

## بررسی تأثیر مکمل‌یاری با کراتین بر حافظه، یادگیری و آپوپتوز بعد از تزریق بتا‌آمیلوئید در موش‌های صحرایی نر ویستار

مالک علی محمدی<sup>1</sup>، حمیده پیشوا<sup>2</sup>، محمد رضا اشراقیان<sup>3</sup>، محمد رضا زرین دست<sup>4</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه سلولی- مولکولی، دانشکده علوم تغذیه و رژیم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: استادیار گروه سلولی- مولکولی، دانشکده علوم تغذیه و رژیم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، پست الکترونیکی: pishvahm@tums.ac.ir

2- استاد گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

3- استاد گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ پذیرش: 93/6/16

تاریخ دریافت: 93/2/30

### چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به تأثیر مثبت کراتین بر عملکرد شناختی در افراد سالم، این مطالعه با هدف تعیین اثر مکمل کراتین بر حافظه و یادگیری و آپوپتوز بعد از تزریق بتا‌آمیلوئید، در موش‌های صحرایی نر ویستار انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** بیست و چهار موش صحرایی نر ویستار با وزن  $250 \pm 50$  گرم به 3 گروه 8تایی تقسیم شدند. تزریق بتا‌آمیلوئید (2 میکروگرم در هر CA1) در دو گروه انجام گرفت که از این دو گروه یک گروه بعد از تزریق، شروع به دریافت رژیم غذایی حاوی 2% کراتین نموده (گروه AdCr+) و گروه دیگر رژیم غذایی معمولی دریافت کرد (گروه AdCr-). به گروه Sham تزریق نرمال سالین در ناحیه CA1 انجام گردیده و رژیم غذایی معمولی ارائه شد. شش هفته بعد از تزریق بتا‌آمیلوئید، آزمون ماز آبی موریس و ماز Y شکل، جهت بررسی یادگیری و حافظه انجام گرفت. در پایان آزمون تانل جهت بررسی آپوپتوز در گروه‌های مورد مطالعه انجام گرفته و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** دو گروه AdCr+ و AdCr- در آزمون‌های ماز آبی و ماز Y شکل، عملکرد ضعیف‌تری نسبت به گروه Sham داشتند و درصد نورون‌های تانل مثبت در گروه AdCr- و AdCr+ بیشتر از گروه Sham بود هیچ گونه تفاوت معنی‌داری میان دو گروه AdCr+ و AdCr- از نظر حافظه و یادگیری و درصد نورون‌های تانل مثبت مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** بعد از تزریق بتا‌آمیلوئید، مکمل کراتین هیچ گونه تأثیری بر حافظه و یادگیری و آپوپتوز در موش‌های صحرایی نر ویستار نداشت.

**واژگان کلیدی:** کراتین، بتا‌آمیلوئید، آلزایمر، حافظه، یادگیری، آپوپتوز

### • مقدمه

نورون‌ها موجب بهبود عملکرد مغز گردد (3). به نظر می‌رسد که سطح کراتین مغز با تمرین‌های ذهنی، افزایش می‌یابد (4). افزایش سطح کراتین مغز به دنبال مکمل‌یاری با کراتین هم در انسان و هم در جوندگان دیگر مشاهده گردیده است (7-5). برخی از مطالعات تغییر در میزان تعدیل‌کننده‌های سروتونین و دوپامین در مغز افراد ورزشکار و کاهش حالات شبه افسردگی در جوندگان ماده را به دنبال مصرف مکمل کراتین نشان داده‌اند (8، 9) همچنین مدل‌های حیوانی اثرات محافظت نورونی مکمل‌یاری با کراتین را در بیماری‌های دستگاه عصبی از جمله هانتینگتون و پارکینسون نشان داده‌اند (10، 11، 6) چنین بیان شده است که مکمل‌یاری با کراتین

آلزایمر علت اصلی زوال حافظه در میان‌سالی و سالمندی می‌باشد (1). نقص در حافظه کوتاه مدت و اختلال در حافظه فضایی یکی از نشانه‌های زود هنگام این بیماری می‌باشد (2). اگرچه داروهایی برای بیماران آلزایمری وجود دارد اما تلاش‌ها برای کنترل آلزایمر تاکنون نتیجه‌ای به دنبال نداشته است. با این حال حمایت‌های دارویی و اجتماعی می‌تواند کیفیت زندگی بیماران را تا حدودی ارتقاء بخشد (1).

مطالعات نشان داده است که افزایش ذخیره انرژی نورون‌ها مانند گلوکز موجب بهبود عملکرد مغز می‌شود، با توجه به نقش حیاتی کراتین در هموستاز انرژی نورون‌ها، به نظر می‌رسد که افزایش کراتین نورون‌ها با بهبود وضعیت انرژی

گروه‌ها دریافت رژیم غذایی عادی را ادامه دادند. مداخله رژیمی به مدت 6 هفته انجام گرفت و سپس آزمون‌های رفتاری و سلولی صورت پذیرفت.

**بتا آمیلوئید:** بتا آمیلوئید 42-1 انسانی تهیه شده از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich USA) به مقدار 0/1 میکروگرم، در 200 میکرولیتر آب مقطر، حل شده و قبل از تزریق به مدت 48 ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید.

**جراحی:** ابتدا با تزریق داخل صفاقی کتامین (100 میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) و زایلوزین (10 میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن)، حیوانات بی‌هوش می‌شدند. پس از ثابت کردن کامل سر حیوان در دستگاه استرئوتاگس، و قبل از ایجاد برش در پوست سر، 0/1 میلی لیتر محلول لیدوکائین-اپی نفرین 1% زیر پوست سر حیوان تزریق می‌گردید. مختصات تزریق به صورت 3/9 میلی متر از برگما، سپس 2/2 میلی متر در جهت جانبی از خط وسط و نهایتاً عمق تزریق نیز 2/7 میلی متر بود. (AP=3.9mm, LR=2.2mm, D=2.7mm) تزریق با سرعت 0/5 میکرولیتر در دقیقه توسط سرنگ همیلتون 10 لاند، در ناحیه CA1 هیپوکمپ طرفین مغز انجام گردید. در گروه‌های AdCr- و AdCr+ چهار میکرولیتر (حاوی دو میکروگرم) بتا آمیلوئید در هر هیپوکمپ تزریق گردید. در مورد موش‌های صحرایی گروه Sham تمام مراحل فوق انجام گردید با این تفاوت که به جای بتا آمیلوئید، 4 میکرولیتر محلول نرمال سالین استریل تزریق می‌گردید.

