"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2020.670353.1165**

Effect of Beta asarone on concentration of TNF-α in a rat model of Alzheimer's disease

Saki, G.[1,2], Eidi, A.[3*], Mortazavi, P.[4], Vahdati, A.[5,6], Panahi, N.[7]

1- PhD. Graduate, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
2- PhD. Graduate, Department of Biology, Faculty of Science, Agriculture and New Technologies, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5- Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
6- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Agriculture and New Technologies, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
7- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[*]Corresponding author's email: eidi@srbiau.ac.ir
(Received: 2020/5/7 Accepted: 2020/10/22)

Abstract

Beta asarone which is the major component of *Acorus tatarinowii* Schott, can pass through the blood-brain-barrier and affect the central nervous system. In the present study, effect of beta asarone on TNF-α level was investigated in β-amyloid-induced alzheimeric male rats. The adult male rats were randomly divided into 9 groups of 6: normal control, sham-operated control, β-asarone (12.5, 25 and 50 mg/kg PO, daily for 50 days), alzheimeric control (bilateral intrahippocampal injection of 4 µl of β-amyloid 1-42) and alzheimeric β-asarone receiving (12.5, 25 and 50 mg/kg PO β-asarone daily for 30 days following β-amyloid injection and subsequent doses of beta asarone for 3 weeks). The rats were sacrificed at the end of the experiment and the TNF-α level was measured in brain homogenate. Our results showed that administration of β-asarone (25 and 50 mg/kg) significantly decreased the TNF-α level (p<0.001) in alzheimeric rats. Thus, these results indicate that β-asarone is effective in providing protection against inflammation induced by β-amyloid.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Alzheimer, β-amyloid, β-asarone, Rat, Tumor Necrosis Factor-alpha.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2020.670353

بررسی اثر بتاآسارون بر غلظت فاکتور نکروز توموری- آلفا در مدل موش صحرایی آلزایمری‌شده

گلشید ساکی[۱و۲]، اکرم عیدی[۳*]، پژمان مرتضوی[٤]، اکبر وحدتی[۵و٦]، نگار پناهی[۷]

۱-دانش‌آموخته دکترای تخصصی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران.
۲-دانش‌آموخته دکترای تخصصی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فن‌آوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
۳-استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
٤-دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۵-استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران.
٦-استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فن‌آوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
۷-استادیار گروه علوم پایه، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: eidi@srbiau.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۹/۲/۱۸ پذیرش نهایی: ۹۹/۸/۱)

چکیده

بتاآسارون ماده موثره گیاه *Acorus tatarinowii* Schott می‌باشد که قادر به عبور از سد خونی مغز بوده و بر سیستم اعصاب مرکزی تاثیر می‌گذارد. در تحقیق حاضر اثر بتاآسارون بر غلظت فاکتور نکروز توموری- آلفا (TNF-α) به‌دنبال دریافت بتاآمیلویید در مغز موش‌های صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های صحرایی نر بالغ به‌صورت تصادفی به ۹ گروه ٦ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل سالم، گروه شاهد جراحی، گروه‌های دریافت‌کننده بتاآسارون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی به مدت ۵۰ روز)، گروه کنترل آلزایمری (دریافت‌کننده یک دوز ٤ میکرولیتری بتاآمیلویید ٤۲-۱ به‌صورت تزریق دوطرفه در هیپوکامپ) و گروه‌های آلزایمری‌شده و دریافت‌کننده بتاآسارون (تیمار دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بتا-آسارون به‌صورت خوراکی به مدت ۳۰ روز و بعد از دریافت بتاآمیلویید، ادامه تیمار با بتاآسارون به مدت ۳ هفته). در پایان آزمایش حیوانات کشته شدند و غلظت TNF-α در هموژنات مغز اندازه‌گیری گردید. تیمار بتاآسارون در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب کاهش غلظت TNF-α در موش‌های صحرایی آلزایمری‌شده گردید($p<۰/۰۰۱$). با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بتاآسارون در محافظت در برابر التهاب حاصل از دریافت بتاآمیلویید در بافت مغز موش صحرایی نقش موثری ایفا می‌کند.

کلیدواژه‌ها: بتاآسارون، بتاآمیلویید، فاکتور نکروز توموری- آلفا، موش صحرایی، آلزایمر.

