

## ***Evaluating the Effectiveness of Betaine Against Oxidative and Histopathological Damage Caused by Acrylamide in the Rat Brain***

Javad Fasahi<sup>1</sup>,  
Hasan Baghshani<sup>2</sup>,  
Zahra Moosavi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Clinical Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received May 21, 2023 ; Accepted August 19, 2023)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Acrylamide is a chemical compound that is widely used in the production of paper, paint, and other industrial products. Food and cigarette smoke are primary sources of exposure to acrylamide. Betaine is a native compound with antioxidant properties and has also been reported as a protective agent against tissue damages induced by some toxicants. This study aimed to evaluate the possible effectiveness of betaine against the damage caused by acrylamide in brain.

**Materials and methods:** In this experimental study, 28 male rats were randomly divided into four groups. The first group was considered as the control group. Group 2 received acrylamide (50 mg/kg;ip). Group 3 received the diet containing 2% betaine in addition to acrylamide. Rats in group 4 received diet containing 2% betaine. At the end of the experimental period (the eleventh day), brain tissue was sampled for biochemical and histopathological evaluation. ANOVA and Bonferroni tests were utilized to compare the means of biochemical data, and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were employed to investigate histopathological data. Calculations were conducted using SPSS/PC V21.

**Results:** In the group receiving acrylamide, significant reduction in catalase and superoxide dismutase and significant increase in proteins carbonyl groups and malondialdehyde were observed in comparison to the control group ( $P<0.05$ ). Hyperemia, microgliosis, and ischemic cell changes in the brain tissue of the group receiving acrylamide increased significantly compared to the control group ( $P<0.05$ ). Administration of betaine in acrylamide+betaine group caused an increasing trend of catalase and superoxide dismutase relative to group 2 in a manner that were comparable with those of the control group. Likewise, betaine administration in acrylamide+betaine group significantly ( $P<0.05$ ) reduced the severity of ischemic cell changes and non-significantly reduced hyperemia and microgliosis compared to the group receiving acrylamide.

**Conclusion:** Betaine administration could be beneficial to oxidative indices alterations and could improve tissue damage induced by acrylamide in brain of rats.

**Keywords:** acrylamide, betaine, oxidative status, brain damage

**J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (225): 45-57 (Persian).**

**Corresponding Author:** Hasan Baghshani - School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.  
(E-mail: baghshani@um.ac.ir)

# اثربخشی بتائین در برابر آسیب اکسیداتیو و هیستوپاتولوژیک ناشی از آکریل آمید در مغز موش صحرایی

جواد فساهی<sup>1</sup>

حسن باغشانی<sup>2</sup>

زهراموسوی<sup>3</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** آکریل آمید یک ماده شیمیایی است که به طور گسترده در تولید کاغذ، رنگ و سایر محصولات صنعتی استفاده می شود. غذا و دود سیگار منابع اصلی قرار گرفتن در معرض آکریل آمید هستند. بتائین یک ترکیب طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی است و اثرات محافظتی آن در پیشگیری از آسیب های بافتی ناشی از برخی مسمومیت ها نیز گزارش شده است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثربخشی بتائین در برابر آسیب ناشی از آکریل آمید در بافت مغز انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی 28 موش صحرایی نر به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه 1 به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه 2، روزانه آکریل آمید (50mg/kg; ip) دریافت نمودند. گروه 3 علاوه بر آکریل آمید، غذای حاوی 2 درصد بتائین دریافت کردند. موش های گروه 4 غذای حاوی 2 درصد بتائین دریافت نمودند. در پایان دوره آزمایش (یازدهمین روز)، نمونه گیری از بافت مغز برای ارزیابی بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیکی انجام شد. از آزمون های ANOVA و Bonferroni برای مقایسه میانگین داده های بیوشیمیایی گروه ها و از آزمون های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney برای بررسی داده های هیستوپاتولوژی استفاده شد. تمامی محاسبات به کمک نرم افزار SPSS/PC، نسخه 21، انجام شد.

**یافته ها:** در گروه دریافت کننده آکریل آمید کاهش معنی دار کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و افزایش معنی دار ( $P < 0/05$ ) گروه های کربونیل پروتئین ها و مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. پرخونی، میکروگلیوزیس و تغییرات ایسکمیک سلولی در بافت مغز موش های گروه دریافت کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). به دنبال تجویز بتائین در گروه 3 (آکریل آمید+بتائین) مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید افزایش نشان دادند و در مقایسه با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی دار بودند. هم چنین تجویز بتائین در گروه آکریل آمید+بتائین باعث کاهش معنی دار تغییرات ایسکمیک سلولی در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید ( $P < 0/05$ ) و کاهش غیر معنی دار پرخونی و میکروگلیوزیس در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید شد.

**استنتاج:** تجویز بتائین می تواند در کاهش تغییرات شاخص های اکسیداتیو و نیز در التیام آسیب بافتی ناشی از آکریل آمید در بافت مغز موش مفید باشد.

