

## بررسی متابولیت مارگرهای بالقوه در تشخیص بیماری آلزایمر در سرم موش‌های صحرایی بر اساس تکنیک طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته ( $^1\text{H-NMR}$ )

فاطمه گشادرو<sup>۱</sup> (Ph.D)، ریحانه فرخی یکتا<sup>۱</sup> (Ph.D)، افسانه عارفی اسکویی<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، مریم اسلامی<sup>۳</sup> (Ph.D)

۱- گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۶

a.arefi@sbmu.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۸۵۳۰

### چکیده

هدف: شیوع بالای آلزایمر در جوامع امروزی و عدم تشخیص زودهنگام این بیماری، بیانگر نیاز ضروری برای توسعه روش‌هایی است که به امر تشخیص سریع مراحل اولیه بیماری کمک نمایند. در این مطالعه با استفاده از روش متابولومیکس بر پایه تکنیک طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته، تعیین متابولیت‌های تغییر یافته و متمایز در سرم موش‌های مدل آلزایمری نسبت به موش‌های سالم مورد هدف می‌باشد تا با بررسی آن‌ها بتوان مکانیسم بیماری را بیش‌تر درک نموده و گامی برای تشخیص زودهنگام بیماری برداشت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از ۲۵ موش صحرایی (۱۰ موش سالم، ۱۵ موش مدل بیماری آلزایمر) سرم‌گیری شد و متابولیت‌های آن‌ها به کمک تکنیک  $^1\text{H-NMR}$  استخراج و آنالیز شده و سپس پروفایل متابولیتی افتراقی با آنالیز آماری چندمتغیره مشخص گردید. هم‌چنین جهت انجام مطالعات رفتاری از روش احترازی غیرفعال استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج آزمایشات رفتاری نشان داد که حافظه در گروه آلزایمری کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. متابولیت‌های افتراقی بین دو گروه بیمار و سالم با آنالیزهای آماری چندمتغیره همچون OPLS و رندوم فارست، مشخص شد. نتایج نشان داد که اختلاف‌هایی در مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی و متابولیسم آمینواسیدها بین دو گروه کنترل و مدل آلزایمری وجود دارد. نتیجه‌گیری: این پژوهش دریچه‌ای برای شناسایی نشانگرهای زیستی و مسیرهای فیزیولوژیک درگیر در بیماری را می‌گشاید. در این مطالعه متابولیت‌هایی معرفی می‌گردند که با بررسی‌های بیش‌تر می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی کاندید جهت تشخیص زودهنگام بیماری نقش بسزایی را ایفا نمایند.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، متابولومیکس، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته

### مقدمه

با مشکلات عدیده رفتاری و روانی-اجتماعی روبرو هستند و خانواده بیماران و اجتماع نیز هزینه‌های گزافی متحمل می‌گردند. بیماری آلزایمر نتیجه دو فاکتور مهم ژنتیک و اتیولوژیک (محیط، تروما و تغییرات ایمونولوژیک و التهاب) است، گرچه هیچ‌کدام از آن‌ها همه جنبه‌های بیماری را پوشش نمی‌دهند [۳]. بیماری آلزایمر می‌تواند حاصل جهش‌هایی در یکی از سه ژن APP، PSEN1 یا PSEN2 باشد. زمانی که هر یک از این ژن‌ها تغییر یابد، مقادیر بالایی از قطعات پروتئین سمی به نام پپتید آمیلوئید بتا در مغز تولید می‌شوند [۴]. ساخت پپتید آمیلوئید بتا و پلاک‌های آمیلوئیدی ممکن است باعث مرگ سلول‌های عصبی و علائم و نشانه‌های پیش‌رونده بیماری

امروزه بالغ بر پنجاه میلیون نفر در جهان درگیر بیماری آلزایمر هستند و سالانه ۱۰ میلیون نفر بر این آمار اضافه می‌گردد [۱]. بیماری آلزایمر یک بیماری تحلیل‌برنده و پیش‌رونده قوای عقلانی سیستم عصبی مرکزی است. از نظر بالینی با حضور پلاک‌های آمیلوئیدی در خارج سلول و کلاف‌های ظریف نوروفیبریلاری درون سلول‌های عصبی شناخته می‌شود که منجر به تغییرات متعددی در مغز، کوچک شدن مغز و از بین رفتن سلول‌های مغزی می‌شود. کاهش سیناپس‌های عصبی به دنبال مرگ سلول‌ها در ناحیه هیپوکامپ مغز، می‌تواند علت از دست رفتن حافظه فضایی و اختلال در رفتار بیماران باشد [۲]. به دلیل فرآیند بیماری‌زایی، این بیماران

مطالعات متابولومیکی را انجام داد به همین جهت در مطالعه حاضر از این تکنیک استفاده می‌شود. این تکنیک‌های مهم مورد استفاده در مطالعات متابولومیکی هر کدام دارای مزایا و معایبی می‌باشند که در مطالعات قبلی به آن‌ها اشاره نموده‌ایم [۱۳، ۱۴]. اگر چه گفته می‌شود مطالعات متابولومیکی در حوزه بیماری آلزایمر در مرحله جنینی به سر می‌برد، مطالعات متعددی روی بیماری آلزایمر توسط تکنیک‌های GC-MS, NMR, LC-MS و معدودی با تکنیک CE-MS انجام شده است [۱۵]. در بیش‌تر مطالعات، نمونه‌های مورد مطالعه بر پایه مایع مغزی نخاعی، نمونه‌های بافت مغز پس از مرگ و مدل حیوانی و تعداد کمی از مطالعات با استفاده از مایع زیستی خون (سرم یا پلاسما) و ادرار گزارش شده است. با این وجود به دلیل تهاجمی بودن بسیاری از این روش‌ها و عدم کارایی در تشخیص زودهنگام بیماری، همواره چالشی در این موضوع وجود دارد. در این میان سرم خون یکی از نمونه‌های مناسب این کار است. در این مقاله به کمک تکنیک NMR، روی نمونه‌های سرم مدل حیوانی موش صحرایی آلزایمری، مطالعه‌ی متابولیکی انجام شده است تا بتوان مارکرهای بالقوه‌ای را برای تشخیص بیماری معرفی کرد.

## مواد و روش‌ها

### تعیین گروه‌های مورد مطالعه

در این مطالعه از ۲۰ سر موش صحرایی نر در محدوده وزنی  $(250 \pm 20)$  گرم که در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۴-۱۸ درجه سانتی‌گراد با رژیم غذایی آب و دان فشرده بدون محدودیت نگهداری می‌شدند، استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند.

۱- گروه مدل آلزایمری ( $n=10$ ): این حیوانات ابتدا جراحی شده و داخل بطن طرفی مغزی آمیلوئید بتا به میزان  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  تزریق می‌گردد. پس از سه هفته مورد آزمایش رفتاری قرار می‌گیرند و پس از آزمایشات رفتاری نمونه خون آن‌ها گرفته می‌شود.

۲- گروه کنترل یا سالم ( $n=15$ ): این حیوانات نیز جراحی شده و داخل بطن طرفی مغزی سالین (حلال بتا آمیلوئید) تزریق می‌گردد. پس از سه هفته مورد آزمایش رفتاری قرار می‌گیرند و پس از آزمایشات رفتاری نمونه خون آن‌ها گرفته می‌شود.

### نحوه ایجاد مدل‌های آلزایمری

ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ( $85 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $15 \text{ mg/kg}$ ) بی‌هوش شده و

گرد [۵]. گزارشات متعددی در خصوص ارتباط بین آپولیپوپروتئین E و بیماری آلزایمر وجود دارد [۶، ۷].

در واقع این بیماری فاقد نشانگرهای زیستی ملکولی قابل ردیابی در خون است و تنها راه تشخیص قطعی بیماری، اندازه‌گیری غلظت پلاک‌های آمیلوئیدی و میزان فسفریلاسیون رشته عصبی تاو در مغز است که این کار بعد از مرگ بیمار و گرفتن نمونه از بافت مغز امکان‌پذیر است. اما با این وجود روش‌هایی برای تشخیص این بیماری قبل از مرگ در حال حاضر توسعه یافته‌اند که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: نمونه‌برداری از مایع مغزی-نخاعی و اندازه‌گیری پروتئین‌های خاص آزاد شده در نتیجه تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی [۸]. تکنیک تصویربرداری توموگرافی با گسیل پوزیترون (PET) جهت اندازه‌گیری غلظت پلاک‌های آمیلوئیدی و میزان فسفریلاسیون رشته عصبی تاو در مغز [۹]. تکنیک تصویربرداری ملکولی با استفاده از اسپکتروسکوپی تشدید مغناطیسی (MRS) با اندازه‌گیری افزایش نسبت میواینوزیتول به کراتین و هم‌چنین کاهش آن-استیل آسپاراتات به کراتین [۱۰، ۱۱]. علی‌رغم روش‌های موجود، تهاجمی بودن کار با مایع مغزی نخاعی، هزینه بالای تکنیک‌های تصویربرداری و پایین بودن حساسیت و اختصاصیت این تکنیک‌ها، نیاز به جستجوی شاخص‌های زیستی قابل اندازه‌گیری در مایعات زیستی هم‌چون (سرم، پلاسما، ادرار، بزاق و غیره) جهت تشخیص زودهنگام این بیماری را افزایش می‌دهد.