مقدمه

بیماری آلزایمر که شایع‌ترین نوع دمانس یا زوال عقل می‌باشد، یک اختلال نورودژنراتیو است و با علائمی مانند تجمع رسوب‌های پروتئینی در مغز به‌صورت پلاک‌های آمیلوییدی و توده‌های نوروفیبریلی، آسیب اکسیداتیو و التهاب در هیپوکامپ و کورتکس مغز همراه است (Imbimbo *et al*., 2005; Bertram *et al*., 2010). یافته‌های محققان بیانگر وجود یک اپیدمی جهانی در ابتلا به اختلال آلزایمر و دیگر بیماری‌های آمیلوییدی است (Maltseva *et al*., 2011; Thies and Bleiler, 2012). علی‌رغم مطالعات بسیار در زمینه درمان بیماری آلزایمر تنها ۵ نوع داروی مورد قبول دراین خصوص در دسترس می‌باشد و بنابراین همواره به رویکرد نوینی نسبت به درمان‌های جایگزین در درمان این بیماری نیاز می‌باشد (Qaseem *et al*., 2008). در سال‌های اخیر استفاده از محصولات طبیعی و گیاهی رواج و محبوبیت یافته‌اند و چندین نمونه از آن‌ها که دارای اثرات محافظت‌کنندگی نورونی بوده‌اند مورد مطالعات بسیاری قرار گرفته‌اند. اغلب این ترکیبات دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هستند و موجب تجزیه رادیکال‌های آزاد می‌شوند. گروهی دیگر از آن‌ها موجب افزایش بقا و بهبود شرایط سلول از طریق اثر بر مسیرهای تولید آمیلویید و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شوند (Ansari and Khodagholi, 2013).

بتاآسارون که دارای فرمول شیمیایی سیس–۲، ٤ و ۵–تری‌متوکسی ۱–آلیل‌فنیل می‌باشد، مهم‌ترین ماده موجود در گیاه *آکروس تاتارینوی‌اسکات* (*Acorus tatarinowii* Schott) است و با قابلیت عبور از سد خونی مغز می‌تواند بر سیستم اعصاب مرکزی تاثیر بگذارد (Cho *et al*., 2002; Fang and Wei, 2002; Fang *et al*., 2003; Chen *et al*., 2007; Fang *et al*., 2008). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بتاآسارون دارای اثرات ضدآپوپتوزی (Geng *et al*., 2010; Li *et al*., 2010; Zou *et al*., 2011; Wei *et al*., 2013)، نوروتروپیک، محافظت از نورون‌ها و نیز حفاظت از سیستم قلبی- عروقی می‌باشد (Cho *et al*., 2002; Yi-zhi *et al*., 2004; Chun *et al*., 2008; Qiduan *et al*., 2008; Geng *et al*., 2010; Li *et al*., 2010; Liu *et al*., 2010; Zou *et al*., 2011). علاوه بر آن، بتاآسارون در درمان ایسکمی مغز، صرع و نیز بهبود اختلال آلزایمر در تعدادی از مدل‌های تجربی دارای تاثیر مثبت بوده است (Fu *et al*., 2008; Geng *et al*., 2010; Li *et al*., 2010; Liu *et al*., 2010; Li *et al*., 2012; Wei *et al*., 2013; Yang *et al*., 2013).

تحقیقات انجام شده در مورد بررسی تاثیر بتا-آسارون در پیش‌گیری و درمان بیماری آلزایمر اغلب در مورد مکانیسم‌های دخیل در کاهش روند و تضعیف آپوپتوزیس نورونی و نیز اثرات مثبت این ماده بر سیستم مغزی–عروقی می‌باشد (Zou *et al*., 2011; Wei *et al*., 2013; Yang *et al*., 2013) و تاکنون گزارش مستندی در مورد اثرات بتاآسارون در بهبود التهاب در مغز موش‌های صحرایی آلزایمری‌شده توسط بتاآمیلوییـد ۱–٤۲ ارائه نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر تاثیر تیمار خوراکی بتاآسارون در جلوگیری از التهاب از طریق بررسی غلظت فاکتور التهابی نکروز توموری–آلفا در مغز موش‌های صحرایی آلزایمری‌شده توسط بتا-آمیلوییـد ۱–٤۲ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در پاییز سال ۱۳۹۵ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران و با رعایت قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران) انجام گردید. حیوانات مورد استفاده در این پژوهش شامل ٥٤ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰–۲۵۰ گرم بود که از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) تهیه شده بودند. در طول مدت آزمایش، حیوانات در حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری می‌شدند.