**واژه های کلیدی:** آکریل آمید، بتائین، وضعیت اکسیداتیو، آسیب مغزی

## مقدمه

آکریل آمید (ACR) یک ماده شیمیایی است که به طور عمده برای ساخت موادی به نام پلی آکریل آمید و کوپلیمرهای آکریل آمید استفاده می شود. کوپلیمرهای پلی آکریل آمید و پلی آکریل آمید در بسیاری از فرآیندهای

E-mail: baghishani@um.ac.ir

**مؤلف مسئول:** حسن باغشانی - مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی

1. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

2. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

3. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1402/3/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/4/7 تاریخ تصویب: 1402/5/29

صنعتی مانند تولید کاغذ، رنگ و پلاستیک و در تصفیه آب آشامیدنی و فاضلاب استفاده می‌شوند (1). مهم‌ترین راه ورود آکریل‌آمید به بدن انسان مصرف غذاهای پخته شده در دمای بالا و قرار گرفتن در معرض دود تنباکو است. هم‌چنین افرادی که در صنایع تولید یا استفاده از آکریل‌آمید کار می‌کنند می‌توانند از طریق تماس پوستی یا استنشاق در معرض آکریل‌آمید قرار گیرند (2). بدن مقداری آکریل‌آمید را به گلیسیدآمید تبدیل می‌کند؛ هر دو ترکیب آکریل‌آمید و گلیسیدآمید می‌توانند به هموگلوبین متصل شوند و از طریق جریان خون به ارگان‌های مختلف بدن، از جمله کبد، کلیه، مغز، قلب، تیموس، وارد شود. استنشاق مقادیر زیادی آکریل‌آمید می‌تواند دستگاه تنفسی را تحریک کند (3). مطالعات انجام شده بر روی حیوانات آزمایشگاهی، نشان دادند که آکریل‌آمید باعث مشکلات تولیدمثل، آسیب عصبی و سرطان می‌شود (4-6). مشخص شده است که آکریل‌آمید به‌طور مشخص می‌تواند باعث آسیب به سلول‌های مغزی و تحلیل آکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی شود (5). در زمینه اثرات مسمومیت عصبی آکریل‌آمید مطالعات گسترده‌ای بر روی انواع مدل‌های آزمایشگاهی از جمله، موش، رت، خوکچه هندی، سگ و گربه انجام شده است و به‌طور کلی نتایج نشان داده است که علائم شایع مسمومیت عصبی در تمامی این مدل‌ها تقریباً یکسان بوده و باعث بروز برخی نواقص عصبی می‌شود؛ از جمله این که این مدل‌ها پاهای عقب خود را در موقعیتی دورتر از کل بدن قرار می‌دهند، دچار ضعف عضلات اسکلتی می‌شوند و توانایی چنگ‌زنی نیز در آن‌ها ضعیف‌تر می‌شود. هم‌چنین برخی تغییرات وزنی نیز در مدل‌هایی که آکریل‌آمید دریافت کرده‌اند مشاهده شده است (7،5،8). این ماده شیمیایی می‌تواند باعث آسیب به بافت‌های مختلف مانند ریه، کبد، کلیه، بیضه و مغز شود، پراکسیداسیون چربی‌ها و سطح مالون دی‌آلدئید را افزایش دهد و میزان ذخایر گلو‌تاتیون را در بافت‌هایی مانند مغز، نخاع، عصب سیاتیک کاهش

دهد و از آن‌جا که گلو‌تاتیون یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی است، این عملکرد آکریل‌آمید پیامدهای زیان‌باری به دنبال خواهد داشت (9-11). مشخص شده است که آکریل‌آمید با ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام می‌تواند قدرت باروری اسپرم را در انسان کاهش دهد (12). آکریل‌آمید با ایجاد استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی باعث افزایش تعداد سلول‌های التهابی و کاهش نسبت آنتی‌اکسیدان‌ها به اکسیدان‌ها می‌شود. هم‌چنین افزایش نسبت BAX به BCL-2 به دنبال دریافت آکریل‌آمید باعث افزایش روند آپوپتوز در تخمدان موش صحرایی شده است (13). هم‌چنین با ایجاد استرس اکسیداتیو در گلبول‌های قرمز، باعث افزایش همولیز داخل عروقی می‌شود (14). با توجه به این که همولیز بیش از حد داخل عروقی با بیماری‌های قلبی عروقی در ارتباط است (15،16) پیشنهاد شده است که مصرف ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی ممکن است در کاهش همولیز و یا کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آکریل‌آمید موثر باشد (17). نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که آکریل‌آمید در بافت مغز همورازی و نکروز را افزایش می‌دهد (18،19). مطالعات مختلفی با هدف بررسی اثرات ترکیبات با منشأ طبیعی در پیشگیری و درمان انواع مسمومیت‌ها از جمله مسمومیت ناشی از آکریل‌آمید انجام شده است (20).

بتائین اولین بار در قرن نوزدهم در آب چغندر قند کشف شده است و متعاقباً در چندین منبع دیگر یافت شده است؛ به سرعت جذب می‌شود و به‌عنوان یک ماده طبیعی دارای خواص آنتی‌اکسیدان در تغذیه انسان و حیوانات کاربرد دارد (21،22). عملکرد فیزیولوژیکی بتائین یا به‌عنوان یک اسمولیت آلی برای محافظت از سلول‌ها تحت استرس یا به‌عنوان یک منبع مهم از گروه‌های متیل است که در چرخه متیونین از طریق بتائین هموسیستئین متیل ترانسفراز (Betaine-homocysteine methyltransferase) شرکت می‌کند، این ترکیب می‌تواند متیونین و متعاقباً

