداند. به عبارت دیگر تفاوت‌های معنی‌داری بین گروه لوودوپا+بتائین و لوودوپا+بتائین+بنسرازید با گروه کنترل برای مارکر پراکسیداسیون لیپید وجود نداشت که نشان‌دهنده اثر حفاظتی بتائین در کبد موش‌های درمان شده با بتائین است. گروه بتائین همچنین سطح کاهش یافته معنی‌داری از TBARS را در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید نشان داد. نتایج پراکسیداسیون لیپید به خوبی با مطالعه پیشین در خصوص استرس اکسیداتیو ناشی از لوودوپا در کلیه موش‌های

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

صحرایی یکسان بود(۱۸). اعتقاد بر این است که بتائین نقش معنی‌داری در نگهداری پایداری و کارکرد غشاء سلول‌ها بازی می‌کند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بتائین به وسیله شرکت کردن در فرآیندهای 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،۵،۲۶).

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌ها از صدمات اکسیداتیو به وسیله یکسری از مکانیسم‌های سلولی که آسیب اکسیداتیو را در بدن کنترل می‌کنند، پیشگیری می‌کنند(۲۹-۱،۲۷). سیستم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون نقش اساسی در دفاع سلولی علیه گونه‌های فعال اکسیژن بازی می‌کند. علاوه‌براین آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز آسیب پراکسیداتیو را به وسیله خنثی کردن رادیکال‌های سوپراکسید از بین می‌برد(۲،۲۶). در این مطالعه، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز هر دو به صورت غیرمعنی‌داری در موش‌های درمان شده با لوودوپا و لوودوپا+ بنسرازید در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. به خوبی شناخته شده که آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم کلیدی هست که آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند(۱،۲). اگر چه آب اکسیژنه خود یک ترکیب فعال نیست اما می‌تواند به متابولیت فعال رادیکال‌های هیدروکسیل احیاء گردد(۱،۲،۱۶). بنابراین آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان مهمترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی در موش‌های درمان شده با لوودوپا و لوودوپا+ بنسرازید به صورت جبرانی افزایش یافت تا استرس اکسیداتیو به وجود آمده را متوقف کند، ولی موفق نبود. این یافته مطابق با مطالعات قبلی با استفاده از اتانول به عنوان یک ماده اکسیدان در مخچه و بیضه موش‌های صحرایی نیز می‌باشد(۱،۲). در این مطالعه افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در کبد به خوبی با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان آنزیم تبدیل‌کننده رادیکال‌های سوپراکسید به آب اکسیژنه کم خطرتر، همراه شده است(۱) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بنسرازید در مقایسه با گروه کنترل به صورت جبرانی افزایش ملایمی داشته است. افزایش این آنزیم‌ها به صورت جبرانی، از طریق تأثیر ماده اکسیدان بر عناصر پاسخ‌دهنده آنتی‌اکسیدانی (Antioxidant response elements) موجود در پروموتور ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد(۱). بنابراین، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها به صورت جبرانی در زمانی که ماده استرس‌زا وجود دارد، نوعی دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است تا سطح استرس را کم کند و مانع از پراکسیداسیون لیپید گردد هرچند به علت شدت استرس، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها به صورت جبرانی نتوانسته مانع از پراکسیداسیون لیپید گردد.

لوودوپا به وسیله چهار مسیر متابولیسمی مهم شامل: دکربوکسیلاسیون، o-متیلاسیون، ترانس آمیناسیون و اکسیداسیون متابولیزه می‌گردد. مهمترین مسیر دکربوکسیلاسیون است جایی که دوپامین به وسیله آنزیم آمینو اسید دکربوکسیلاز تشکیل می‌گردد(۱۹). در مطالعه حاضر لوودوپا با یک مهارکننده دوپا دکربوکسیلاز (بنسرازید) تجویز شد، به صورتی که مانع از متابولیسم دوپامین در بافت‌های محیطی گردد و بنابراین نفوذ دوپامین به سیستم اعصاب مرکزی افزایش می‌یابد(۱۳). تجویز بنسرازید همراه با لوودوپا با افزایش متابولیسم لوودوپا به ۳-o-متیل دوپا به وسیله آنزیم کتکول o-متیل ترانسفراز در بافت‌های محیطی همراه شد، بنابراین غلظت سرمی دوپامین در موش‌های درمان شده با لوودوپا+ بنسرازید در مقایسه با گروه‌های لوودوپا و لوودوپا+بتائین کاهش یافت. در واقع بنسرازید به عنوان یک ترکیب مهارکننده مانع از تبدیل لوودوپا به دوپامین و در نتیجه سبب کاهش دوپامین در سرم موش‌های گروه لوودوپا+بنسرازید گردید. اگرچه دوپامین از سد خونی-مغزی عبور نمی‌کند، ولی اندازه‌گیری آن در سرم میزان متابولیسم آن را در بافت‌های محیطی و در نهایت میزان لوودوپا باقیمانده را جهت ورود به سیستم اعصاب مرکزی و تبدیل شدن به دوپامین مشخص می‌کند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که بتائین ممکن است