حیوانات مورد استفاده در این بررسی به‌صورت تصادفی به ۹ گروه که هریک شامل ٦ سر حیوان بودند به این شرح تقسیم شدند: گروه کنترل سالم: شامل موش‌های صحرایی سالم بود که جراحی نشدند و غذای معمول خود را دریافت نمودند. گروه شاهد: حیوانات این گروه جراحی شدند و حلال بتاآمیلوییید را دریافت کردند. گروه تجربی سالم: حیوانات این گروه به مدت ۵۰ روز تحت تیمار سه دوز بتاآسارون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت خوراکی قرار گرفتند. گروه کنترل آلزایمر: حیوانات این گروه جراحی شدند و بتاآمیلوییید دریافت کردند. گروه تجربی آلزایمری: حیوانات این گروه به مدت ۳۰ روز تحت تیمار سه دوز بتاآسارون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت خوراکی قرار گرفتند و سپس آلزایمری شدند. توضیح این‌که تیمار موش‌های این گروه، به مدت سه هفته با بتاآسارون ادامه داشت.

بتاآسارون مورد استفاده در این پژوهش (شرکت سیگما، آمریکا) در روغن ذرت حل می‌گردید و تیمار حیوانات در دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بتاآسارون (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر روغن ذرت) به‌طور روزانه و توسط ست مخصوص گاواژ صورت می‌گرفت. جهت آماده‌سازی بتاآمیلوییید (شرکت سیگما، آمریکا) دمای آن از ۲۰– درجه سلسیوس به دمای محیط رسانده شده و در دی‌متیل‌سولفوکساید (dimethyl sulfoxide; DMSO) (شرکت سیگما، آمریکا) تا غلظت ۵ میلی‌مولار حل می‌گردید، سپس محلول فوق توسط بافر فسفات (phosphate buffered saline; PBS) (شرکت سیگما، آمریکا) استریل تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار رقیق شده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری می‌گردید. در نهایت بتاآمیلوییید آماده شده تا زمان تزریق در فریزر ۷۰– درجه سلسیوس نگه‌داری می‌شد. محلول کنترل (دی‌متیل‌سولفوکساید در بافر فسفات)، (شرکت سیگما، آمریکا) نیز مانند مراحل ذکر شده در مورد بتاآمیلوییید تهیه می‌گردید (Jean *et al.*, 2015).

القای آلزایمر با استفاده از تزریق بتاآمیلوییید ٤٢-١ و تکنیک جراحی استریوتاکسی انجام پذیرفت. به این منظور در ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق درون‌صفاقی کتامین–زایلازین (۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن)، (شرکت داروسازی آلفاسان، هلند) بیهوش شدند. سپس حیوانات در دستگاه استریوتاکسی (مدل کلاسیک استریوتاکسی موش صحرایی، ساخت کمپانی