S-آدنوزیل متیونین را تامین نماید که برای سنتز کراتین، پروتئین‌ها، فسفولیپیدها، کارنتین و برخی هورمون‌ها و انتقال دهنده‌های عصبی مورد نیاز است (22,23). بتائین همچنین به عنوان یک عامل بهبود دهنده در برابر سمیت عصبی ناشی از مواد شیمیایی مختلف معرفی شده است (24). بتائین به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و متیل‌دهندگی در کاهش اثرات مخرب هیپرهوموسیستینمی و استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول موثر است (25). سایر مطالعات انجام شده بر روی بتائین مشخص کرده است که این ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در کاهش اثرات مخرب ناشی از تتراکلرید کربن در بافت کلیه موش صحرایی موثر باشد (26). نتایج مطالعه دیگری که به منظور بررسی تأثیر بتائین بر آسیب اکسیداتیو ناشی از کادمیوم در کلیه موش صحرایی انجام شد، نشان داده است که بتائین می‌تواند با عملکرد آنتی‌اکسیدانی بر کاهش سمیت ناشی از کادمیوم در کلیه‌های موش‌های صحرایی موثر باشد (27). مکمل بتائین می‌تواند آسیب اکسیداتیو کبدی و میتوکندریایی ناشی از حرارت را در جوجه‌های گوشتی کاهش دهد (28). این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات بهبود دهنده‌گی بتائین در برابر آسیب ناشی از ACR در بافت مغز موش صحرایی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است که تمام روش‌های مورد استفاده به تایید کمیته اخلاق پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد رسید (کد اخلاق IR.UM.REC.1400.018). 28 موش صحرایی نر بالغ ( $250 \pm 9$  گرم)، تحت یک برنامه به خوبی تنظیم شده نور و تاریکی (12 ساعت: 12 ساعت) در دمای 22-25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه 1 به‌عنوان گروه کنترل (برای 11 روز متوالی) آب و غذای تجاری جوندگان دریافت کردند. گروه 2، روزانه آکریل آمید (برای 11 روز متوالی 50mg/kg; ip) دریافت نمودند.

گروه 3 علاوه بر آکریل آمید (برای 11 روز متوالی 50mg/kg; ip)، غذای حاوی 2 درصد بتائین دریافت کردند. موش‌های گروه چهار (برای 11 روز متوالی) غذای حاوی 2 درصد بتائین دریافت نمودند. انتخاب دوز در مطالعه حاضر براساس آثار منتشر شده قبلی برای آکریل آمید (29,30) و بتائین (26,31) صورت گرفت. آکریل آمید ( $C_3H_5NO$ ) و بتائین ( $C_5H_{11}NO_2$ ) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده، از شرکت Merck یا Sigma-Aldrich خریداری شدند. در پایان دوره آزمایش (11 روز)، نمونه‌گیری از بافت مغز برای ارزیابی بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیکی انجام شد. بافت مغز بلافاصله پس از نمونه‌گیری با نرمال سالین شستشو داده شد و بخشی از آن برای ارزیابی فراسنجه‌های اکسیداتیو در دمای  $-70^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد؛ باقیمانده بافت مغز، در بافر فرمالین خنثی 10 درصد تا زمان ارزیابی هیستوپاتولوژی نگهداری شد.

### اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو

برای اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو، نمونه‌های بافت منجمد به سرعت ذوب و با بافر فسفات (0/05 مولار؛ 7/4 PH) هموژنیزه شدند و پس از سانتریفیوژ (4000g به مدت 15 دقیقه)، مایع رویی برای سنجش فراسنجه‌های اکسیداتیو استفاده شد. فعالیت آنزیم‌های گلو تاتیون پراکسیداز (GPX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در عصاره‌های بافتی با استفاده از کیت شرکت Randox اندازه‌گیری شد. فعالیت کاتالاز (CAT) بر اساس روش Claiborne ارزیابی شد که بر مبنای کاهش جذب در طول موج 240 نانومتر به دلیل تجزیه  $H_2O_2$  توسط CAT می‌باشد (32). گلو تاتیون به‌وسیله‌ی روش المن اندازه‌گیری شد. این روش در برگیرنده‌ی اکسیداسیون GSH به‌وسیله واکنش با 5-5-dithiobis nitrobenzioc acid برای تشکیل مشتق زرد رنگی است که جذب آن در 412nm قابل اندازه‌گیری است (33). سنجش مالون دی

به نرمال بودن توزیع آن‌ها، آزمون ANOVA همراه با آزمون مقایسه‌ای Bonferoni test جهت مقایسه میانگین‌ها در گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بررسی آماری داده‌های هیستوپاتولوژی با آزمون Kruskal-wallis و مقایسه دوتایی گروه‌ها توسط تست mann-withney U انجام شد. سطح معنی‌داری با دقت  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS/PC، نسخه 21، انجام شد.

## یافته‌ها

### یافته‌های بیوشیمیایی

همان‌طور که نشان داده شده است (نمودار شماره 1-الف) مقادیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گروه دریافت‌کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است؛ تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید+بتائین) مقادیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید افزایش داده است؛ افزایش کاتالاز (CAT) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود. مقادیر مربوط به گلو تاتیون پراکسیداز (GPX) در بین گروه‌های آزمایشی تغییر معنی‌داری نداشت به‌طوری‌که تجویز آکریل آمید و بتائین هیچ تغییر معنی‌داری در سطح این فاکتور بیوشیمیایی ایجاد نکرده است. مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) و گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها در گروه دریافت‌کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید + بتائین) باعث کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید شده است؛ کاهش در مقادیر گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود (نمودار شماره 1-ب). میزان FRAP در بین گروه‌های مورد بررسی تغییر معنی‌داری نداشت به‌طوری‌که تجویز آکریل آمید و بتائین هیچ تغییر معنی‌داری در سطح این

آلدئید (MDA) بر مبنای واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید (TBA) و قرائت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 535 نانومتر انجام شد. ضریب جذب مولی  $156000 \text{ M}^{-1} \text{Cm}^{-1}$  برای محاسبه غلظت استفاده شد (34). جهت انجام تست FRAP کمپلکس (FeIII-TPTZ: Ferric trpyridyl triazine) توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه احیا شده و به فرم فروس ( $\text{Fe}^{+2}$ ) تبدیل می‌شود که به رنگ آبی تیره است. شدت رنگ ایجاد شده در دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 593 نانومتر اندازه‌گیری شد (35). گروه‌های کربونیل به‌عنوان شاخص میزان اکسیداسیون پروتئین بر پایه واکنش با 2-4 دی نیتروفنیل هیدرازین به روش اسپکتروفتومتری در طول موج 370 نانومتر اندازه‌گیری شد (36).