**مخلوط چو و کراتین:** ابتدا به مقدار لازم از چو به وسیله هاون و مخلوط کن برقی، به صورت پودر درمی‌آمد؛ با توجه به این که بهترین تأثیرات محافظت نورونی کراتین در مقدار 2 درصد وزنی گزارش شده است، به مقدار دو درصد وزن چو، کراتین منوهیدرات اضافه شده و بعد از مخلوط کردن با حداقل ممکن از آب، خمیر حاصله در سینی مخصوص پهن شده و قطعه قطعه می‌گردید (11، 10، 6). سپس قطعات به وسیله جریان هوای گرم به مدت 30-40 دقیقه خشک شده و در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت.

**ماز Y شکل:** آزمون ماز Y شکل 6 هفته بعد از تزریق بتا آمیلوئید انجام شد. ماز Y شکل یک جعبه سه‌بازویی (A, B, C) ساخته شده از نئوپان روکش دار می‌باشد. سه بازو مشابه؛ و هر کدام به ترتیب دارای طول، عرض و ارتفاع 30، 30 و 15 سانتی متر می‌باشند. بازوها با زوایای مساوی نسبت به هم قرار می‌گرفتند. در مرکز ماز، بازوها به یک ناحیه مثلث متساوی‌الاضلاع شکلی راه می‌یابند. برای انجام آزمون هر موش صحرایی در انتهای یکی از بازوهای ماز قرار می‌گرفت و اجازه داده می‌شد تا حیوان به صورت آزادانه در مدت 8 دقیقه

موجب کاهش خستگی ذهنی در پی تکرار یک نوع فعالیت ساده ریاضیاتی می‌گردد (12). در ارتباط با حافظه نیز به نظر می‌رسد که مصرف روزانه 5 گرم کراتین به مدت 6 هفته، باعث بهبود عملکرد مغز در ارتباط با حافظه عملی و هوش در افراد سالم می‌گردد (3). اگرچه با مصرف مکمل کراتین در افراد جوان به میزان 0/03 گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن اثری در حافظه کوتاه مدت آنها مشاهده نشده است؛ مصرف 20 گرم مکمل کراتین در روز به مدت یک هفته در افراد سالمند سالم، در بهبود حافظه فضایی و کوتاه مدت مؤثر بوده است (13، 14). همچنین بعد از 24 ساعت محرومیت از خواب تأثیر مثبت مکمل یاری با کراتین بر عملکرد ذهنی در افراد سالم گزارش شده است (15، 16).

با وجود مطالعات انجام شده در افراد سالم که اثرات مثبت کراتین را در بهبود عملکرد ذهنی گزارش نموده‌اند و با این که اثرات محافظت نورونی کراتین در مقابل سمیت بتا آمیلوئید در محیط کشت سلولی گزارش شده است (17)، تا به حال هیچ مطالعه‌ای تأثیر مکمل‌یاری با کراتین بر حافظه و یادگیری در افراد مبتلا به آلزایمر را مورد بررسی قرار نداده است. به نظر می‌رسد که بتا آمیلوئید موجب کاهش فعالیت کراتین کیناز در نورون‌ها می‌گردد (18، 19). اما مشاهده رسوبات کراتین در کالبدشکافی مغز بیماران آلزایمری و همچنین در مغز موش‌های جهش یافته مدل آلزایمر (20)، موجب شده است که نتیجه‌گیری در مورد مفید یا مضر بودن مکمل‌یاری با کراتین در افراد مبتلا به آلزایمر دشوار باشد. لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین تأثیر مکمل یاری با کراتین بر حافظه و یادگیری و آپوپتوز بعد از القای آلزایمر با تزریق بتا آمیلوئید می‌باشد.

## • مواد و روش‌ها

**حیوانات:** این پژوهش طبق اصل چهارم نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (NIH) انجام گرفت. بیست و چهار موش صحرایی نر بالغ ویستار (تهران، انستیتو پاستور) به وزن  $250 \pm 50$  گرم در شروع آزمایش در قفس‌های پلی‌اتیلنی در دمای  $21 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و تحت یک دوره 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی قرار گرفتند. حیوانات در طی آزمایش آزادانه آب و غذا دریافت می‌کردند. بعد از یک هفته مطابقت با محیط حیوانخانه، حیوانات به سه گروه 8 تایی تقسیم شدند. به حیوانات گروه AdCr- و AdCr+ تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه CA1 در هیپوکمپ انجام شده و به حیوانات گروه Sham نرمال سالین در همان ناحیه از هیپوکمپ انجام گردید. بعد از جراحی، گروه AdCr+ دریافت رژیم غذایی حاوی 2% کراتین منوهیدرات را آغاز کرد و سایر

برداشته، آزمایش انجام شده و داده‌ها مطابق با مرحله قبل بررسی می‌شد. در این مرحله از آزمایش به خصوص این نکته مورد توجه قرار می‌گرفت که حیوان در حین آزمایش، بیشترین وقت خود را در کدام یکی از قسمت‌های چهارگانه ماز صرف می‌کند. به عنوان مثال اگر بیشترین زمان، مربوط به قسمتی باشد که قبلاً سکو در آن بوده است، مشخص می‌گردد که حیوان بر اساس علائم بینایی-فضایی سکو را پیدا می‌کرده و این قضیه اتفاقی و یا به دلیل دیدن سکو در زیر آب نبوده است. لازم به ذکر است که در این مرحله از آزمایش هر جلسه الزاماً 60 ثانیه طول می‌کشید و به دلیل عدم وجود سکو پس از پایان مدت، حیوان از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر حیوان یک بار انجام شد (22).