متابولومیک روشی نوین برای بررسی پروفایل متابولیت‌ها در بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌باشد که به کمک آن می‌توان در وضعیت‌های مختلف و یا حضور مداخله‌گرهای مختلف تغییر در میزان و نوع متابولیت‌ها را مورد مطالعه قرار داد. توانمندی این روش در تعیین تغییرات پویای کمی و کیفی در تعداد زیادی از متابولیت‌ها در مسیرهای مختلف بیوشیمیایی می‌باشد که می‌تواند در دستیابی به نشانگر مشخص و مناسب جهت تشخیص و درمان بیماری‌ها کمک کند [۱۲]. ابزارهای مورد استفاده در مطالعات متابولومیکی عبارتند از طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR)، کروماتوگرافی مایع کوپل شده با طیف‌سنج جرمی (LC-MS)، کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف‌سنج جرمی (GC-MS) و الکتروفورز موئین کوپل شده با طیف‌سنج جرمی (CE-MS). یکی از بهترین تکنیک‌های مورد استفاده در متابولومیک NMR می‌باشد. NMR تکنیکی است که به جداسازی ترکیبات شیمیایی نمونه نیازی ندارد و نمونه پس از طیف‌گیری بازیافت می‌شود. به کمک این تکنیک می‌توان با دقت آنالیزی بالا، سهولت تهیه نمونه و عدم نیاز به دست‌کاری نمونه، با سرعت بالای آنالیز (کم‌تر از ۶۰ ثانیه)

محفظه تاریک خارج و به قفس منتقل می‌شد. این مرحله بعد از نیم ساعت دوباره تکرار می‌شد. در این مرحله مدت زمان ماندن حیوان در اتاق روشن قبل از ورود به اتاق تاریک (STL) قبل از آموزش) یادداشت می‌شد. در صورتی که STL قبل از آموزش از ۱۲۰ ثانیه بیشتر باشد نمونه حذف می‌شد.

#### مرحله اکتساب (Learning)

نیم ساعت بعد از بار دوم آشنا شدن، اکتساب PAL آموزش داده می‌شد. بلافاصله پس از ورود حیوان به قسمت تاریک درجه بسته و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز شدت ۱/۲ میلی‌آمپر و به مدت ۱/۵ ثانیه به حیوان داده می‌شد. بعد از ۲۰ ثانیه موش را از قسمت تاریک برداشته و به طور موقت در قفس نگهداری می‌کردیم. دو دقیقه بعد (۱۲۰ ثانیه) رفتار موش همانند دفعه قبل بررسی می‌گردید. عدم ورود حیوان به قسمت تاریک در مدت ۱۲۰ ثانیه به عنوان اکتساب موفقیت‌آمیز PAL در نظر گرفته می‌شد. در غیر این صورت برای بار دوم همان شوک اعمال می‌گردد.

#### مرحله به خاطر آوری (Retrieval)

۲۴ ساعت بعد از آموزش موش در قسمت روشن گذاشته می‌شد. ۵ ثانیه بعد درجه باز می‌شد. مدت زمانی که به طول می‌انجامد تا حیوان وارد قسمت تاریک شود (STL)، مدت کل زمانی که حیوان در محفظه روشن باقی می‌ماند (TLC) و هم‌چنین مدت زمانی که حیوان در محفظه تاریک باقی می‌ماند (TDC) و تعداد دفعات رفت و برگشت حیوان به اتاق تاریک و روشن (Crossing) را به مدت ۶۰۰ ثانیه (۱۰ دقیقه) یادداشت گردید.

#### روش خون‌گیری

در پایان آزمایشات رفتاری با استفاده از لوله موئینه از زاویه داخلی چشم نمونه خون تهیه می‌گردد. خون‌گیری از طریق سینوس پشت حذقه‌ای انجام می‌شود. در این روش حیوان ابتدا توسط اتر مختصری بی‌هوش شده و در وضعیت خوابیده به پهلو (Ventral recumbency) و یا خوابیده به شکم (recumbency) قرار می‌گیرد. سپس یک لوله موئینه میکروهماتوکریت در زاویه داخلی یا خارجی چشم به زیر پلک بالایی وارد می‌شود. در ادامه کار لوله وارد شده به آرامی و با بیچاندن فشار داده می‌شود تا این‌که داخل ملتحمه وارد شود. سپس بدون جابه‌جا کردن لوله کمی لوله به عقب کشیده می‌شود تا خون به داخل لوله وارد شود. در این حال خاصیت موئینگی لوله به پر شدن آن کمک خواهد کرد. بعد از اتمام خون‌گیری لوله از چشم بیرون آورده می‌شود و با گذاشتن یک گاز بر روی چشم و فشار دادن آن پلک چند ثانیه بسته نگهداشته می‌شود تا عمل خون‌بندی انجام گیرد. نمونه‌های خون یک ساعت در یخچال نگه داشته شده و

پس از بی‌هوشی کامل، سر حیوان از ناحیه بین دو چشم تا سطح گردنی تراشیده شده و در دستگاه استرئوتاکس (مدل استولینینگ) قرار داده می‌شود به نحوی که میله‌های گوشی کاملاً در سوراخ گوش و دندان‌های پیشین، داخل میله قرار گیرد. سر در طول خط میانی شکافی داده شده به طوری که نقاط آناتومیکیال سر مشخص گردد و ناحیه اطراف برگما و لامبدا تمیز و خشک می‌گردد. سپس با کمک اطلس پاکسینوس [۱۶] موقعیت بطن جانبی با مختصات  $AP=1/2mm$ ,  $AP=1/5mm$  -  $Lat=4mm$  روی سر مشخص می‌گردد. ناحیه مورد نظر با کمک مته دندان‌پزشکی سوراخ می‌شود. سپس مطابق با مختصات به دست آمده از اطلس پاکسینوس سوراخی به قطر تقریباً یک میلی‌متر در جمجمه تعبیه می‌شود. آن‌گاه به کمک دستگاه استریوتاکسی و سرنگ هامپلتون بتا‌آمیلوئید ( $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) و یا سالین ( $5\mu\text{L}$ ) به داخل بطن طرفی تزریق می‌گردد. بلافاصله پوست سر بخیه شده و پس از ضد عفونی محل، حیوان در قفس تمیز گذاشته شده و به مدت سه هفته (جهت تأثیر داروی بتا‌آمیلوئید) در حیوان خانه نگهداری می‌شود پس از آن مورد آزمایشات رفتاری قرار می‌گیرد.

#### مطالعات رفتاری

برای اندازه‌گیری یادگیری و حافظه از روش احترازی غیر فعال (PAL) استفاده می‌شود. PAL نوعی شرطی شدن است که حیوان می‌آموزد با مهار یک رفتار ویژه از دریافت محرک آسیب‌رسان اجتناب ورزد. ابزاری که برای این کار استفاده شد، دستگاه PAL می‌باشد. این دستگاه از یک جعبه پلکسی‌گلاس دو قسمتی درست شده که یک بخش آن روشن و بخش دیگر آن تاریک است. میان دو قسمت یک درب وجود دارد. در کف هر دو بخش میله‌های ضد زنگ به فاصله یک سانتی‌متر از هم قرار دارند و یک لامپ ۱۰۰ واتی در ۴۰ سانتی‌متری بالای قسمت روشن قرار دارد. کف بخش تاریک دستگاه، مدار الکتریکی وصل است که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی با مدت ۱/۵ ثانیه و شدت ۱/۲ mA با فرکانس ۵۰ Hz از کف آن عبور می‌کند. در این روش حیوان می‌آموزد که از رفتن به قسمت تاریک (بر اساس میل ذاتی) اجتناب کند زیرا شوک دریافت می‌کند. ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش حافظه حیوان مورد بررسی قرار می‌گرفت. این آزمایش شامل مراحل زیر است:

#### مرحله آشنا شدن (Familiarization)

ابتدا حیوانات به دستگاه عادت داده می‌شدند. ۵ ثانیه بعد از قرار گرفتن حیوان در قسمت روشن دستگاه، درجه میان قسمت روشن و تاریک گشوده می‌شد. به محض ورود حیوان به محفظه تاریک درجه بسته و پس از ۲۰ ثانیه حیوان از