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

یک پتانسیل آنتی‌اکسیدانی محافظت‌کننده در پیشگیری از استرس اکسیداتیو، حاصل از داروهای مورد استفاده در درمان پارکینسون، در کبد و افزایش هموسیستئین خون در موش‌های صحرایی داشته باشد. به هر حال مطالعات بیشتری شامل ارزیابی آنزیم‌های کلیدی کبد و تست‌های کارکرد کبدی در یک مدل حیوانی پارکینسونیسم باید انجام گردد تا دقیقاً اثرات سودمند بتائین را در پیشگیری از اثرات جانبی لوودوپا و بنسرازید بر بافت کبد مشخص شود.

سپاسگزاری

منابع مالی این مطالعه از محل گرانت مربوط به دکتر مسعود علیرضایی از اعتبارات پژوهشی دانشگاه لرستان فراهم شده است و از شرکت جالینوس تهران به خاطر حمایت معنوی در فراهم کردن لوودوپا تقدیر و تشکر می‌گردد.

References:

1- 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): 605-12.

2- Alirezaei M, Jelodar G, Ghayemi Z. ***Antioxidant defense of betaine against oxidative stress induced by ethanol in the rat testes.*** Int J Pept Res Ther 2012; 18(3): 239-47.

3- 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): 421-27.

4- Nissinen E, Nissinen H, Larjonmaa H, Vaananen A, Helkamaa T, Reenila I, et al***. The COMT inhibitor, entacapone, reduces levodopa-induced elevations in plasma homocysteine in healthy adult rats.*** J Neural Transm 2005; 112(9): 1213-21.

5- Basma AN, Morris EJ, Nicklas WJ, Geller HM. ***L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via auto-oxidation.*** J Neurochem 1995; 64(2): 825-32.

6- Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. ***Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage.*** J Neurosci Res 2002; 70(5): 694-702.

7- Bleich S, Degner D, Sperling W, Bönsch D, Thürauf N, Kornhuber J. ***Homocysteine as a neurotoxin in chronic alcoholism.*** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat 2004; 28(3): 453-64.

8- Lutz UC. ***Alterations in homocysteine metabolism among alcohol dependent patients–clinical, pathobiochemical and genetic aspects.*** Curr Drug Abuse Rev 2008; 1(1): 47-55.

9- Muller T, Renger K, Kuhn W. ***Levodopa-associated increase of homocysteine levels and sural axonal neurodegeneration.*** Arch Neurol 2004; 61(5): 657-60.

10- Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. ***Plasma homocysteine and LD metabolism in patients with parkinson disease.*** Clin Chem 2001; 47: 1102-14.

11- Rogers JD, Sanchez-Saffon A, Frol AB, Diaz-Arrastia R. ***Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease.*** Arch Neurol 2003; 60(1): 59-64.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

12- Muller T, Jugel C, Ehret R, Ebersbach G, Bengel G, Muhlack S, et al. ***Elevation of total homocysteine levels in patients with Parkinson´s disease treated with duodenal levodopa/carbidopa gel.*** J Neural Transm 2011; 118(9): 1329-33.

13- Muller T, Erdmann C, Muhlack S, Bremen D, Przuntek H, Goetze O, et al. ***Pharmacokinetic behaviour of levodopa and 3-O-methyldopa after repeat administration of levodopa/carbidopa with and without entacapone in patients with Parkinson's disease.*** J Neural Transm 2006; 113(10): 1441-48.

14- Jenner P. ***Oxidative Stress in Parkinson's Disease***. Ann Neurol 2003; 53(Suppl 3): S36-38.

15- Ossig C, Reichmann H. ***Treatment of Parkinson's disease in the advanced stage***. J Neural Transm 2013; 120(4): 523-29.

16- 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): 281-90.

17- Kheradmand A, Alirezaei M, Dezfoulian O. ***Cadmium-induced oxidative stress in the rat testes: protective effects of betaine.*** Int J Pept Res Ther 2013; 19(4): 337-44.