### ارزیابی هیستوپاتولوژیک

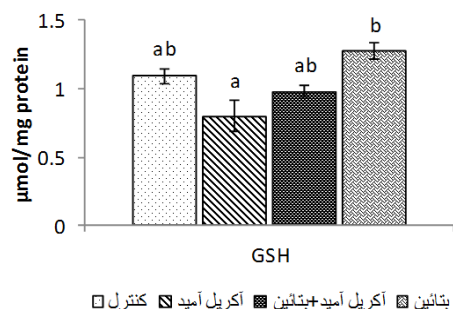
برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک، نمونه بافت مغز با ضخامت 5 میکرومتر برش داده شد و در ادامه با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شد. در پایان برخی از ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک، از جمله پرخونی، میکروگلیوزیس و تغییرات ایسکمیک سلول‌ها در بافت مغز در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, CH-2) بررسی شد. شدت ضایعات از 0 تا 4، همان‌طور که در جدول شماره 1 توضیح داده شده است، کمی‌سازی شدند (37).

جدول شماره 1: نحوه درجه‌بندی ضایعات میکروسکوپی مورد بررسی در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

| درجه‌بندی ضایعه مورد نظر | توضیحات                                                   |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 0                        | عدم وجود ضایعه                                            |
| 1                        | وجود ضایعه در 25٪ میدان‌های میکروسکوپی مورد مطالعه        |
| 2                        | وجود ضایعه در 25٪ تا 50٪ میدان‌های میکروسکوپی مورد مطالعه |
| 3                        | وجود ضایعه در 50٪ تا 75٪ میدان‌های میکروسکوپی مورد مطالعه |
| 4                        | وجود ضایعه در بیش از 75٪ میدان‌های میکروسکوپی مورد مطالعه |

### تجزیه و تحلیل آماری

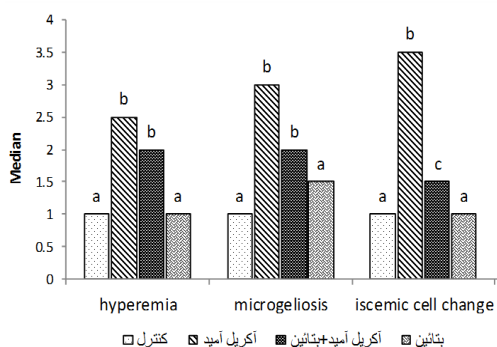
داده‌ها از نظر توزیع نرمال با استفاده از آزمون آماری kolmogorow-smirnow مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های آسیب اکسیداتیو و با توجه



نمودار شماره 1-د: مقدار GSH در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شدند. حروف غیرمشابه، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه است ( $P < 0/05$ ).

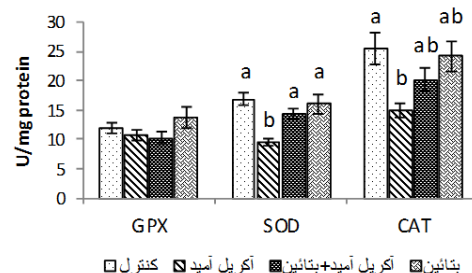
#### یافته‌های هیستوپاتولوژیک

نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد که ACR باعث افزایش معنی‌دار پرخونی، میکروگلیوزیس و تغییرات ایسکمیک سلولی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید + بتائین) باعث کاهش معنی‌دار تغییرات ایسکمیک سلولی در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید شده است. به دنبال تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید + بتائین)، کاهش در مقادیر پرخونی و میکروگلیوزیس در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود. (نمودار شماره 2، تصاویر شماره 1، 2، 3).

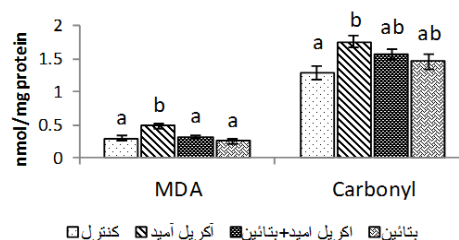


نمودار شماره 2: پرخونی، میکروگلیوزیس، تغییرات ایسکمیک سلولی در بافت مغز. حروف غیرمشابه، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه است ( $P < 0/05$ ).

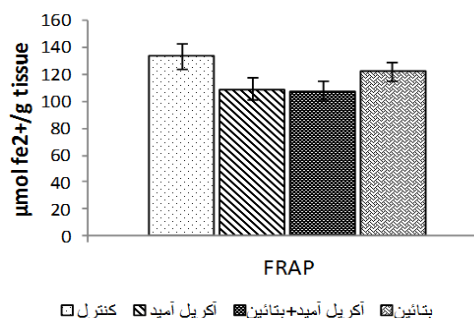
فاکتور بیوشیمیایی ایجاد نکرده است (نمودار شماره 1-ج). کاهش غلظت گلو تاتیون (GSH) در گروه دریافت کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود؛ افزایش غلظت گلو تاتیون (GSH) به دنبال تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید+بتائین) در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود (نمودار شماره 1-د).