## نتایج آزمایشات متابولومیک

آنالیزهای آماری چندمتغیره و بررسی‌های بیوانفورماتیکی به منظور یافتن متابولیت‌های افتراقی معنی‌دار بین دو گروه آزایمیری و کنترل، از آنالیزهای آماری چندمتغیره استفاده شد. این آنالیزها شامل آنالیز مؤلفه اصلی (PCA)، آنالیز OPLS، و هم‌چنین روش رندوم فارست می‌باشند. مجموعه داده حاصل از رمزگشایی طیف NMR که شامل غلظت‌های هر متابولیت بوده و به صورت یک ماتریس  $408 \times 25$  درآمده بود، برای انجام آنالیز آماری غیرنظارتی PCA وارد نرم‌افزار R شد. آنالیز PCA به منظور یافتن شباهت‌ها یا گرایش‌های بین دو گروه از نمونه‌ها صورت گرفت. آنالیز PCA قادر است داده‌های پرت احتمالی و وجود هر گونه رابطه بین مشاهدات را مشخص نماید. در مرحله بعد، آنالیزهای نظارتی OPLS و رندوم فارست به منظور افزایش کوواریانس بین داده محاسبه شده (ماتریس X یا همان شدت پیک‌های مشاهده شده در طیف NMR) به منظور یافتن متغیرهایی از ماتریس X که با اعضای هر کلاس از داده‌ها مرتبط هستند (کلاسه‌بندی) به شکلی که این متغیر بتواند با سطح Y را پیش‌بینی کند، روی این ماتریس صورت گرفت. آنالیز OPLS با استفاده از برنامه R و رندوم فارست با استفاده از برنامه Matlab صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل از مدل‌های آماری OPLS و رندوم فارست، پیک‌های معنی‌دار متمایزکننده دو گروه مشخص شده و پس از آن با استفاده از پایگاه‌های داده مرتبط با طیف‌های NMR شامل BMRB [۱۷] و HMDB [۱۸]، متابولیت‌های معنی‌دار تعیین گردیدند. انتخاب متابولیت‌های معنی‌دار با استفاده از پارامتر VIP در مدل OPLS و پارامتر میزان اهمیت (model importance) در مدل رندوم فارست تعیین شد. متغیرهایی که بالاترین میزان از این دو پارامتر را دارند به‌عنوان متغیرهای مهم متمایزکننده دو گروه در نظر گرفته می‌شوند. هم‌چنین متابولیت‌هایی دارای اهمیت می‌باشند که علاوه بر داشتن بالاترین امتیاز در مدل آماری، p-value کم‌تر از ۰/۰۵ نیز داشته باشند. هم‌چنین از پلنت فرم بر پایه وب Metaboanalyst3 [۱۹] جهت تعیین مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در بیماری آزایمر استفاده شد.

## نتایج آنالیزهای PCA و OPLS

در ابتدا آنالیز آماری PCA روی مجموعه داده حاصل از طیف NMR صورت گرفت. همان‌گونه که اشاره شد، PCA می‌تواند گروه‌های تحت مطالعه را مشخص کرده و داده‌های پرت احتمالی را در نمونه‌ها تعیین کند. اساس آنالیز PCA، کاهش ابعاد نمونه و ایجاد یک ترکیب خطی از متغیرهاست که به آن‌ها مؤلفه‌های اصلی گفته می‌شود. همان‌گونه که در شکل

سپس با دور ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. نمونه‌های سرم جدا شده سپس به مقادیر کم‌تر و در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع آنالیز نگهداری شدند.

## روش‌های متابولومیک

سرم‌های جدا شده در هر گروهی مورد آزمایش‌های NMR قرار گرفت. در مرحله طیف‌گیری، سرم ذوب شده به دمای اتاق رسانده شده و طیف  $^1\text{H-NMR}$  برای تعیین متابولیت‌ها در دستگاه DRX 500MHz Bruker در فرکانس دقیق ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز (MHz) به روش CPMG گرفته شد. ۶۰۰ میکرولیتر سرم در لوله‌های ۵ میلی‌متری با کیفیت بالا به ۶۰ میکرولیتر  $\text{D}_2\text{O}$  (جهت لاک کردن دستگاه) اضافه شد و داخل دستگاه قرار گرفت. برای همه نمونه‌ها توالی پالس پژواک-اسپین CPMG گرفته شد. روش CPMG رزونانس پهن ترکیبات با وزن مولکولی بالا از جمله پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد و باعث می‌شود مشاهده ترکیبات با وزن مولکولی پایین از جمله متابولیت‌ها تسهیل گردد. همه طیف‌ها به متیل لاکتات (سیگنال دوتایی در ۱/۳۳ ppm) ارجاع داده شدند. سایر پارامترها عبارت‌اند از: دمای ۲۹۸ کلین (K)، تعداد اسکن ۱۵۴، پهنای پیک ۸۳۸۹/۲۶ Hz و زمان پالس ۲s به طول انجامید. از آنالیزهای آماری چندمتغیره شامل PCA، OPLS و رندوم فارست برای مشخص کردن متغیرهای افتراقی استفاده شد. آنالیزهای PCA و OPLS با استفاده از نرم‌افزار R و آنالیز رندوم فارست با استفاده از نرم‌افزار MATLAB صورت گرفت.

## نتایج

## نتایج آزمایشات رفتاری

مقایسه میان حیوانات گروه‌های کنترل و مدل بیماری آزایمیری نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود دارد، به طوری که شاخص حافظه در گروه مدل آزایمیری نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. به عبارت دیگر حافظه حیواناتی که بتا آمیلوئید دریافت نموده‌اند، نسبت به کنترل کاهش یافته است. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های رفتاری در گروه آزایمیری نسبت به گروه کنترل (شاخص‌های حافظه)

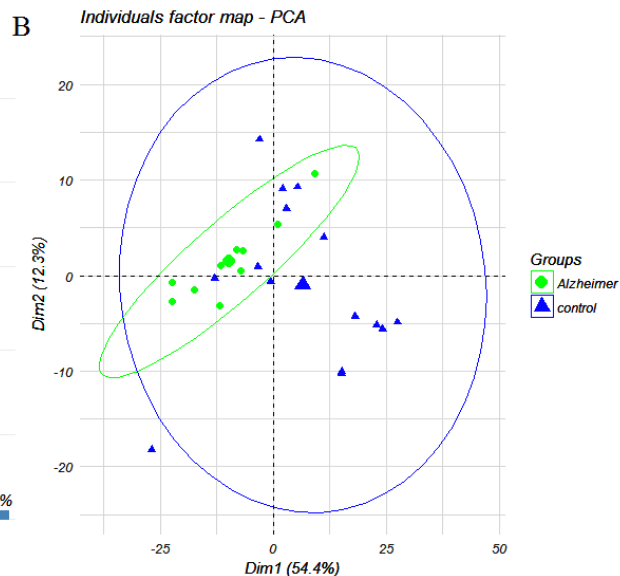
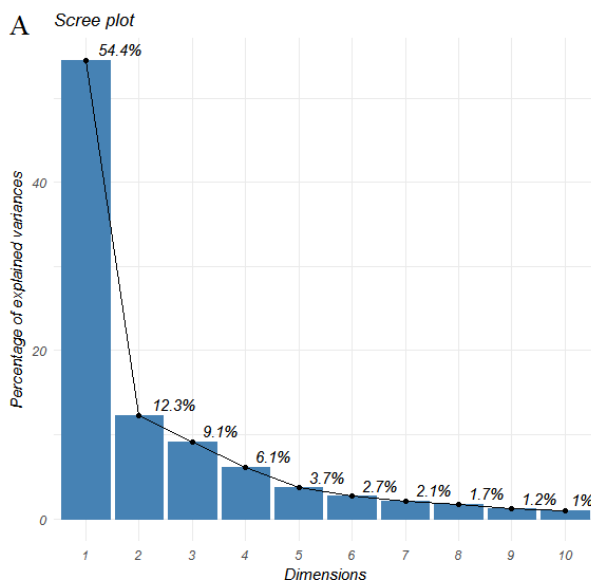
گروه‌ها	کنترل (ثانیه)	آزایمیری (ثانیه)
مرحله به خاطر آوری	STL	$199.61 \pm 1$
	TLC	$459.56 \pm 70$
	TDC	$150.963 \pm 8$
		$30.25 \pm 4.02$
		$124 \pm 24.91$
		$137.06 \pm 0.06$

آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده است.