**تثبیت از راه قلب:** بعد از انجام آزمون‌های رفتاری، حیوانات با روش تثبیت از راه قلب کشته شدند. در این روش حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلوزین بیهوش گردیدند. با باز کردن قفسه سینه حیوان، سر سوزن وارد بطن چپ حیوان شده و بعد از بریدن دهلیز راست جریان نرمال سالیان از طریق سوزن وارد گردش خون حیوان شد، بعد از عبور 150 میلی لیتر نرمال سالیان از مسیر گردش خون حیوان و شفاف شدن خون خروجی از دهلیز راست، جریان نرمال سالیان قطع و محلول پارافرمالدهید 4% (در PBS) وارد گردش خون عمومی حیوان می‌گردید. گذشتن 100 میلی لیتر از پارافرمالدهید و کند شدن جریان خروجی از دهلیز راست نشان دهنده تثبیت شدن بافت‌های حیوان بود. با قطع کردن جریان پارافرمالدهید، سر حیوان توسط گیوتین مخصوص قطع شده و مغز حیوان خارج می‌شد.

**تیوفلاوین:** مغزهایی که بعد از تثبیت از راه قلب در پارافرمالدهید 4% قرار داده شده بودند، درون قالب‌های پارافینی قرار گرفتند. برای انجام رنگ آمیزی تیوفلاوین ابتدا توسط میکروتوم، برش‌های 5 میکرونی از مغز تهیه شد. برش‌ها جهت دپارافینه شدن به مدت 5 دقیقه در زایلول قرار گرفتند و سپس جهت دی‌هیدراته شدن به ترتیب دو دقیقه در الکل 100%، 90%، 80% و 70% قرار گرفتند. سپس یک قطره محلول تیوفلاوین (0/5% تیوفلاوین در اسید کلریدریک 0/1 نرمال) فیلتر شده، روی هر یک از برش‌ها قرار داده شد و درون یک محفظه تاریک و مرطوب به مدت 10 دقیقه نگهداری گردید. در پایان برش‌ها در آب مقطر شستشو داده شده و جهت مشاهده پلاک‌ها توسط میکروسکوپ فلئورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

**تائل:** ابتدا از هر مغز دو برش تهیه گردید و جهت رنگ‌آمیزی نورون‌های آپوپتوز مثبت از تست تائل (TUNEL Apoptosis)

در بازوهای ماز حرکت کند. توالی ورود به هر بازوی ماز طی 8 دقیقه به صورت دستی ثبت می‌گردید. سپس امتیاز حافظه فضایی حیوان با تقسیم تریادهای غیرتکراری و یا واقعی بر کل تریادهای ممکنه محاسبه می‌شد (21). به عنوان مثال اگر حیوان با توالی ABA, BAC, ACA, BCA, BAB, ABC به شاخه های ماز وارد می‌شد. حیوان مجموعاً 6 تریاد را طی کرده بود که از این تعداد 3 تریاد واقعی یا غیر تکراری (BAC, BCA و ABC) بود و امتیاز حافظه حیوان 50 از صد محاسبه می‌شد.

**ماز آبی موریس:** آزمون ماز آبی موریس شش هفته بعد از تزریق بتا آمیلوئید و یک روز بعد از انجام ماز Y شکل انجام گردید.

ماز آبی موریس یک تانک با قطر 150 و عمق 50 سانتی-متر است که تقریباً نیمی از آن پر از آب می‌شود. ماز به چهار قسمت مساوی فرضی تقسیم می‌شود و یک سکوی نجات با ارتفاع 25 سانتی‌متر در یکی از چهار قسمت قرار می‌گیرد. به طوری که بین 1-2 سانتی‌متر زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نیست.

**الف- مرحله سازگاری:** در این مرحله موش‌های صحرایی به مدت دو ساعت در اتاق محل ماز آبی قرار گرفتند. سپس هر یک از آنان به مدت یک دقیقه در تانک آب ماز که سکو در آن قرار نداشت، شنا می‌کردند. تا هم با محیط اتاق و هم با تانک آب آشنایی پیدا کنند.

**ب- مرحله یادگیری یا آموزش:** مرحله یادگیری شامل سه روز پی‌درپی و هر روز شامل چهار بار آموزش بود. با توجه به این که سکو در ربع جنوبی تانک آب قرار داشت، در هر آموزش حیوان به صورت تصادفی در یکی از سمت‌های شمال، شرق، غرب، شمال شرقی و یا شمال غربی، در آب رها می‌گردید. حداکثر زمان آموزش 60 ثانیه از زمان قرار گرفتن حیوان در آب در نظر گرفته شده بود. اگر طی این شصت ثانیه حیوان به طور اتفاقی سکو را پیدا می‌کرد و روی آن قرار می‌گرفت، ده ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شد تا روی سکو بماند و با جست و جوی اطراف و دیدن علائم موجود در آزمایشگاه که با نور کم روشن شده بود، موقعیت خود و در نتیجه سکو را شناسایی کند. سپس حیوان از تانک خارج می‌گردید تا پس از یک دقیقه برای انجام بلاک آموزشی بعدی وارد تانک شود. اما در صورتی که حیوان سکو را پیدا نمی‌کرد. زمان 60 ثانیه برای حیوان ثبت می‌شد ولی بعد از پایان 60 ثانیه حیوان توسط دست به محل سکو هدایت می‌شد و بعد از گذراندن 10 ثانیه روی سکو از تانک خارج می‌گردید

**ج- مرحله آزمون (probe):** در این مرحله (با توجه به این که حیوان محل سکوی نجات را می‌دانست) سکو را از ماز

گروه Sham ( $p=0/0001$ ) بود اما تفاوت معنی‌داری از این نظر میان گروه AdCr+ و AdCr- وجود نداشت ( $p=0/1$ ). (نمودار 1 و جدول 1) این یافته‌ها نشان دهنده اختلال در یادگیری در گروه AdCr+ و AdCr- در مقایسه با گروه Sham و همچنین بی‌تأثیر بودن مکمل کراتین بر نقص در یادگیری ایجاد شده به دنبال تزریق بتا‌آمیلوئید می‌باشد. مقایسه مسافت طی شده جهت یافتن سکو در گروه‌های مطالعه نیز یافته‌های فوق را تأیید می‌نماید (نمودار 2 و جدول 2).