18- Alirezaei M. ***Betaine as a methyl donor and an antioxidant agent in levodopa-induced hyperhomocysteinemia and oxidative stress in the rat kidney***. Iran J Vet Med 2014; 8(2): 91-99.

19- Muzzi C, Bertocci E, Terzuoli L, Porcelli B, Ciari I, Pagani R, et al. ***Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and α-methyldopa by HPLC.*** Biomed Pharmacotherap 2008; 62(4): 253-58.

20- Golbahar J, Aminzadeh MA, Hamidi SA, Omrani GR. ***Association of red blood cell 5-methyltetrahydrfoate folate with bone mineral density in postmenopausal Iranian women.*** Osteop Int 2005; 16(12): 1894-98.

21- Karthikeyan G, Thachil A, Sharma S, Kalaivani M, Ramakrishnan L. ***Elevated high sensitivity CRP levels in patients with mitral stenosis and left atrial thrombus.*** Int J Cardiol 2007; 122(3): 252-54.

22- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. ***Protein measurement with the Folin phenol reagent.*** J Biol Chem 1951; 193: 265-75.

23- Benson R, Crowell B Jr, Hill B, Doonquah K, Charlton C. ***The effects of L-dopa on the activity of methionine adenosyltransferase: relevance to L-dopa therapy and tolerance.*** Neurochem Res 1993; 18(3): 325-30.

24- Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. ***Effect of L-dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats.*** Clin Neuropharmacol 1997; 20(1): 55-66.

25- Liu XX, Wilson K, Charlton CG. ***Effects of LD treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of LD.*** Life Sci 2000; 66(23): 2277-88.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

26- Ganesan B, Buddhan S, Anandan R, Sivakumar R, Anbinezhilan R. ***Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats.*** Mole Biol Rep 2010; 37(3): 1319-27.

27- Vajragupta O, Boonyarat C, Murakami Y, Tohda M, Musatmoto K, Olson AJ, et al. ***A novel neuroprotective agent with antioxidant and nitric oxide synthase inhibitory action.*** Free Radic Res 2006; 40(7): 685-95.

28- Wang ZJ, Liang CL, Li GM, Yu CY, Yin M. ***Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices.*** Chem Biol Interact 2006; 163(3): 207-17.

29- Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. ***Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis.*** Neurochir Res 2010; 35: 1-12.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

Hepatoprotective Effects of Betaine Against Oxidative Stress Induced by Levodopa and Benserazide in Rats

Alirezaei M(PhD)*[1], Chehari K(MSc)[2]

[1,2]*Department of Biochemistry, Lorestan University, Khorram Abad, Iran*

Received: 17 Jun 2014 ***Accepted:*** 13 Nov 2014

Abstract

Introduction: Betaine has been demonstrated to have methyl donor and antioxidant properties in our previous reports. Thus, the aim of the present study was to determine plasma homocysteine concentration and evaluate antioxidant activity of betaine following levodopa and benserazide administration, which routinely are used in treatment of Parkinson's disease in liver of rats.

Methods: Sprague–Dawley male rats were treated by levodopa (LD), Betaine (Bet.), levodopa plus betaine (LD/Bet.), levodopa plus benserazide (LD/Ben.), levodopa plus betaine-benserazide (LD/Bet.-Ben.) and distilled water to controls for 10 consecutive days, orally. Plasma homocysteine concentration was measured by ELISA method. Moreover, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation amount were measured via chemical methods. Serumic dopamine concentration was also determined by HPLC method and data were analyzed by One-way ANOVA test.

Results: The study results indicated that the treatment of rats with levodopa and benserazide significantly increased total homocysteine (tHcy) in plasma of the LD/Ben. group in comparison with the other groups ($p < 0.05$). tHcy concentration was also significantly higher in LD group in comparison with control, betaine and LD/Bet. groups. Lipid peroxidation (TBARS) amount of liver increased significantly in LD/Ben. group when compared to the control group which this index decreased by betaine treatment. In contrast, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in liver were significantly higher in the LD-treated rats as compared to the LD/Ben. group. Serumic dopamine concentration decreased significantly in LD/Ben.-treated rats in comparison with LD and LD/Bet. groups.

Conclusion: Taken together, it seems that betaine acts as an antioxidant agent regarding decrease of LD/Ben.-induced oxidative stress and is able to decrease their oxidative effects in liver of rats.

***Kewwords*:** Benserazide; Betaine; Dopamine; Homocysteine; Levodopa; Liver

This paper should be cited as:
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.

Corresponding author: Tel: +98 9374176061, Email:: Alirezaei.m@lu.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]