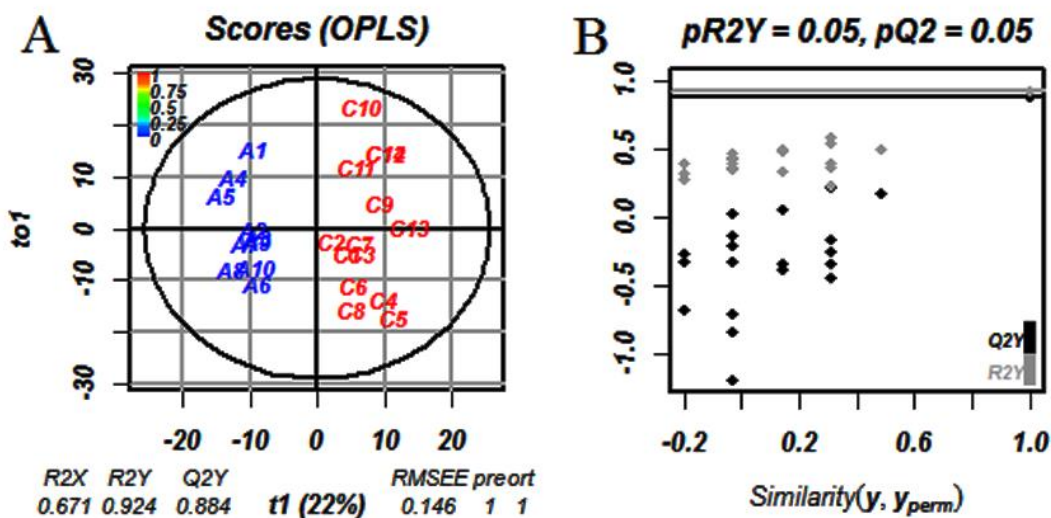
امتیاز و همچنین نتیجه تست permutation در شکل ۲ مشخص شده است. نمودار ROC مربوط به مدل OPLS نیز در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتیجه حاصل از مدل آماری OPLS، پارامتری بنام VIP (Variable influence on projection) است که تخمینی از اهمیت متغیرها را در جداسازی دو گروه مشخص می‌کند. پس از انجام مدل سازی OPLS، نرم‌افزار جدولی برای مقادیر VIP برای هر متغیر که در این جا همان مقادیر جابه‌جایی شیمیایی است به دست می‌دهد که مقادیر VIP بزرگ‌تر از ۱، معمولاً به عنوان متغیرهای با اهمیت در نظر گرفته می‌شوند. سپس متغیرهای دارای مقادیر VIP بزرگ‌تر از ۱ و همچنین مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵، به عنوان متغیرهای معنی‌دار با استفاده از پایگاه‌های داده HMDB و BMRB شناسایی شدند. این متابولیت‌ها در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. بر اساس نتایج حاصل، در گروه مدل آنزایمری متابولیت‌های N-استیل لیزین، ۳-هیدروکسی بوتیرات، پرولین و بتا-آلانین دارای مقادیر کاهشی و متابولیت‌های ۲-هیدروکسی والرات، لاکتوز، هموسیستین، بوتیرات، همووانیلات، ۲-متیل گلو تارات، پانتوتات، بتائین، گلو تامات، ترئونین، لاکتات، اکسولگوتارات، تائورین، متیونین، فسفوسرین، پروپیونات، والین، مایو-اینوزیتول، و گلیسین، دارای مقادیر افزایشی بودند.

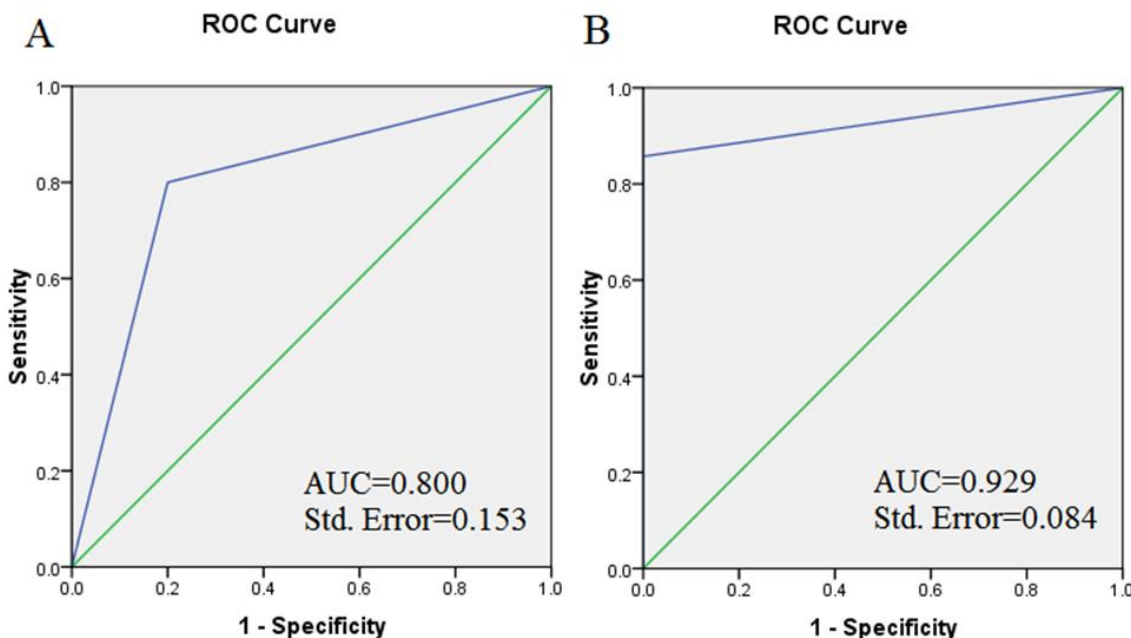
۱ قسمت A مشاهده می‌شود، اختلاف مشاهده شده بین دو گروه در آنالیز PCA به منظور جداسازی دو گروه آنزایمر و کنترل که توسط ۳ مولفه اصلی اول توضیح داده شد، به صورت زیر است:  $PC1=54\%/4$ ،  $PC2=12\%/3$  و  $PC3=9\%/1$ . همان‌طور که در نمودار امتیاز در شکل ۱ قسمت B مشاهده می‌شود، آنالیز PCA توانسته به شکل نسبتاً قابل قبولی نمونه‌ها را کلاسه‌بندی کند. همچنین در گروه کنترل یک نمونه پرت مشاهده می‌شود که به منظور انجام مدل سازی‌های آماری، این داده حذف گردید. پس از آن آنالیز آماری OPLS به منظور یافتن متابولیت‌های تمایزدهنده دو گروه انجام شد. آنالیز OPLS، یک آنالیز نظارتی محسوب می‌شود به این معنی که کلاس‌های موجود در داده‌ها برای مدل مشخص شده و مدل آماری، متغیرهایی که بیش‌ترین تمایز را بین دو گروه ایجاد می‌کنند، تعیین می‌کند. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، نمودار امتیاز برای آنالیز OPLS تمایز دو گروه آنزایمری و کنترل را به خوبی نشان می‌دهد. اعتبارسنجی مدل نیز با استفاده از تست permutation در نرم‌افزار R انجام شد. پارامترهای حاصل از مدل به قرار زیر به دست آمد:  $R^2Y=0/884$ ،  $R^2X=0/671$  و  $RMSE=0/146$ . این مدل دارای مقادیر  $R^2$  و  $Q^2$  بالاتر از ۰/۵ و مقدار عرض از مبدأ  $Q^2$  کم‌تر از صفر می‌باشد که نشان‌دهنده معتبر بودن مدل آماری به دست آمده است. نمودار



شکل ۱. قسمت (A): نمودار مؤلفه‌های اصلی حاصل از آنالیز آماری PCA، قسمت (B): نمودار امتیاز آنالیز PCA که نسبتاً به خوبی دو گروه آنزایمری و کنترل را از هم متمایز کرده است.



شکل ۲. قسمت (A): نمودار امتیاز برای آنالیز آماری OPLS (رنگ آبی=آزایمر، رنگ قرمز=کنترل). قسمت B: معبرسازی مدل آماری با استفاده از تست permutation.



شکل ۳. نمودار ROC مربوط به مدل OPLS. قسمت A: گروه تست و قسمت B: گروه آموزشی. سطح زیر هر نمودار، در شکل نشان داده شده است.

استفاده قرار می‌گیرد. اساس مدل رندوم فارست ساخت درخت‌های تصمیم‌گیری است که در این جا تعداد ۵۰۰ درخت تصمیم‌گیری ساخته شد. اندازه‌گیری صحت و دقت مدل رندوم فارست با استفاده از ماتریس کانفیوژن به دست می‌آید که نتایج آن در نمودار ROC (شکل ۴) مشخص شده است. بر اساس این نمودار، پارامترهای اعتباربخشی به مدل شامل صحت، دقت و خطا در جدول ۲ مشخص شده‌اند. مدل رندوم فارست، برای هر متغیر پارامتر میزان اهمیت را مشخص کرد که بر این اساس، متغیرهایی که بیش‌ترین میزان اهمیت و همچنین مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ را داشتند، به‌عنوان متغیرهای معنی‌دار مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج حاصل در جدول ۳ نشان داده

#### نتایج مدل آماری رندوم فارست

مدل آماری رندوم فارست، همانند OPLS یک مدل نظارتی محسوب شده که با استفاده از کلاس‌های مربوط به هر یک از گروه‌ها، آن‌ها را دسته‌بندی کرده و متغیرهای متمایزکننده دو گروه را مشخص می‌کند که در این جا با استفاده از نرم‌افزار متلب صورت گرفت. در ابتدا مدل با استفاده از ۷۰ درصد نمونه‌ها که به صورت رندوم انتخاب می‌شوند، آموزش داده شده و حدود ۳۰ درصد از نمونه‌ها نیز در گروه تست قرار گرفتند. بنابراین گروه آموزشی (train set)، گروهی از نمونه‌ها است که بر اساس آن‌ها مدل آموزش‌دیده و ساخته می‌شود و گروه تست (test set)، جهت امتحان مدل ساخته شده مورد

hypergeometric و آنالیز توپولوژی مسیره‌ها با استفاده از مقدار نسبی betweeness-centrality می‌باشند. مسیره‌های حاصل در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. بر این اساس، مهم‌ترین مسیره‌های بیوشیمیایی که دارای مقدار  $p$  کم‌تر از  $0.05$  و میزان تأثیر بالاتر از صفر بوده‌اند عبارتند از مسیر متابولیسم گلو تامین و گلو تامات، مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم گلو تاتیون، متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین، متابولیسم آرژینین و پرولین، و بیوسنتز پانتوتات و کوآنزیم آ. نموداری از میزان تأثیر این مسیره‌ها در شکل ۵ نشان داده شده است. تقریباً بیش‌تر این مسیره‌ها مرتبط با متابولیسم اسیدهای آمینه بوده و مسیر بیوسنتز پانتوتات و کوآنزیم آ، از مسیره‌های متابولیسم ویتامین‌ها و کوفاکتورها محسوب می‌شود.