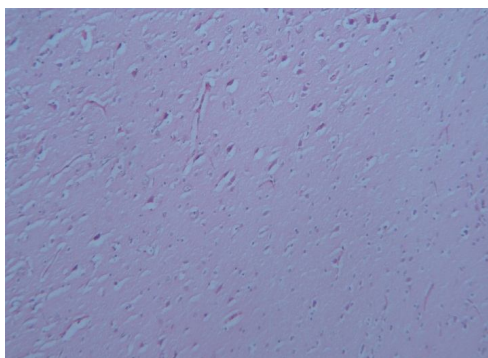
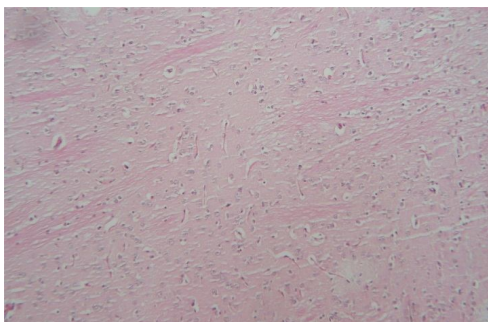
نمودار شماره 1-الف: مقدار GPX، SOD و CAT در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شدند. حروف غیرمشابه، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه است ( $P < 0/05$ ).



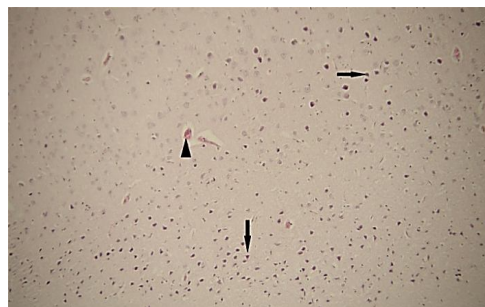
نمودار شماره 1-ب: مقدار MDA و گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شدند. حروف غیرمشابه، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه است ( $P < 0/05$ ).



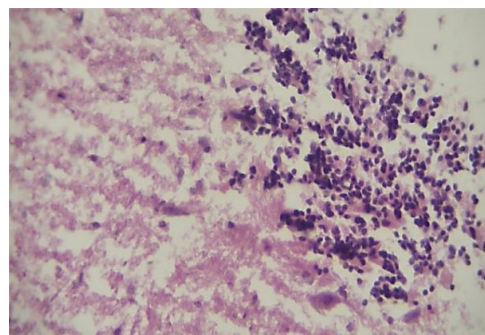
نمودار شماره 1-ج: مقدار FRAP در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شدند. حروف غیرمشابه، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه است ( $P < 0/05$ ).



تصویر شماره 3: بافت مغز، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی 100×  
A- گروه کنترل، B- گروه آکریل آمید، C- گروه بتائین،  
D- گروه آکریل آمید + بتائین  
(پیکان سیاه: تغییر ایسکمیک سلولی. پیکان زرد: پرخونی. نوک  
پیکان: میکروگلیوزیس)



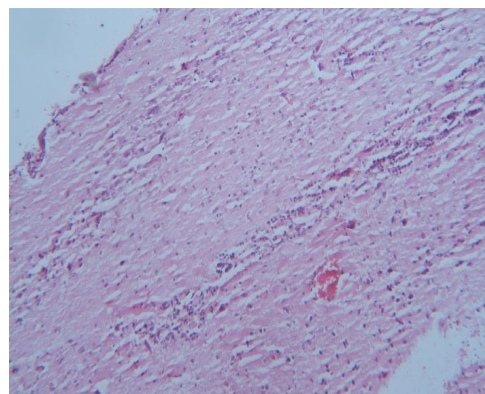
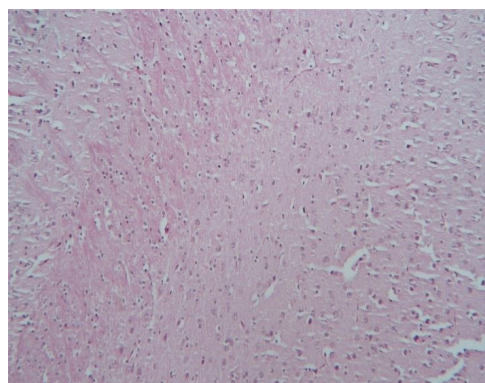
تصویر شماره 1: تغییرات ایسکمیک سلولی و پرخونی در مغز.  
بزرگنمایی 100× رنگ آمیزی H&E.



تصویر شماره 2: میکروگلیوزیس در مغز. بزرگنمایی 400×  
رنگ آمیزی H&E.

## بحث

در این مطالعه تزریق داخل صفاقی آکریل آمید (ACR) به میزان 50 mg/kg در 11 روز متوالی در گروه دوم باعث کاهش معنی دار سطوح SOD و CAT در مقایسه با گروه کنترل شد. هم چنین کاهش سطوح GPX و GSH در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. نتایج مطالعه حاضر از این لحاظ با یافته های Zhu و همکارانش در سال 2008 که به بررسی اثرات آکریل آمید بر سیستم آنتی اکسیدانی بافت عصبی و الکتروفیزیولوژی عصب سیاتیک در موش صحرایی پرداخته اند همخوانی دارد (9). آکریل آمید یک آلاینده غذایی است که در طیف وسیعی از غذاهای پر مصرف وجود دارد که متأسفانه قرار گرفتن انسان در معرض این ماده سمی را اجتناب ناپذیر می کند (2، 38، 39). این ماده سمی می تواند به برخی از بافت های بدن آسیب برساند. سمیت عصبی آکریل آمید