**جدول 1.** میانگین زمان سپری شده جهت یافتن سکو در سه روز آموزش

گروه‌ها	زمان سپری شده جهت یافتن سکو (ثانیه)
Sham	20/89±0/99
AD+CR-	27/89±0/53*
AD+CR+	29/54±1/07**

داده‌ها به صورت میانگین±خطای معیار (SE) بیان گردیده است.  
\*آزمون t مستقل بین دو گروه Sham و AdCr- ( $P=0/001$ ).  
\*\*آزمون t مستقل بین دو گروه AdCr+ و AdCr- ( $P=0/10$ )

**جدول 2.** میانگین مسافت طی شده جهت یافتن سکو در سه روز آموزش

گروه‌ها	مسافت طی شده جهت یافتن سکو (سانتیمتر)
Sham	425/77±20/48
AD+CR-	645/13±35/12*
AD+CR+	650/01±24/65**

داده‌ها به صورت میانگین±خطای معیار (SE) بیان گردیده است.  
\*آزمون t مستقل بین دو گروه Sham و AdCr- ( $P=0/002$ )  
\*\* آزمون t مستقل بین دو گروه AdCr+ و AdCr- ( $P=0/45$ )

(Detection kit, Millipore, cat number:17-141, Germany) استفاده گردید. سپس جهت بررسی و مشاهده لام‌ها، از میکروسکوپ فلئوئورسنت استفاده گردید. در پایان درصد نورونهای تانل مثبت در سه تصویر با بزرگنمایی 400x شمارش شد.

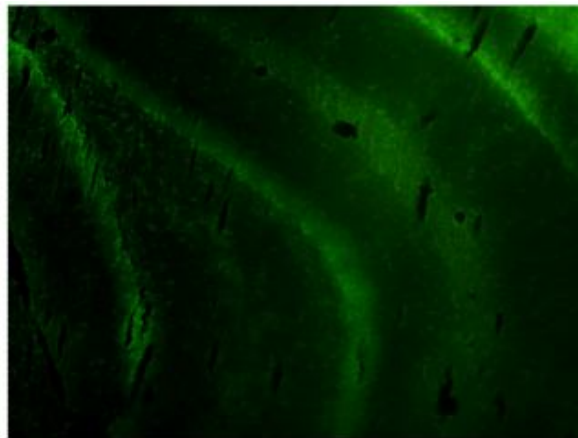
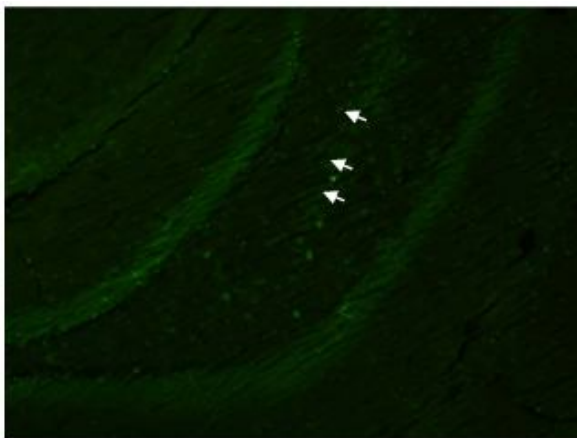
**تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌ها با نرم افزار SPSS.18 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است. برای مقایسه میانگین درصد رفتارهای تناوبی در ماز Y شکل، زمان سپری شده و مسافت طی شده جهت یافتن سکو، زمان سپری شده در ربع محل سکو و درصد سلول‌های تانل مثبت میان گروه‌ها به صورت دو به دو از آزمون t مستقل دو طرفه استفاده گردید.

### • یافته‌ها

**تیوفلاوین:** رنگ‌آمیزی تیوفلاوین جهت تأیید القای آلزایمر و تشکیل پلاک‌های بتا‌آمیلوئید انجام گرفت. پلاک‌های بتا‌آمیلوئید در گروه‌های AdCr+ و AdCr- قابل مشاهده است در حالی که در گروه Sham پلاکی مشاهده نشد. (شکل 1)