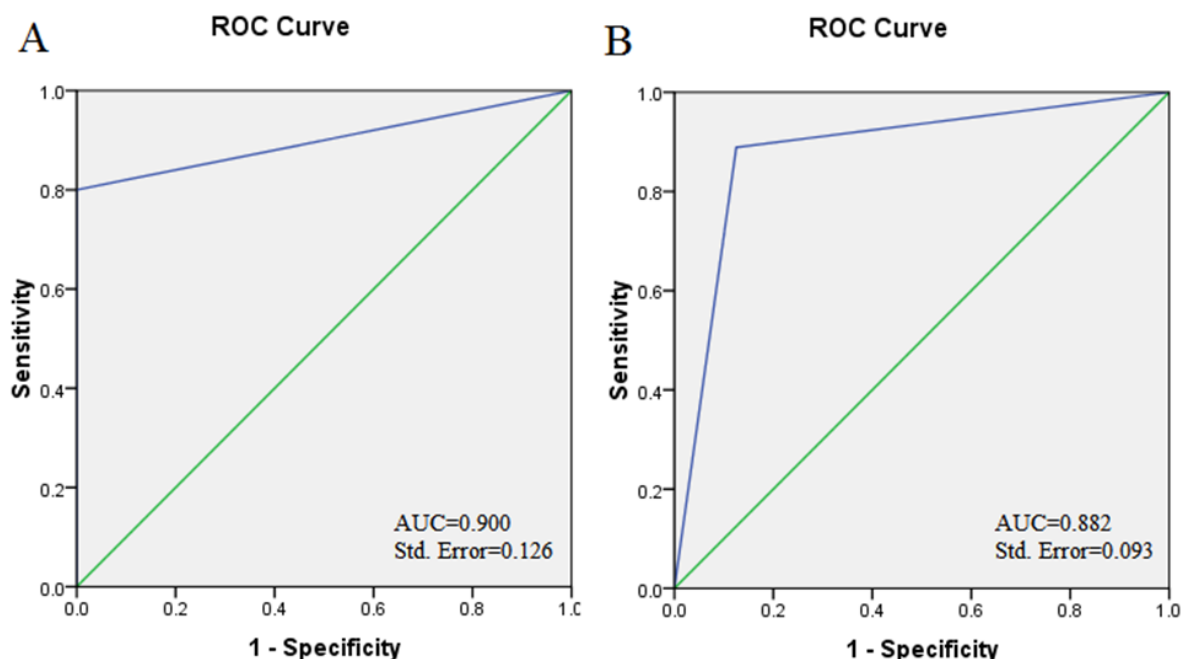
شده است. بر اساس نتایج مدل رندوم فارست، متابولیت‌های N-ستیل لیزین، ۳-هیدروکسی بوتیرات، پرولین، سیتروالین، بتا-آلانین، اورنیتین، گلو تاتیون، و سایلو-اینوزیتول دارای کاهش معنی‌دار و متابولیت‌های ۲-هیدروکسی والرات، لاکتوز، هموسیستین، بوتیرات، لاکتات، هموانیلات، ۲-متیل گلو تارات، ایزولوسین، اکسوجلوتارات، بتائین، پانتوتات، گلو تامات، ترئونین و تائورین دارای افزایش معنی‌دار هستند.

#### نتایج آنالیز مسیره‌های بیوشیمیایی

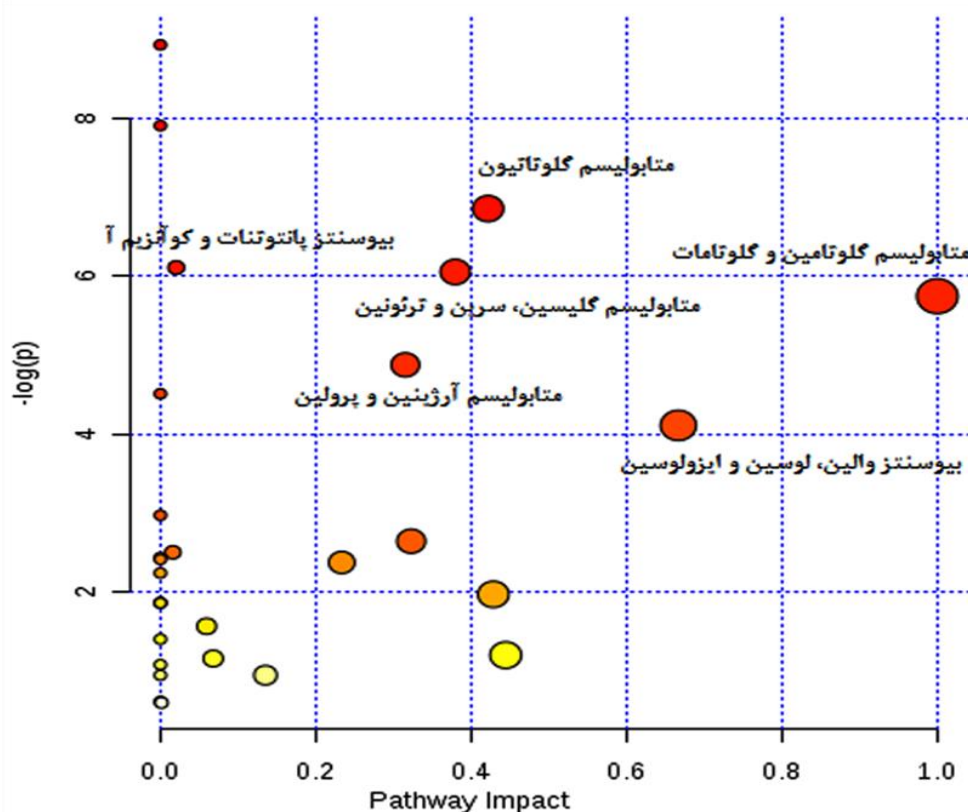
به منظور انجام آنالیز مسیره‌های بیوشیمیایی درگیر در بیماری آنالیز بر اساس نتایج به دست آمده، از پایگاه اینترنتی Metaboanalyst و از گزینه مربوط به آنالیز مسیره‌ها، استفاده شد. سایر تنظیمات مربوطه شامل انتخاب گونه rat، انجام آنالیز over-representation با استفاده از تست

جدول ۲. میزان حساسیت، اختصاصیت، دقت، صحت و نرخ خطای حاصل از مدل رندوم فارست برای دو گروه تست و آموزشی

گروه های آماری	نرخ خطا	حساسیت	اختصاصیت	صحت	دقت
گروه تست	۰/۱۴۲	۰/۸۰۰	۱	۰/۸۵۷	۱
گروه آموزشی	۰/۱۱۷	۰/۸۸۸	۰/۸۷۵	۰/۸۸۲	۰/۸۸۸



شکل ۴- نمودار ROC مربوط به مدل رندوم فارست. قسمت A: گروه تست و قسمت B: گروه آموزشی. سطح زیر هر نمودار، در شکل نشان داده شده است.



شکل ۵. نمودار مهم‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در بیماری آلزایمر بر اساس میزان تأثیر هر یک از مسیرها. در محور عمودی، منفی لگاریتم p-value و در محور افقی، میزان اهمیت هر مسیر در روند بیماری نشان داده شده است. بر این اساس، مهم‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی که دارای مقدار p کمتر از ۰/۰۵ و میزان تأثیر بالاتر از صفر بوده‌اند عبارتند از مسیر متابولیسم گلوکاتامین و گلوکاتامات، مسیر بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم گلوکاتامین، متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین، متابولیسم آرژینین و پرولین، و بیوسنتز پانتوتنات و کوآنزیم آ.

جدول ۳. متابولیت‌های افتراقی بین دو گروه آلزایمری و کنترل بر اساس مدل‌های آماری OPLS و رندوم فارست.