توجه مطالعات گسترده‌ای را در سطح جهانی به خود جلب کرده است. این گزارش‌ها تأیید می‌کنند که قرار گرفتن در معرض ACR می‌تواند منجر به اختلالات عصبی و اختلال شناختی شود. بنابراین یافتن ترکیبات موثر در برابر اثرات زیان بار آکریل آمید می‌تواند با اهمیت باشد (40، 41). در مطالعه حاضر در گروه دریافت‌کننده آکریل آمید کاهش معنی‌دار کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و افزایش معنی‌دار گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها و مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. پرخونی، میکروگلیوزیس و تغییرات ایسکمیک سلولی در بافت مغز موش‌های گروه دریافت‌کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌دار افزایش داشت. به‌دنبال تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید+بتائین) مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید روند افزایشی نشان داد. هم‌چنین تجویز بتائین در گروه سوم (آکریل آمید+بتائین) تغییرات ایسکمیک سلولی را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید به‌طور معنی‌داری کاهش داد، در حالی که کاهش پرخونی و میکروگلیوزیس در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود. MDA به‌طور کلی برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی در ساختارهای بیولوژیکی استفاده می‌شود و به‌عنوان یک نشانگر برای استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (42، 43). براساس نتایج این مطالعه، سطح مالون دی آلدئید در گروه دریافت‌کننده آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که با نتایج مطالعه انجام شده توسط Elhelaly و همکارانش در سال 2019 که به بررسی اثرات محافظتی هسپریدین و دیوسمین در برابر آسیب اکسیداتیو کبد، کلیه و مغز ناشی از آکریل آمید در موش صحرایی بود تا حدودی مطابقت داشت (43). کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل که نشان‌دهنده اثر مخرب آکریل آمید بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام می‌باشد در مطالعه انجام شده توسط Haidari و همکارانش گزارش شد (45) که با نتایج FRAP در

مطالعه حاضر همخوانی ندارد. با مطالعه گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها می‌توان به سطح اکسیداسیون پروتئین پی‌برد. نتایج این مطالعه نشان داد که آکریل آمید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری میزان این شاخص را افزایش داد. این مطالعه نشان داد تجویز بتائین همراه با آکریل آمید باعث افزایش معنی‌دار SOD، در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید شده است، این افزایش به حدی بوده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبوده است؛ هم‌چنین افزایش مقادیر CAT و GSH در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکریل آمید معنی‌دار نبود.

متابولیسم ترکیبات مختلف در بدن سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از جمله آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل (OH) می‌شود که قادر هستند به تمام انواع ماکرومولکول‌ها آسیب برسانند؛ بنابراین وجود دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با اثرات مضر آن‌ها ضروری است. مواد شیمیایی گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند برخی تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از سموم را بهبود بخشند. بتائین به‌دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدان و توانایی‌های اهدای گروه متیل، از خود اثرات محافظتی در برابر سموم مختلف نشان می‌دهد (46).

در مطالعه انجام شده توسط Khodayar و همکارانش در سال 2018 مشخص شد که بتائین می‌تواند سطوح GSH کاهش یافته توسط استامینوفن را بهبود بخشد (47). با این حال، نتایج فعلی نشان داد که سطح GSH به‌طور معنی‌داری توسط بتائین تغییر نکرده است. علاوه بر این، نتایج پژوهش Ozturk و همکارانش در سال 2003 نشان داد که تغییرات آنزیمی ناشی از  $CCl_4$  از جمله کاهش گلوکاتایون پراکسیداز با درمان بتائین در موش‌ها بهبود نیافته است (26). نتایج مطالعه انجام شده توسط Hussain و همکارانش در سال 2023 نیز موثر بودن نقش بتائین در بهبود سطوح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی را تأیید می‌کند (48). طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص شده



است که میزان مالون دی آلدئید (MDA) با دریافت بتائین در گروه سوم (آکریل آمید+بتائین) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش می یابد؛ این کاهش به حدی بوده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. این یافته ها تا حدودی با نتایج مطالعه انجام شده توسط Kanbak و همکارانش در سال 2008 در زمینه بررسی اثرات مصرف مزمن اتانول بر سیناپتوزوم های مغز و نقش محافظتی بتائین، مطابقت دارد (49). طبق نتایج این مطالعه مشخص شده است که بتائین باعث افزایش معنی دار سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید می شود این افزایش به حدی بوده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود؛ این افزایش در مقادیر کاتالاز در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید معنی دار نبود. این نقش بتائین با مطالعه انجام شده توسط Alirezaei و همکارانش در سال 2015 در رابطه با بررسی خواص آنتی اکسیدانی بتائین در برابر استرس اکسیداتیو با واسطه لوودوپا - بنسرازید در مغز موش صحرایی تا حدودی مطابقت دارد (50)؛ طبق نتایج مطالعه کنونی میزان گلو تاتیون پراکسیداز به دنبال تجویز بتائین افزایش معنی دار نداشته است اما در مطالعه انجام شده توسط Alirezaei و همکارانش در سال 2015 بتائین توانسته است که میزان این شاخص را به طور معنی داری افزایش بدهد. ارزیابی نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد که تجویز آکریل آمید توانسته است به طور معنی داری میزان پرخونی، میکرو گلیوزیس و تغییرات ایسکمیک سلولی را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد. کاهش مقادیر پرخونی و میکرو گلیوزیس در گروه سوم (آکریل آمید + بتائین) به دنبال تجویز بتائین در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید معنی دار نبود؛ کاهش در تغییرات ایسکمیک سلولی در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید معنی دار بود. نتایج مربوط به اثرات مخرب آکریل آمید در بافت مغز با نتایج برخی مطالعات انجام شده توسط Khiralla و همکارانش در سال 2020 که به بررسی تاثیر نانو ذرات سلنیوم بر