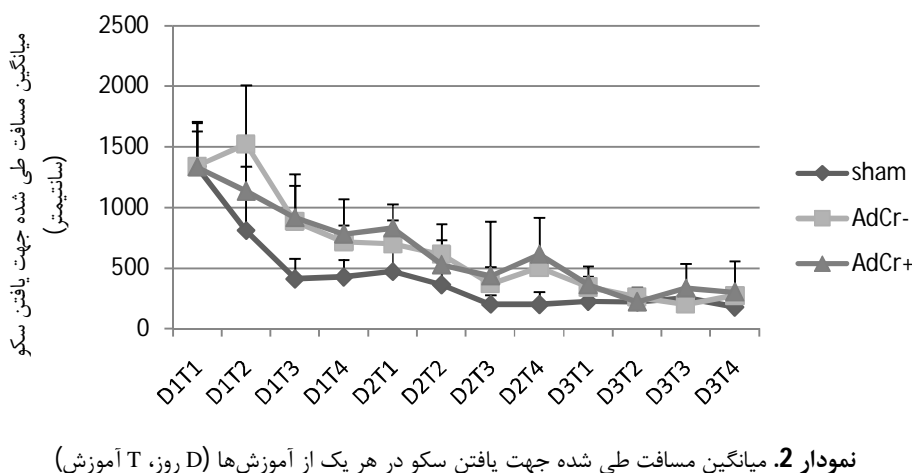
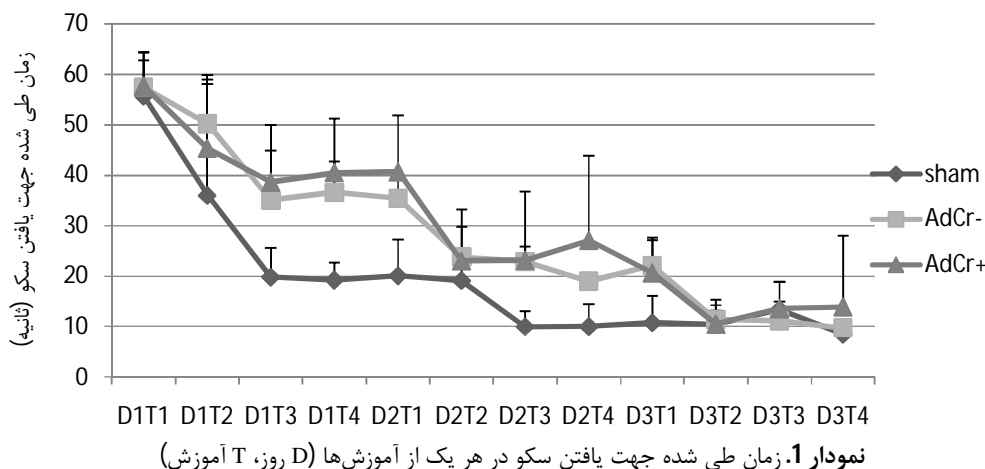
**ماز Y شکل:** میانگین رفتارهای تناوبی در ماز Y شکل در سه گروه مطالعه Sham، AdCr- و AdCr+ به ترتیب برابر 85/00±15/02، 64/13±17/33 و 70/36±18/14 درصد بود که اختلاف گروه‌های AdCr- و Sham معنی‌دار ( $p=0/01$ ) و اختلاف دو گروه AdCr+ و AdCr- از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p=0/44$ ).

**ماز آبی موریس:** زمان سپری شده جهت یافتن سکو در موش‌های صحرایی گروه AdCr- به صورت معنی‌داری بیشتر از



**شکل 1.** مقایسه ناحیه هیپوکمپ مغز در موش‌های صحرایی گروه sham) و گروه آلزایمری (Ad)

فلش‌ها محل تعدادی از پلاک‌ها را مشخص می‌کنند.



آپوپتوز: همان طور که در شکل 2 مشخص است تعداد نورون‌های تانل مثبت در گروه‌های AdCr- و AdCr+ بیشتر از Sham می‌باشد. میانگین درصد نورون‌های تانل مثبت در گروه‌های مطالعه در نمودار 3 قابل مشاهده است. میانگین درصد نورون‌های تانل مثبت در گروه Sham به صورت کاملاً معنی‌داری کمتر از دو گروه AdCr+ و AdCr- ( $p=0/001$ ) و ( $p=0/01$ ) می‌باشد اما دو گروه AdCr+ و AdCr- از نظر درصد نورون‌های تانل مثبت تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند ( $p=0/322$ ). این یافته‌ها نشان می‌دهد که مکمل‌یاری با کراتین بعد از تزریق بتا‌آمیلوئید تأثیری در روند آپوپتوز ناشی از تزریق بتا‌آمیلوئید نداشته است.

در آزمون به خاطر آوری (Probe) گروه AdCr- در مقایسه با گروه Sham زمان کمتری را در ربع محل سکو سپری کردند ( $p=0/01$ ) در حالی که از این نظر تفاوت معنی‌داری با گروه AdCr+ ( $p=0/2$ ) نداشتند. این موضوع نشان می‌دهد که اگرچه بتا‌آمیلوئید باعث اختلال در به خاطر آوری در موش‌های صحرایی گردیده است اما مکمل کراتین تأثیری بر وضعیت این اختلال حافظه نداشته است (جدول 3).

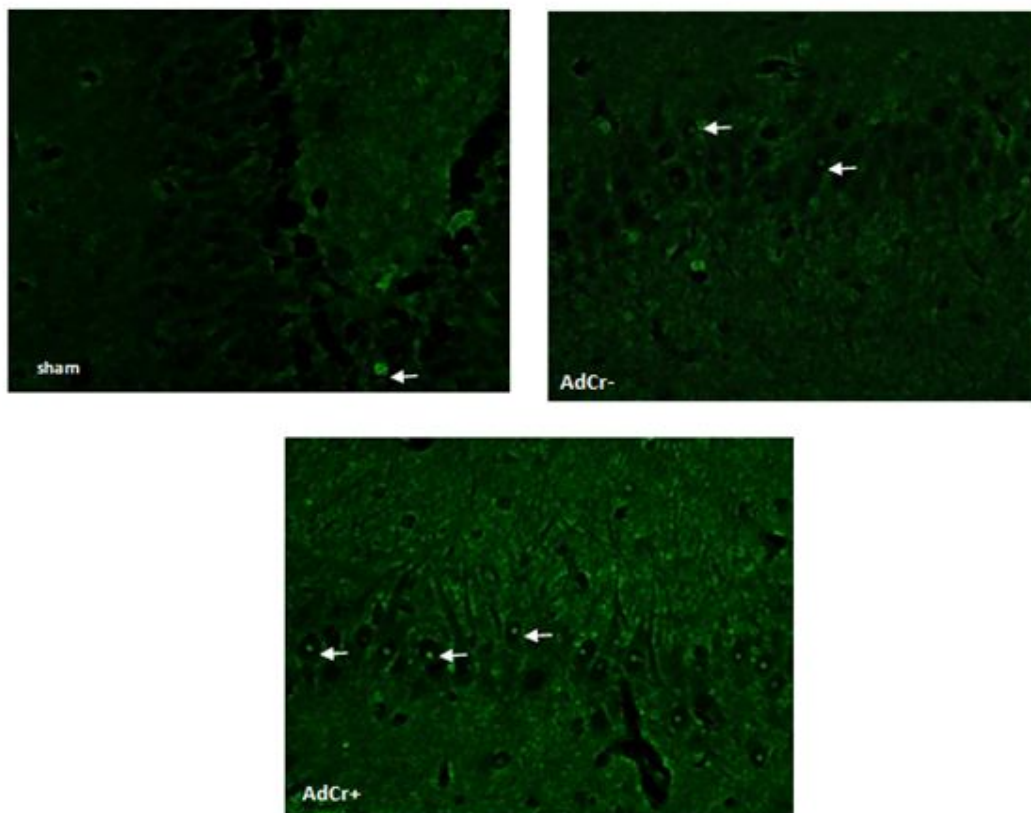
جدول 3. میانگین زمان سپری شده در ربع محل سکو در روز آزمون به خاطر آوری (Prob)