متابولیت	جابجایی شیمیایی (ppm)	کد هفت رقمی هر متابولیت در پایگاه داده HMDB	VIP	مقدار اهمیت (importance)	p-value	تغییر مرتبه (Fold change)
۲-هیدروکسی والرات a,b	۱/۵۹۶ و ۱/۳۲۸	۰۰۰۱۸۶۳	۱/۸۴۴	۰/۲۴۱	۱/۶۶×۱۰-۶	↑۲/۱۰۸
لاکتوز a,b	۳/۵۸، ۳/۸۰۳، ۳/۹۵۳	۰۰۰۰۱۸۶	۱/۹۳۶	۰/۲۱۲	۱/۴۳×۱۰-۸	↑۲/۹۰۱
N-استیل لیزین a,b	۱/۹۷۲، ۱/۸۱	۰۰۰۰۲۰۶	۱/۱۴۸	۰/۲۰۶	۰/۰۰۲۲	↓۳/۵۰۱
۳-هیدروکسی بوتیرات a,b	۱/۱۸، ۲/۳۶	۰۰۰۰۳۵۷	۱/۴۹۱	۰/۱۷۳	۸/۷۱×۱۰-۵	↓۲/۷۶۸
هموسیتستین a,b	۲/۶۳، ۳/۸۷	۰۰۰۰۷۴۲	۱/۸۶۵	۰/۱۷۰	۲/۳۱×۱۰-۷	↑۱/۷۱۷
پرولین a,b	۲/۰۱۳، ۲/۳۳	۰۰۰۰۱۶۲	۱/۱۸۶	۰/۱۴۸	۸/۵۸×۱۰-۵	↓۲/۲۸۲
سیترولین a	۳/۷۴، ۱/۵۹، ۳/۱۳	۰۰۰۰۹۰۴	-	۰/۱۳۴	۰/۰۲۸	↓۲/۳۶۹
بوتیرات b	۱/۵۵، ۰/۸۹	۰۰۰۰۰۳۹	۱/۹۸۸	-	۳/۴۵×۱۰-۱۱	↑۲/۱۷۱
لاکتات a,b	۱/۳۲۷	۰۰۰۰۱۹۰	۱/۸۵۴	۰/۱۱۳	۲/۷۴×۱۰-۷	↑۳/۱۲۳
همووانیلات a,b	۳/۴۴۵	۰۰۰۰۱۱۸	۱/۸۷۴	۰/۱۰۶	۵/۷۸×۱۰-۶	↑۱/۶۰۲
بتا-آلانین a,b	۳/۱۷۴	۰۰۰۰۰۵۶	۱/۱۱۹	۰/۰۹۹	۰/۰۰۹	↓۲/۰۵۹
اورنیتین a	۳/۰۵، ۱/۹۳	۰۰۰۰۲۱۴	-	۰/۰۹۵	۰/۰۰۰۳	↓۲/۲۷۵
۲-متیل گلوکارات a,b	۱/۷۵، ۱/۰۷	۰۰۰۰۴۲۲	۱/۷۵۷	۰/۰۵۱	۴/۱۳×۱۰-۶	↑۲/۸۹۸
گلوکاتامین a	۲/۱۳، ۳/۷۸۴، ۲/۵۵	۰۰۰۰۱۲۵	-	۰/۰۴۹	۰/۰۲۱	↓۵/۹۲۳
ایزولوسین a	۰/۹۹۷، ۱/۹۷	۰۰۰۰۱۷۲	-	۰/۰۴۶	۰/۰۱۳	↑۱/۹۱۰
اکسولوتارات a,b	۲/۴۴۶	۰۰۰۰۲۰۸	۱/۶۲۴	۰/۰۳۱	۰/۰۰۰۵	↑۳/۱۷۷
بتائین a,b	۳/۸۹، ۳/۲۵	۰۰۰۰۰۴۳	۱/۶۹۵	۰/۰۲۶	۰/۰۰۰۴۸	↑۱/۵۲۴
پانتوتنات a,b	۳/۵۰۷، ۰/۹۱	۰۰۰۰۲۱۰	۱/۸۶۱	۰/۰۳۰	۴/۴۵×۱۰-۵	↑۱/۸۳۱



a,b گلو تامات	۲/۳۰۲, ۲/۰۷	۰۰۰۰۱۴۸	۱/۷۰۳	۰/۰۲۶	۱/۵۸×۱۰-۵	↑۱/۴۴۳
a,b ترئونین	۱/۳, ۳/۵۷	۰۰۰۰۱۶۷	۱/۶۳۵	۰/۰۲	۰/۰۰۰۷	↑۱/۷۵۱
a سالیو-اینوزیتول	۳/۳۳	۰۰۰۶۰۸۸	-	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸۰	↓۲/۴۵۲
a,b تائورین	۳/۴۲, ۳/۲۷	۰۰۰۰۲۵۱	۱/۷۴۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۰۵	↑۱/۳۹۷
b متیونین	۳/۸۵, ۲/۱۳	۰۰۰۰۶۹۶	۱/۶۷۶	-	۰/۰۰۱۳	↑۱/۶۷۰
b فسفوسرین	۳/۹۳	۰۰۰۰۲۷۲	۱/۶۴۴	-	۰/۰۱۰۲	↑۱/۲۳۲
b پروپیونات	۲/۱۸, ۱/۰۲	۰۰۰۰۲۳۷	۱/۶۱۳	-	۰/۰۱۹۱	↑۱/۵۶۷
b والین	۱/۰۴, ۳/۵۹	۰۰۰۰۸۸۳	۱/۵۰۸	-	۰/۰۰۴۸	↑۱/۶۰۰
b مایو-اینوزیتول	۳/۶۱	۰۰۰۰۲۱۱	۱/۷۲۰	-	۰/۰۰۲۰	↑۱/۲۸۴
b گلیسین	۳/۵۵	۰۰۰۰۱۲۳	۱/۶۶۸	-	۰/۰۰۴۷	↑۱/۲۹۵

a: متابولیت های معنی دار پس از انجام مدل رندوم فارست، b: متابولیت های معنی دار پس از انجام مدل OPLS. ↑: افزایش متابولیت در بیمار، ↓: کاهش متابولیت در بیمار. در ستون دوم، جابجایی شیمیایی هر متابولیت در طیف NMR نشان داده شده است. ستون سوم، کد مربوط به هر متابولیت در پایگاه HMDB می باشد. مقدار VIP، اهمیت متابولیت در مدل OPLS و ستون پنجم در جدول، اهمیت متابولیت در مدل رندوم فارست را نشان می دهد.

جدول ۴. مسیرهای متابولیکی درگیر در بیماری آلزایمر بر اساس متابولیت های افتراقی بدست آمده با روش NMR.

میزان تأثیر	FDR	p-value	متابولیت های مرتبط	مسیر بیوشیمیایی
۱	۰/۰۴۳	۰/۰۰۳۱	گلو تامیک اسید، اکسولوتارات	متابولیسم گلو تامین و گلو تامات
۰/۶۶۶	۰/۰۵۴	۰/۰۱۶۴	والین، ایزولوسین	بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین
۰/۴۲۱	۰/۰۲۸	۰/۰۰۱۰	گلو تاتیون، گلیسین، گلو تامیک اسید، اورنیتین	متابولیسم گلو تاتیون
۰/۳۷۹	۰/۰۳۸	۰/۰۰۲۳	بتائین، گلیسین، فسفوسرین، ترئونین	متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین
۰/۳۱۵	۰/۰۴۸	۰/۰۰۷۶	اورنیتین، سیترولین، گلو تامیک اسید، پرولین	متابولیسم آرژینین و پرولین
۰/۰۲۰	۰/۰۳۸	۰/۰۰۲۲	پانتوتنات، والین، بتا-آلانین	بیوسنتز پانتوتنات و کوآنزیم آ

مهم ترین مسیرهای بیوشیمیایی که دارای مقدار p کمتر از ۰/۰۵ و میزان تأثیر بالاتر از صفر بوده اند

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، تلاش گردید که با استفاده از روش متابولومیکسی طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR)، متابولیت مارکرهای بالقوه در تشخیص بیماری آلزایمر در نمونه های سرم موش های صحرایی مدل آلزایمری، مورد شناسایی قرار گیرند. بر اساس نتایج حاصل از مدل آماری OPLS، در گروه مدل آلزایمری متابولیت های N-استیل لیزین، ۳-هیدروکسی بوتیرات، پرولین و بتا-آلانین دارای مقادیر کاهشی و متابولیت های ۲-هیدروکسی والرات، لاکتوز، هموسیستین، بوتیرات، هموانیلات، ۲-متیل گلو تارات، پانتوتنات، بتائین، گلو تامات، ترئونین، لاکتات، اکسولوتارات، تائورین، متیونین، فسفوسرین، پروپیونات، والین، مایو-اینوزیتول، و گلیسین، دارای مقادیر افزایشی نسبت به گروه سالم بودند. بر اساس نتایج مدل رندوم فارست نیز، متابولیت های N-استیل لیزین، ۳-هیدروکسی بوتیرات، پرولین، سیترولین، بتا-آلانین، اورنیتین، گلو تاتیون، و سالیو-اینوزیتول کاهش معنی دار و متابولیت های ۲-هیدروکسی والرات، لاکتوز، هموسیستین، بوتیرات، لاکتات، هموانیلات، ۲-متیل گلو تارات، ایزولوسین، اکسولوتارات، بتائین، پانتوتنات، گلو تامات، ترئونین و تائورین افزایش معنی دار در گروه بیمار نشان دادند.