آسیب مغزی ناشی از آکریل آمید در موش پرداخته بودند، مطالعه Erdemli و همکارانش در سال 2016 که اثرات مصرف آکریل آمید در دوران بارداری بر رشد مغز جنین در موش صحرایی و نقش محافظتی ویتامین E را مورد بررسی قرار دادند و هم چنین نتایج مطالعه Ahrari و همکارانش در سال 2018 که درباره نقش محافظتی عسل بر ضایعات بافتی ناشی از آکریل آمید در مغز و کبد موش صحرایی بود مطابقت دارد (18، 19، 51). از سوی دیگر، نتایج مطالعات Khalili و همکارانش که در سال 2021 انجام شده است و Ozturk و همکارانش که در سال 2003 انجام شده است نشان می دهند که بتائین اثرات پیشگیرانه در برابر آسیب هیستوپاتولوژیک ناشی از درمان با جنتامایسین و هم چنین اثر محافظتی در برابر تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از تراکلرید کرین در بافت کلیه دارد (26، 46). در راستای مقایسه نتایج مطالعه کنونی که نشان داد بتائین تا حدودی نقش محافظتی از مغز در برابر آسیب ناشی از آکریل آمید دارد؛ می توان این نقش محافظتی بتائین بر آسیب بافت مغزی را در برخی مطالعات انجام شده توسط Ataizi و همکارانش در سال 2019 با عنوان نقش محافظتی احتمالی مکمل های بتائین و امگا 3 در آسیب های مغزی، مشاهده نمود (52).

در همین رابطه در مطالعه ای دیگر که توسط Li و همکاران در سال 2022 انجام شد، مشخص شد که بتائین از موش ها در برابر آسیب مغزی ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد محافظت می کند (53). در مطالعه حاضر نقش محافظتی بتائین بر آسیب مغزی ناشی از آکریل آمید مورد ارزیابی قرار گرفت که می تواند نوید بخش شناخت یک عامل محافظتی جدید در برابر آسیب های ناشی از آکریل آمید باشد. با این حال، برخی از محدودیت های مطالعه حاضر، از جمله استفاده از تنها یک دوز بتائین، باید در تفسیر نتایج در نظر گرفته شود. به طور کلی یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تجویز بتائین توانسته است تا حدی تغییرات شاخص های اکسیداتیو و بیوشیمیایی ناشی از آکریل آمید را در بافت مغز کاهش دهد؛ هم چنین

## سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده دامپزشکی به خاطر همکاری در انجام این مطالعه کمال تقدیر و تشکر ابراز می گردد.

می تواند در التیام آسیب بافتی ناشی از آکریل آمید مفید باشد. که این یافته ها ممکن است با پتانسیل آنتی اکسیدانی بتائین مرتبط باشد. با این حال، مطالعات بیش تری برای درک اساس مولکولی عمل بتائین در بهبود آسیب مغزی ناشی از آکریل آمید مورد نیاز است.

## References

1. Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, et al. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44(5): 323-347.
2. Lineback DR, Coughlin JR, Stadler RH. Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012; 3 :15-35.
3. Pedersen M, Vryonidis E, Joensen A, Törnqvist M. Hemoglobin adducts of acrylamide in human blood—What has been done and what is next? *Food Chem Toxicol* 2022; 161: 112799.
4. Rudén C. Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate. *Food Chem Toxicol* 2004; 42 (3): 335-349.
5. LoPachin RM. Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. *Adv Exp Med Biol* 2005; 21-37.
6. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environ Health Perspect* 2012; 120(12): 1650-1657.
7. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, et al. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit Rev Toxicol* 2006; 36(6-7): 481-608.
8. Igisu H, Matsuoka M. Acrylamide encephalopathy. *J Occup Health* 2002; 44(2): 63-68.
9. Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, et al. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res* 2008; 33(11): 2310-2317.
10. Mehri S, Abnous K, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(2): 227-235.
11. Allam AA, El-Ghareeb AW, Abdul-Hamid M, Bakery AE, Gad M, Sabri M. Effect of prenatal and perinatal acrylamide on the biochemical and morphological changes in liver of developing albino rat. *Arch Toxicol* 2010; 84(2): 129-141.
12. Kashani MH, Ramezani M, Piravar Z. The effect of acrylamide on sperm oxidative stress, total antioxidant levels, tyrosine phosphorylation, and carboxymethyl-lysine expression: A laboratory study. *Int J Reprod Biomed* 2021; 19(7): 625-636.
13. Firouzabadi AM, Imani M, Zakizadeh F, Ghaderi N, Zare F, Yadegari M, et al. Evaluating effect of acrylamide and ascorbic acid on oxidative stress and apoptosis in ovarian tissue of wistar rat. *Toxicol Rep* 2022; 9: 1580-1585.
14. Catalgol B, Özhan G, Alpertunga, B. Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28(10): 611-617.