گروه‌ها	زمان سپری شده در ربع محل سکو (ثانیه)
Sham	35/91±0/91
AD+CR-	31/99±0/78*
AD+CR+	30/37±2/00**

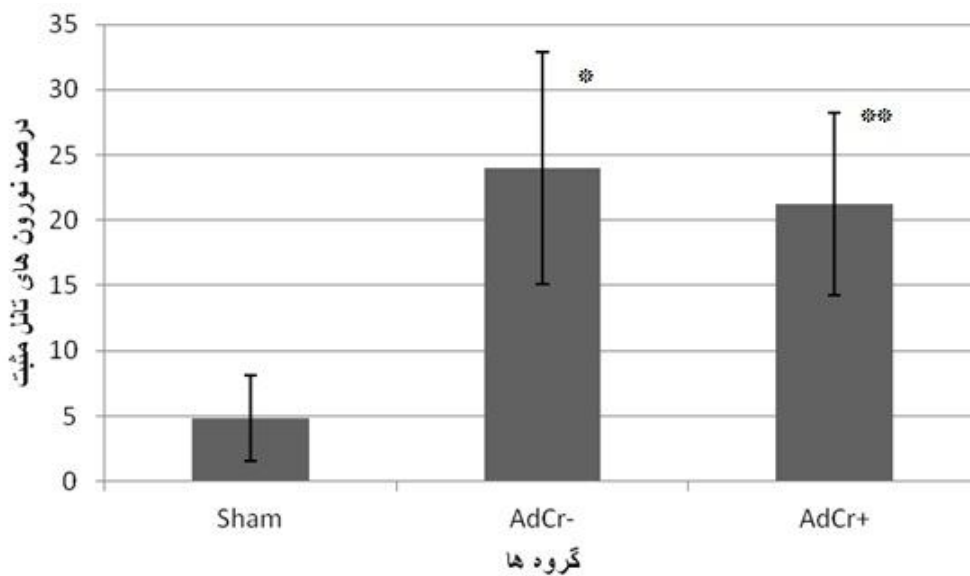
داده‌ها به صورت میانگین±خطای معیار (SE) بیان گردیده است.

\*آزمون t مستقل بین دو گروه Sham و AdCr- ( $P=0/01$ )

\*\*آزمون t مستقل بین دو گروه AdCr- و AdCr+ ( $P=0/23$ )



شکل 2. رنگ آمیزی تانل. تعدادی از نورون‌های تانل مثبت با فلش سفید مشخص شده اند. تعداد نورون‌های تانل مثبت در گروه‌هایی که به آنها بتا آمیلوئید تزریق شده به صورت واضحی بیشتر می‌باشد.



نمودار 3. درصد نورون‌های تانل مثبت در گروه‌های مورد مطالعه

\*آزمون t مستقل بین دو گروه Sham و AdCr- (P=0/001)  
 \*\*آزمون t مستقل بین دو گروه AdCr- و AdCr+ (P=0/32)

## • بحث

صحرائی می‌تواند اعتبار داخلی بالاتری نسبت به سایر مطالعات انجام شده داشته باشد. اگرچه موش‌های صحرائی مانند افراد گیاهخوار کراتین قابل توجهی از رژیم غذایی عادی خود دریافت نمی‌کنند اما تفاوت‌های موجود میان گروه‌های مورد مطالعه، دز مکمل مورد استفاده و نوع آزمون‌های انجام شده از نظر فعالیت مغزی مورد سنجش و انرژی خواه بودن، مقایسه نتایج این بررسی را با کار انجام شده توسط Rae و همکاران و سایرین را دشوار می‌سازد. در نتیجه انجام مطالعات مشابه با آزمون‌های متفاوت و در شرایط متفاوت از نظر خستگی، بی‌خوابی و یا حتی گرسنگی می‌تواند نتایجی متفاوت با مطالعه حاضر به دنبال داشته باشد. علاوه بر اینها مهمترین تفاوت این مطالعه با مطالعات تقریباً مشابه، می‌تواند توجیه کننده نتایج متفاوت آن در مقایسه با اکثر مقالات بوده و آن هم الفا آلیزایمر در موش‌های صحرائی با استفاده از تزریق بتاآمیلوئید می‌باشد. تأثیر بتاآمیلوئید در کاهش فعالیت کراتین کیناز نورون‌ها در بیماران مبتلا به آلیزایمر و همچنین در مدل‌های تجربی آلیزایمر گزارش شده است (20، 19). کاهش فعالیت کراتین کیناز به میزان 86% هم در یکی از مطالعات گزارش شده است (18). به نظر می‌رسد که این کاهش فعالیت کراتین کیناز در روند پیشرفت بیماری آلیزایمر اهمیت بسیاری دارد و حتی این ادعا وجود دارد که این کاهش فعالیت آنزیم کراتین کیناز، عامل اصلی اختلال در عملکرد شناختی ناشی از افزایش سن و همچنین دلیل زوال عقل در آلیزایمر می‌باشد (19). در مطالعه حاضر، فعالیت در مغز موش‌های صحرائی اندازه‌گیری نگردید. ممکن است کاهش در کراتین کیناز فعالیت کراتین کیناز در نورون‌ها در اثر تزریق بتاآمیلوئید به حدی شدید بوده است که حتی تأمین سوبسترای بیشتر برای این آنزیم با مکمل‌یاری با کراتین، نتوانسته است تأثیری بر عوارض ناشی از کاهش فعالیت این آنزیم در اختلال شناختی در حیوانات داشته باشد (19، 18). اثرات مفید این مکمل در بهبود حافظه و یادگیری که در افراد سالم گزارش شده است (13، 12، 3)، در مدل تجربی آلیزایمر به این دلیل تکرار نگردیده است. البته این احتمال هم وجود دارد که نقش کاهش فعالیت کراتین کیناز در اختلالات شناختی ناشی از افزایش سن و در بیماری آلیزایمر تا حدودی مورد اغراق قرار گرفته باشد. انجام مطالعات مشابه که در آن فعالیت کراتین کیناز مغزی اندازه‌گیری شود می‌تواند صحت و یا عدم صحت این مکانیسم احتمالی را روشن‌تر نماید.