مغز، بخش قابل توجهی از کل انرژی مورد نیاز بدن را مصرف می کند، یعنی حدود ۲۰ تا ۲۳٪ از کل انرژی مورد نیاز بدن با وجود این که فقط ۲/۳-۲٪ از وزن بدن را تشکیل می دهد [۲۱، ۲۰]. سه مسیر عمده مرتبط با متابولیسم انرژی مغز عبارتند از: جریان خون مغزی-عروقی، میزان مصرف اکسیژن و متابولیسم گلوکز که همه این مسیرها با استفاده از تکنیک هایی کم تر تهاجمی می توانند به طور مستقل در انسان اندازه گیری شوند. در مطالعه ما نتایج حاکی از درگیر بودن سه مسیر یاد شده است. گلوکز سوبسترای اصلی تامین انرژی در مغز می باشد. به دلیل نقص در ناقل GLUT-1 در بیماران آلزایمری گلوکز نمی تواند به راحتی از سد خونی-مغزی عبور کند. لذا در این بیماران توانایی مغز برای استفاده از گلوکز کاهش می یابد. در حالی که برای حفظ توازن های یونی همراه با انتقالات سیناپسی انرژی حاصل از اکسیداسیون گلوکز ضروری می باشد [۲۲، ۲۳]. شواهد نوروبیولوژیکی بیانگر این است که در آلزایمر اجسام کتوننی سوبستراهای جایگزین انرژی در مغز می باشند [۲۴]. نتایج ما نیز نشان می دهد که لاکتات در بین متابولیت های افتراقی بین گروه کنترل و مدل بیماری آلزایمر افزایش چشمگیری پیدا می کند. با افزایش لاکتات تئوری کاهش متابولیسم اکسیداتیو انرژی تقویت می شود. در بیماری آلزایمر

آروماتیک بزرگ تر (تریپتوفان، فنیل آلانین، تیروزین) می باشند [۳۴]. در توافق با نتایج فکس و همکارانش، بیماران آلزایمری نسبت اسید آمینه‌هایی چون سرین، متیونین و تاورین بالاتری دارند. این بیانگر یک اختلال عملکرد واکنش ترانس متیلاسیون می باشد که در سلول‌های مغزی برای سنتز میلین، نوروترانسمیترها و فسفولیپیدهای غشایی اساسی و ضروری می باشد [۳۵]. اختلال در عملکرد ترانس متیلاسیون به عنوان فرضیه‌ای است که در آلزایمری شدن نشان داده شده است [۳۶].

سطح گلو تاتیون، یک تری پپتید که در واکنش‌های اکسیدان-آنتی اکسیدان نقش دارد، نیز در سرم خون بیماران پایین تر از کنترل است. گلو تاتیون نقش اصلی را در دفاع سلولی علیه استرس اکسیداتیو به عهده دارد؛ هم چنین در تنظیم بیان ژن، انتقال سیگنال، تکثیر و مرگ سلولی، تولید سیتوکین ها و پاسخ ایمنی دخیل می باشد. کمبود گلو تاتیون در فرایند پیری و پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها شامل بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت، ایدز، بیماری‌های سیستم عصبی و تنفسی نقش ایفا می کند. نقش کاهش گلو تاتیون در AD و در زوال عقل ثبت شده است [۳۷، ۳۸]. گلو تامات که نوروترانسمیتر عمده‌ی تحریکی است و در نورون‌های دستگاه عصبی مرکزی وجود دارد، نمی تواند از سد مغزی خونی عبور کند و لذا در میتوکندری‌های سلول‌های عصبی از گلوکز یا از گلو تامین ساخته می شود. حداقل سه نوع فرعی گیرنده‌ی گلو تامات وجود دارد که در یادگیری و حافظه نقش دارند. این گیرنده (ان - متیل دی - آسپاراتات) (NMDA) نامیده می شود. با این حال، گلو تامات اضافی نشان داده شده است که نوروتوکسین قوی است و منجر به مرگ سلول‌های عصبی می شود [۳۹]. در مطالعه ما هموسیستئین نسبت به گروه کنترل سطح بالاتری داشت که این نتایج با مطالعات دیگری هم چون مطالعه موريس مطابق داشت [۴۰]. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که افزایش هموسیستئین با افزایش خطر ابتلا به اختلال شناختی و زوال عقل همراه است [۴۱]. پاپ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای به نقش هموسیستئین در پیشرفت بیماری آلزایمر پرداختند. آن‌ها نشان دادند که متابولیسم هموسیستئین با تجمع پروتئین تائو ارتباط دارد و می تواند به پاتولوژی کلاف عصبی در بیماری ارتباط داشته باشد [۴۲]. اورنیتین و سیترو لین از سوبستراهای مهم چرخه اوره، در بیماری آلزایمر کاهش چشمگیری دارند. به دلیل اختلال در عملکرد میتوکندری بالطبع این دو متابولیت نیز دست‌خوش تغییر خواهند شد. اختلال در عملکرد چرخه اوره و کاهش غلظت اورنیتین در سرم یا پلاسما بیماران آلزایمری در مطالعات گذشته نیز نشان داده شده است [۴۳-۴۵] که با نتایج ما هم خوانی دارد.

تبدیل گلوکز به پیروات در مسیر گلیکولیز و سپس تبدیل آن به استیل کوآ در چرخه کربس مختل شده و مسیر بی‌هوازی، تشکیل لاکتات را پیش می برد. مقالات متعددی وجود دارند که بیانگر اختلال در عملکرد میتوکندری (علی‌الخصوص زنجیره انتقال انرژی) در بیماری آلزایمر می باشند [۲۶، ۲۵] که افزایش لاکتات در پژوهش ما نیز این مطلب را تأیید می کند. ۳- هیدروکسی بوتیرات به عنوان جایگزین گلوکز برای تأمین انرژی می تواند استفاده شود و بنابراین انتظار داریم در سرم حیوانات مدل آلزایمری کاهش معناداری داشته باشد. نتایج کار ما نیز این کاهش را نشان می دهد که با مطالعات ژانگ و همکارانش که در سال ۲۰۱۳ منتشر شد، هم خوانی دارد [۲۷]. طی پروسه آلزایمری شدن، عملکرد چرخه کربس مختل شده و متابولیت‌های درگیر در این چرخه دست‌خوش تغییرات جدی می شوند که از آن جمله می توان به ۲-اکسوگلو تارات اشاره کرد. به طوری که گلو تامین، گلو تامات، لوسین، اگرالواستات، ایزولوسین و ۲-هیدروکسی والرات در بیماران مبتلا به AD در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می دهد [۲۸]. نتایج این مطالعه نیز افزایش این متابولیت‌ها را در حیوانات مدل آلزایمری نشان می دهد. به نظر می رسد این متابولیت‌ها به اختلال عملکرد میتوکندری مربوط می شود. مورینا و همکارانش در سال ۲۰۱۰ [۲۹] و وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ [۳۰] نتایجی را منتشر کردند که نشان می دهد که در نتیجه استرس اکسیداتیو در عملکرد میتوکندری اختلال ایجاد می شود. اسیدهای آمینه، به خصوص آلانین و گلو تامین، هم چنین ترئونین، گلیسین و سرین می توانند از طریق مسیر گلوکوژنوژنز برای سنتز گلوکز مورد استفاده قرار گیرند. مسیر گلیکولیتیک به شدت در مغز فعال است و تأمین انرژی از طرق مختلف انجام می شود [۳۱].

بتائین یکی از متابولیت‌های درگیر در مسیر گلیسین به عنوان یک اسمولیت رایج است که به دلیل گزارش‌های بالینی حاکی از ارتباط مکمل بتائین با شناخت بهتر و محافظت عصبی، اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است. بتائین مسیرهای تولید انتقال‌دهنده عصبی مهاری را تحت تأثیر قرار می دهد و به عنوان یک اسمولیت و واسطه متابولیک عمل می کند و در مدولاسیون نوروفیزیولوژی هیپوکامپ و محافظت نورونی نقش دارد [۳۲، ۳۳]. در بیماری آلزایمر متابولیسم اسیدهای آمینه مخصوصاً اسیدهای آمینه شاخه دار مختل می شوند. مطالعات فرنستروم و همکارانش در ۲۰۰۵ بیانگر این موضوع می باشد. جذب این اسیدهای آمینه در مغز از طریق سد مغزی-خونی از طریق حامل انتقالی اتفاق می افتد که این حامل مشترک با اسیدهای آمینه بزرگ تر مانند تریپتوفان پیش‌ساز سروتونین می باشد. یا به عبارتی در حال رقابت با اسیدهای آمینه