15. Kim K, Bae ON, Koh SH, Kang S, Lim KM, Noh JY, et al. High-dose vitamin C injection to cancer patients may promote thrombosis through procoagulant activation of erythrocytes. *Toxicol Sci* 2015; 147 (2): 350-359.
16. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 2005; 115(12): 3409-3417.
17. Ghorbel I, Chaabane M, Elwej A, Kallel C, Grati Kamoun N, et al. Extra Virgin olive oil mitigates hematotoxicity induced by acrylamide and oxidative damage in adult rats. *Pharm Biomed Res* 2017; 3(1): 34-40 (Persian).
18. Khiralla G, Elhariry H, Selim SM. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles attenuate acrylamide-induced brain injury in rats. *J Food Biochem* 2020; 44(10): e13413.
19. Erdemli M, Turkoz Y, Altinoz E, Elibil E, Dogan Z. Investigation of the effects of acrylamide applied during pregnancy on fetal brain development in rats and protective role of the vitamin E. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35(12): 1337-1344.
20. Kahkeshani N, Saeidnia S, Abdollahi M. Role of antioxidants and phytochemicals on acrylamide mitigation from food and reducing its toxicity. *J Food Sci Technol* 2015; 52(6): 3169-3186.
21. 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: 1070.
22. Craig, SA. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(3): 539-549.
23. Sahebi Ala F, Hassanabadi A, Golian A. Effects of dietary supplemental methionine source and betaine replacement on the growth performance and activity of mitochondrial respiratory chain enzymes in normal and heat-stressed broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2019; 103(1): 87-99.
24. Abdel-Daim MM, Abdellatif SA. Attenuating effects of caffeic acid phenethyl ester and betaine on abamectin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Environ Sci Pollut Res* 2018; 25(16): 15909-15917.
25. Alirezai 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): 239-247.
26. Ozturk, F, Ucar, M, Ozturk, IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology* 2003; 62(2): 353-356.
27. Hagar H, Al Malki W. Betaine supplementation protects against renal injury induced by cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress and caspase-3. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37(2): 803-811.
28. Wen C, Leng Z, Chen Y, Ding L, Wang T, Zhou Y. Betaine alleviates heat stress-induced hepatic and mitochondrial oxidative damage in broilers. *J Poultry Sci* 2021; 58(2): 103-109.
29. Belhadj Benziane A, Dilmi Bouras A, Mezaini A, Belhadri A, Benali M. Effect of oral exposure to acrylamide on biochemical and hematologic parameters in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2019; 42(2): 157-166.
30. Abdel-Daim MM, Abo El-Ela FI, Alshahrani FK, Bin-Jumah M, Al-Zharani M, Almutairi B, et al. Protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced liver, kidney and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res* 2020; 27(30): 37709-37717.
31. Junnila M, Rahko T, Sukura A. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects

- by oral administration of betaine in male Han-Wistar rats: a morphometric histological study. *Vet Pathol* 2000; 37 (3): 231-238.
32. Claiborne A. Catalase activity, In: Greenwald RA, Ed, *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press; 1985. p. 283-284.
  33. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1): 70-77.
  34. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
  35. Baltacıoğlu E, Akalın FA, Alver A, Değer O, Karabulut E. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2008; 53(8): 716-722.
  36. Barangi S, Mehri S, Moosavi Z, Hayesd AW, Reiter RJ, Cardinali DP, et al. Melatonin inhibits Benzo (a) pyrene-Induced apoptosis through activation of the Mir-34a/Sirt1/autophagy pathway in mouse liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020; 196: 110556.
  37. Barrios-Rodríguez YF, Pedreschi F, Rosowski J, Gómez JP, Figari N, Castillo O, et al. Is the dietary acrylamide exposure in Chile a public health problem? *Food Additives & Contaminants: Part A* 2021; 38(7): 1126-1135.
  38. Bušová M, Bencko V, Laktičová KV, Holcátová I, Vargová M. Risk of exposure to acrylamide. *Cent Eur J Public Health* 2020; 28: S43-S46.
  39. Hamdy SM, Bakeer HM, Eskander EF, Sayed ON. Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31(5): 483-491.
  40. Camacho L, Latendresse J, Muskhelishvili L, Patton R, Bowyer JF, Thomas M, et al. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicol Lett* 2012; 211(2): 135-143.
  41. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longevity* 2014; 2014: 360438.
  42. Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: facts and artifacts. *Am J Plant Physiol* 2019; 180(3): 1246-1250.
  43. Elhelaly AE, AlBasher G, Alfarraj S, Almeer R, Bahbah EI, Fouda MMA, et al. Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26(34): 35151-35162.
  44. Khalili N, Ahmadi A, Ghodrati Azadi H, Moosavi Z, Baghshani H, AbedSaeedi MS. Protective effect of betaine against gentamicin-induced renal toxicity in mice: a biochemical and histopathological study. *Comp Clin Pathol* 2021; 30(1): 905-912.
  45. Khodayar MJ, Kalantari H, Khorsandi L, Rashno M, Zeidooni L. Betaine protects mice against acetaminophen hepatotoxicity possibly via mitochondrial complex II and glutathione availability. *Biomed Pharmacother* 2018; 103: 1436-1445.
  46. Hussain Z, Iqbal Z, Roohi N, Khan S. Effect of betaine supplementation on production performance and serum antioxidant indices of Nili-Ravi buffaloes during summer. *Trop Anim Health Prod* 2023; 55(3): 176.
  47. Kanbak G, Arslan OC, Dokumacioglu A, Kartkaya K, Inal ME. Effects of chronic ethanol consumption on brain synaptosomes and protective role of betaine. *Neurochem Res* 2008; 33(3): 539-544.

48. Kanbak G, Arslan OC, Dokumacioglu A, Kartkaya K, Inal ME. Effects of chronic ethanol consumption on brain synaptosomes and protective role of betaine. *Neurochem Res* 2008; 33(3): 539-544.
49. Ahrari Roodi P, Moosavi Z, Afkhami Goli A, Azizzadeh M, Hosseinzadeh H. Histopathological study of protective effects of honey on subacute toxicity of acrylamide-induced tissue lesions in rats' brain and liver. *Iran J Toxicol* 2018; 12(3): 1-8 (Persian).
50. Ataizi S, Ozkoc M, Kanbak G, Karimkhani H, Donmez DB, Ustunisik N, et al. A possible protective role of betain and omega-3 supplementation in traumatic brain injury. *Ann Ital Chir* 2019; 90: 174-181.
51. Li Q, Qu M, Wang N, Wang L, Fan G, Yang C. Betaine protects rats against ischemia/reperfusion injury-induced brain damage. *J Neurophysiol* 2022; 127(2): 444-451.