در مطالعه حاضر تزریق تک دز بتاآمیلوئید 42-1 در ناحیه CA1 مغز موش‌های صحرائی نر ویستار موجب اختلال در یادگیری فضایی در ماز آبی موریس گردید. مطالعات متعددی تأثیر تزریق و یا انفوزیون فرگمنت‌های مختلف بتاآمیلوئید را در قسمت‌های مختلف مغز در موش‌های صحرائی بررسی نموده‌اند؛ اگرچه بعضی از این مطالعات دوزهای پایین بتاآمیلوئید را مؤثر و بعضی بی‌تأثیر گزارش کرده‌اند (23)، مطالعه حاضر نشان داد؛ هنگامی که آزمون‌های رفتاری شش هفته بعد از تزریق انجام گیرد، تزریق تک دز بتاآمیلوئید 42-1 به صورت پری فیبریلار (انکوبه شده به مدت 48 ساعت در دمای اتاق) (24) در ناحیه CA1 مغز موش‌های صحرائی می‌تواند موجب اختلال در حافظه فضایی و نه حافظه احترازی غیر فعال (داده‌های مربوط به شاتل باکس گزارش نگردیده است) گردد.

این مطالعه اولین مطالعه ای است که به بررسی تأثیر مکمل یاری با کراتین بر عملکرد شناختی در بیماری آلیزایمر می‌پردازد. در مطالعه حاضر بعد از 6 هفته مکمل یاری، کراتین تأثیر مثبتی در یادگیری و به خاطرآوری در موش‌های صحرائی که با تزریق بتاآمیلوئید دچار اختلال در عملکرد شناختی شده بودند، نداشت. شش مطالعه دیگر که تأثیر مکمل یاری با کراتین را بر عملکرد مغز را مورد مطالعه قرار داده‌اند، تأثیر این مکمل را در افراد سالم مورد بررسی قرار داده‌اند (16-12، 3). از این میان تنها مطالعه‌ای که همسو با مطالعه حاضر تأثیر مثبت مکمل‌یاری با کراتین بر عملکرد مغز را گزارش کرده، مطالعه Rawson و همکاران می‌باشد (14) که در واقع آخرین مطالعه انجام شده در این زمینه است. مطالعات فوق از نظر روش مطالعه و گروه مورد مطالعه تفاوت‌هایی با مطالعه حاضر دارند. از جمله McMorris در دو مطالعه مجزا تأثیر مثبت کراتین را در افرادی نشان داد که تحت تأثیر یک دوره بی‌خوابی (15) و یا بی‌خوابی در کنار فعالیت فیزیکی بودند (16). در حالی که در مطالعه حاضر مانند مطالعه Rawson و همکاران هیچگونه محرومیت از نظر خواب و یا فعالیت فیزیکی در رابطه با نمونه‌ها اعمال نشده بود (14). دلیل بهبود عملکرد مغزی افراد در مطالعه Rae و همکاران نیز می‌تواند گیاهخوار بودن این افراد باشد. چراکه سطح کراتین سرم، عضلات و احتمالاً مغز در افراد گیاهخوار در مقایسه با افراد غیر گیاهخوار پایین تر بوده و چه بسا بعد از مکمل یاری با کراتین افزایش کراتین در مغز این گروه چشم‌گیر تر باشد (3، 14). مطالعه حاضر به عنوان یک کار تجربی روی موش

بتآمیلوئید را نشان بدهد و مطالعات مشابه لازم است تا تأثیرات محافظت نورونی احتمالی مکمل یاری با کراتین قبل از تزریق بتآمیلوئید را مورد آزمون قرار دهند.

نهایتاً می‌توان چنین بیان کرد که مکمل‌یاری با کراتین بعد از تزریق بتآمیلوئید هیچ گونه تأثیری بر یادگیری، حافظه و آپوپتوز در موش‌های صحرایی نر ویستار ندارد. برای رسیدن به نتیجه گیری قطعی و روشن شدن مکانیسم‌های احتمالی، انجام مطالعات بیشتر با روش‌های متفاوت مکمل‌یاری و آزمون‌های رفتاری مختلف که می‌تواند در شرایط متفاوت انجام شود، ضرورت دارد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری در درصد نورون‌های تانل مثبت در دو گروه AdCr+ و AdCr- نشان نداد؛ در حالی که در مطالعه Brewer و همکاران اثر محافظت نورونی کراتین در مقابل سمیت بتآمیلوئید را گزارش نموده‌اند (17). علاوه بر تفاوت‌های مهمی که شرایط دو مطالعه در محیط کشت و مطالعه روی موجود زنده دارد، این یافته با توجه پایین بودن سرعت افزایش ذخیره کراتین مغز به دنبال مکمل یاری با کراتین که در مطالعات گذشته گزارش شده است (19) نیز قابل تفسیر است. به عبارتی ممکن است افزایش کراتین در نورون‌ها کندتر از آن بوده که بتواند اثرات محافظت نورونی کراتین در مقابل سمیت