- [7] Genin E, Hannequin D, Wallon D, Slegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 903-907.
- [8] Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009; 302: 385-393.
- [9] Valotassiou V, Malamitsi J, Papatrifiatayfyllou J, Dardiotis E, Tsougos I, Psimadas D, et al. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease. *Ann Nucl Med* 2018; 32: 583-593.
- [10] Gao F, Barker PB. Various MRS application tools for Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2014; 35: S1-S4.
- [11] Joe E, Medina LD, Ringman JM, O'Neill J. (1)H MRS spectroscopy in preclinical autosomal dominant Alzheimer disease. *Brain Imaging Behav* 2019; 13: 925-932.
- [12] Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 617-633.
- [13] Farrokhi Yekta R, Rezaie Tavirani M, Arefi Oskouie A, Mohajeri-Tehrani MR, Soroush AR. The metabolomics and lipidomics window into thyroid cancer research. *Biomarkers* 2017; 22: 595-603.
- [14] Oskouie AA, Taheri S. Recent developments and application of metabolomics in cancer diseases. *J Paramed Sci* 2015; 6: 116-134.
- [15] González-Domínguez R, Sayago A, Fernández-Recamales Á. Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1071: 75-92.
- [16] Paxinos G. *The Rat Nervous System*: Elsevier Science; 2014.
- [17] Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, et al. *BioMagResBank*. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D402-D408.
- [18] Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: D608-D617.
- [19] Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. *MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful*. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: W251-W257.
- [20] Holliday MA. Metabolic rate and organ size during growth from infancy to maturity and during late gestation and early infancy. *Pediatrics* 1971; 47: 169.
- [21] Sokoloff L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem Res* 1999; 24: 321-329.
- [22] Wijesekera N, Gonçalves RA, De Felice FG, Fraser PE. Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2018; 136: 172-181.
- [23] Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, Oka S, Hamasaki H, Iwaki T, et al. Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev* 2017; 161: 95-104.
- [24] Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, St-Pierre V, Vandenberghe C, Pierotti T, Fortier M, et al. Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1367: 12-20.
- [25] Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018; 62: 1403-1416.
- [26] Wilkins HM, Swerdlow RH. Relationships between mitochondria and neuroinflammation: implications for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2016; 16: 849-857.
- [27] Zhang M, Cheng X, Dang R, Zhang W, Zhang J, Z Y. Lactate deficit in an Alzheimer disease mouse model: the relationship with neuronal damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018; 77: 1163-1176.
- [28] Jiang N, Yan X, Zhou W, Zhang Q, Chen H, Zhang Y, et al. NMR-based metabolomic investigations into the metabolic profile of the senescence-accelerated mouse. *J Proteome Res* 2008; 7: 3678-3686.
- [29] Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 2-10.
- [30] Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 1240-1247.

شناسایی متابولیت‌های افتراقی بین گروه بیمار و کنترل و مسیرهای متابولیتی مرتبط با آن‌ها می‌تواند درک زیستی و پاتولوژی بیماری را بهبود بخشد. به‌ویژه دستیابی به روش‌هایی که تشخیص زودرس و نمونه‌گیری غیر تهاجمی را امکان‌پذیر نماید از ضروریات کمک به این بیماری مخرب است. در این تحقیق از روش‌های متابولومیکس برای بررسی بیماری آلزایمر استفاده گردید. متابولومیکس یک ابزار مهم در کشف و شناسایی نشانگرهای زیستی در امر تشخیص و درمان می‌باشد. در حال حاضر برای حرکت به سمت جلو و کمک به استفاده از این نتایج در بالین نیاز مبرم برای ارزیابی و اعتبارسنجی متابولیت‌های شناسایی شده وجود دارد. با توجه به نتایج برگرفته از این تحقیق، مسیرهای تغییر یافته در گروه آلزایمری در مقایسه با کنترل شامل تغییرات در مسیر متابولیسم گلوتامین و گلوتامات، مسیر بیوستنز والین، لوسین و ایزولوسین، متابولیسم گلوکوتایون، متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین، متابولیسم آرژینین و پرولین می‌باشند. همچنین نتایج نشان داد که پروفایلی از متابولیت‌ها می‌توانند به‌عنوان مارکرهای بالقوه برای شناسایی بیماری آلزایمر در نمونه خون که با روش‌های کم‌تر تهاجمی جمع‌آوری می‌شود مورد استفاده قرار گیرند، گرچه این نتایج باید در گروه‌های بزرگ‌تر و با روش‌های تجزیه‌ای دیگر مورد تأیید قرار گیرند.

## تشکر و قدردانی

از همکاران محترم بخش فیزیولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، همچنین دانشکده شیمی و آزمایشگاه NMR دانشگاه صنعتی شریف که ما را در انجام این پروژه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## منابع

- [1] Johnson ECB, Dammer EB, Duong DM, Yin L, Thambisetty M, Troncoso JC, et al. Deep proteomic network analysis of Alzheimer's disease brain reveals alterations in RNA binding proteins and RNA splicing associated with disease. *Mol Neurodegener* 2018; 13(1): 52.
- [2] Korolainen MA, Nyman TA, Aittokallio T, Pirttilä T. An update on clinical proteomics in Alzheimer's research. *J Neurochem* 2010; 112: 1386-1414.
- [3] Selkoe DJ. Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature* 1991; 354: 432-433.
- [4] Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 168-174.
- [5] Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 768-778.
- [6] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.

[39] Cooper AJL, Jeitner TM. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules* 2016; 6: 16.

[40] Morris MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 425-428.

[41] Oulhaj A, Refsum H, Beaumont H, Williams J, King E, Jacoby R, et al. Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010; 25: 82-90.

[42] Papp KV, Walsh SJ, Snyder PJ. Immediate and delayed effects of cognitive interventions in healthy elderly: a review of current literature and future directions. *Alzheimers Dement* 2009; 5: 50-60.

[43] Hansmann F, Sillaire A, Kamboh MI, Lendon C, Pasquier F, Hannequin D, et al. Is the urea cycle involved in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2010; 21: 1013-1021.

[44] Jęśko H, Lukiw WJ, Wilkaniec A, Cieślak M, Gąssowska-Dobrowolska M, Murawska E, et al. Altered expression of Urea cycle enzymes in amyloid- $\beta$  protein precursor overexpressing PC12 cells and in sporadic Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 2018; 62: 279-291.

[45] Bergen AA, Kaing S, ten Brink JB, Netherlands Brain B, Gorgels TG, Janssen SF. Gene expression and functional annotation of human choroid plexus epithelium failure in Alzheimer's disease. *BMC Genomics* 2015; 16: 956.

[31] Harris RA, Tindale L, Cumming RC. Age-dependent metabolic dysregulation in cancer and Alzheimer's disease. *Biogerontology* 2014; 15: 559-577.

[32] Zhao G, He F, Wu C, Li P, Li N, Deng J, et al. Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications. *Front Immunol* 2018; 9: 107.

[33] Leiteritz A, Dilberger B, Wenzel U, Fitzenberger E. Betaine reduces  $\beta$ -amyloid-induced paralysis through activation of cystathionine- $\beta$ -synthase in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Nutr* 2018; 13: 21.

[34] Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr* 2005; 135: 1539S-1546S.

[35] Fekkes D, van der Cammen TJ, van Loon CP, Verschoor C, van Harskamp F, de Koning I, et al. Abnormal amino acid metabolism in patients with early stage Alzheimer dementia. *J Neural Transm (Vienna)* 1998; 105: 287-294.

[36] Mahajan UV, Varma VR, Griswold ME, Blackshear CT, An Y, Oommen AM, et al. Dysregulation of multiple metabolic networks related to brain transmethylation and polyamine pathways in Alzheimer disease: A targeted metabolomic and transcriptomic study. *PLoS Med* 2020; 17: e1003012.

[37] Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1075-1083.

[38] Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 346-349.

# Survey of potential diagnostic metabolite markers in serum of the rat model of Alzheimer's disease using nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) technique

Fatemeh Goshadrou (Ph.D)<sup>1</sup>, Reyhaneh Farrokhi Yekta (Ph.D)<sup>2,1</sup>, Afsaneh Arefi Oskouie (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Maryam Eslami (Ph.D)<sup>3</sup>

1- Faculty of Paramedical Sciences, Department of Basic Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Dept. of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21-22721150 a.arefi@sbmu.ac.ir

Received: 19 Sep 2019; Accepted: 6 Jul 2020

**Introduction:** The high prevalence of Alzheimer's disease (AD) in today's societies indicates an urgent need for the development of methods that will help the early diagnosis of the disease. In this study, using proton nuclear magnetic resonance spectrometry ( $^1\text{H-NMR}$ ) metabolomics, identification of altered and distinct metabolites in serum of the rat model of AD was performed compared with healthy controls with the aim of introducing potential markers and to further understand the mechanisms of the AD.

**Materials and Methods:** Serum samples from 25 adult male rats (10 healthy and 15 AD) were collected and their metabolites were extracted and analyzed using  $^1\text{H-NMR}$  technique. Differential metabolite profile was then determined by multivariate statistical analysis. The behavioral screening of the model rats was performed by the paired-associated learning method.

**Results:** The results of the behavioral study showed the impairment of memory abilities in AD rats. Differential metabolites between the two groups were identified by multivariate analysis methods such as OPLS and Random Forest. Importantly, the results showed that there were differences in the pathways related to energy and amino acid metabolism between the control group and the Alzheimer's model.

**Conclusion:** This research opens new horizons to identify biomarkers and physiological pathways involved in Alzheimer's disease. The introduced metabolites must be confirmed by further studies and might be used as candidate biomarkers for early detection of the disease.

**Keywords:** Alzheimer Disease, Metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.