## • References

- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2003;74(7):863-6.
- Cherrier MM, Matsumoto AM, Amory JK, Asthana S, Bremner W, Peskind ER, et al. Testosterone improves spatial memory in men with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64(12):2063-8.
- Rae C, Digney AL, McEwan SR, Bates TC. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;270(1529):2147-50.
- Valenzuela MJ, Jones M, Caroline Rae WW, Graham S, Shnier R, Sachdev P. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. *NeuroReport*. 2003;14(10):1333-7.
- Dechent P, Pouwels PJW, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999 September 1, 1999;277(3):R698-R704.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Yang L, Ferrante KL, Hersch SM, Beal MF, et al. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*. 2003;85(6):1359-67.
- Pan JW, Takahashi K. Cerebral energetic effects of creatine supplementation in humans. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007 April 1, 2007;292(4):R1745-R50.
- Allen PJ, D'Anci KE, Kanarek RB, Renshaw PF. Chronic Creatine Supplementation Alters Depression-like Behavior in Rodents in a Sex-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology*. 2009;35(2):534-46.
- Hadjicharalambous M, Kilduff L, Pitsiladis Y. Brain serotonin and dopamine modulators, perceptual responses and endurance performance during exercise in the heat following creatine supplementation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2008;5(1):14.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, et al. Neuroprotective Effects of Creatine in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 2000 June 15, 2000;20(12):4389-97.
- Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, et al. Neuroprotective Effects of Creatine and Cyclocreatine in Animal Models of Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 1998 January 1, 1998;18(1):156-63.
- Watanabe A, Kato N, Kato T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. *Neuroscience Research*. 2002;42(4):279-85.
- McMorris T, Mielcarz G, Harris RC, Swain JP, Howard A. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. *Neuropsychology, development, and cognition Section B, Aging, neuropsychology and cognition*. 2007;14(5):517-28.
- Rawson ES, Lieberman HR, Walsh TM, Zuber SM, Harhart JM, Matthews TC. Creatine supplementation does not improve cognitive function in young adults. *Physiology & Behavior*. 2008;95(1-2):130-4.
- McMorris T, Harris RC, Howard AN, Langridge G, Hall B, Corbett J, et al. Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. *Physiology & behavior*. 2007;90(1):21-8.
- McMorris T, Harris RC, Swain J, Corbett J, Collard K, Dyson RJ, et al. Effect of creatine supplementation and sleep deprivation, with mild exercise, on cognitive and psychomotor performance, mood state, and plasma concentrations of catecholamines and cortisol. *Psychopharmacology*. 2006;185(1):93-103.
- Brewer GJ, Wallimann TW. Protective Effect of the Energy Precursor Creatine Against Toxicity of Glutamate and  $\beta$ -Amyloid in Rat Hippocampal Neurons. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(5):1968-78.



18. David S, Shoemaker M, Haley BE. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: Correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Molecular Brain Research*. 1998;54(2):276-87.
19. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*. 2000;80(3):1107-213.
20. Gallant M, Rak M, Szeghalmi A, Del Bigio M, Westaway D, Yang J, et al. Focally Elevated Creatine Detected in Amyloid Precursor Protein (APP) Transgenic Mice and Alzheimer Disease Brain Tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(1):39576 - end of article.
21. Nobakht M, Hoseini SM, Mortazavi P, Sohrabi I, Esmailzade B, Rahbar RN, et al. Neuropathological changes in brain cortex and hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease. *Iranian biomedical journal*. 2011;15(1-2):51.
22. Gholamipour-Badie H, Naderi N, Khodagholi F, Shaerzadeh F, Motamedi F. L-type calcium channel blockade alleviates molecular and reversal spatial learning and memory alterations induced by entorhinal amyloid pathology in rats. *Behavioural Brain Research*. 2013;237(0):190-9.
23. Chambon C, Wegener N, Gravius A, Danysz W. Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid- $\beta$  peptides in rodents. *Behavioural Brain Research*. 2011;225(2):623-41.
24. Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. The various aggregation states of  $\beta$ -amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(2):202-12.

## Effects of Creatine Supplementation on Learning, Memory and Apoptosis after Amyloid Beta Injection in Male Wistar Rats

AliMohammadi M<sup>1</sup>, Pishva H<sup>\*2</sup>, Eshraghian MR<sup>3</sup>, Zarindast MR<sup>4</sup>

1- MSc Student, Dept. of Cellular, Molecular Nutrition, School of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- \*Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Cellular, Molecular Nutrition, School of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, , Email: pishvahm@tums.ac.ir

3- Prof, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Prof, Dept. of pharmacology, School of medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 10 May, 2014

Accepted 7 Sept, 2014

**Background and Objectives:** Considering the positive effects of creatine supplement on cognitive performance in healthy individuals, the present study was performed with the aim of determining the effects of creatine supplementation on learning, memory and apoptosis after injection of Amyloid  $\beta$ (A $\beta$ ) in male wistar rats.

**Materials & Methods:** Twenty four male wistar rats (weighting 250 $\pm$ 50 grams) were randomly divided into three groups (n=8 for each groups). Two groups were given a bilateral amyloid beta injection in the CA1 hippocampus (2 $\mu$ g per CA1), one of them received a cho containing 2% creatine monohydrate (AdCr+ group) and other group continued to receive normal cho(AdCr-). The sham group were injected by normal saline in CA1 hippocampus and received normal cho during the study. After six weeks, the Morris Water Maze (MWM) and Y-maze tests were administered, and learning ability and memory retrieval were measured. After scarification of the animals, TUNEL test for an anti-apoptosis assay was performed.

**Results:** The sham group performed better in Y-maze and MWM compare to the AdCr- and AdCr+ groups. The apoptotic neurons count in the sham group were less than in the AdCr+ and AdCr- groups; however, the results indicated no differences between the AdCr+ and AdCr- groups in learning, memory retrieval, and percentage of TUNEL positive neurons.

**Conclusion:** After A $\beta$  injection, creatine supplementation had no effect on learning, memory and apoptosis in male wistar rats.

**Keywords:** Alzheimer, Creatine supplementation, Learning, Memory, Apoptosis