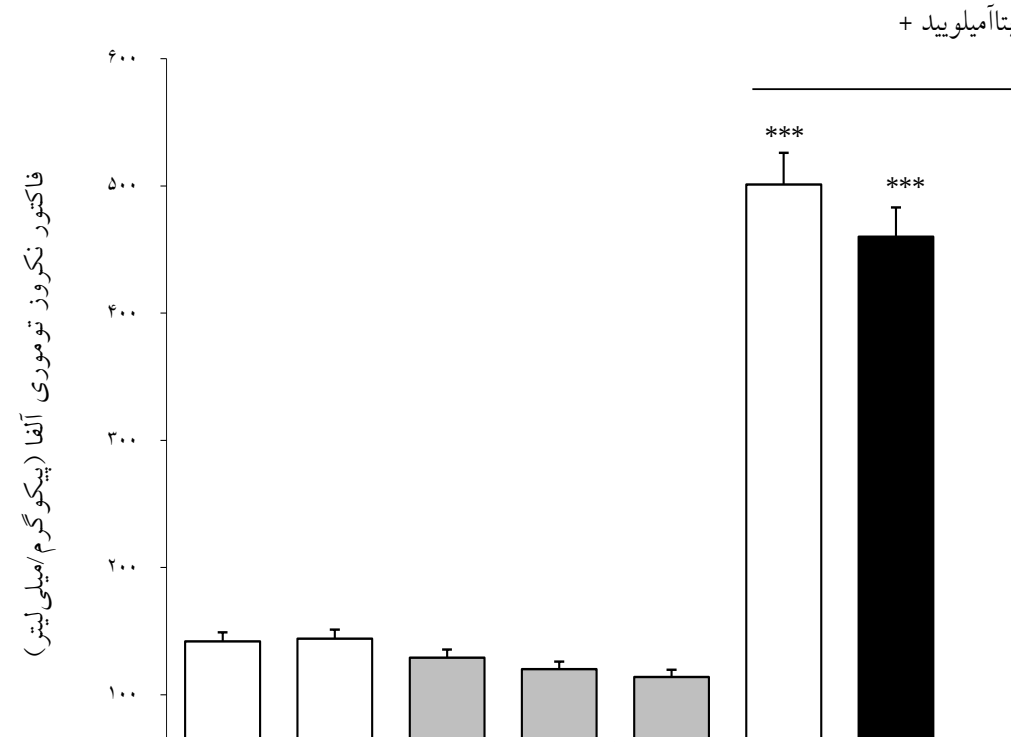
استوالتینگ، آمریکا) ثابت شدند و با برش ناحیه سر، نواحی برگما (bregma) و لامبدا (lambda) پدیدار گردیدند. جهت تعیین جایگاه تزریق بتاآمیلوییـد ۴۲-۱ یعنی ناحیه CA1 هیپوکامپ از اطلس پاکسینوس (Paxinos and Watson, 1998) استفاده شد. تزریق بتا-آمیلویید با استفاده از سرنگ همیلتون در مختصات قدامی– خلفی: ۳ میلی‌متر، میانی– جانبی: ۲/۲ میلی‌متر و فوقانی– شکمی: ۲/۸ میلی‌متر به میزان ٤ میکرولیتر به‌صورت دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ و با سرعت ۰/۲ میکرولیتر در دقیقه انجام پذیرفت (Liu *et al.*, 2010). در پایان دوره آزمایش حیوانات با استفاده از تزریق درون‌صفاقی کتامین- زایلازین (شرکت داروسازی آلفاسان، هلند)، (۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. جهت انجام پرفیوژن مورد نظر هم ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات (pH=۷/٤) و به‌دنبال آن از محلول پارافرمالدئید ٤ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/٤) به آئورت بالارونده تزریق گردید. سپس سر حیوانات توسط گیوتین قطع شد و نمونه‌های مغز جدا گردیدند و در بافر فسفات در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. جهت اندازه‌گیری غلظت TNF-α نمونه‌های مغز در محلول کلرید پتاسیم ۱۵ درصد مولار در دمای ٤- درجه سلسیوس هموژن شدند. سپس این نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ٤ درجه سلسیوس و با دور ۹۰۰۰ در ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در این مرحله محلول رویی شیری‌رنگ داخل لوله فالکون با کمک سمپلر جمع‌آوری گردیده و به ظروف اپندورف انتقال یافت. سنجش میزان TNF-α توسط کیت الایزای TNF-α موش صحرایی (کمپانی دیاکلون، فرانسه) و دستگاه الایزاریدر (کلاریواستار، بی‌ام‌جی- لب‌تک، آلمان) انجام شد (Pettigrew *et al.*, 2008). بدین منظور بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت مذکور، پلات‌های حاوی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد TNF-α به مدت ۳ ساعت در دمای محیط گرمخانه‌گذاری شدند. سپس پلات‌ها توسط بافر ۵ بار شستشو شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری به همراه محلول استرپتاویدین HPR (Streptavidin Horseradish Peroxidase) در دمای محیط، مجددا شستشو داده شدند. سپس محلول سوبسترای تترامتیل‌بنزیدین اضافه گردید و نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط گرمخانه‌گذاری شدند. در آخرین مرحله با اضافه نمودن NH_2SO_4 کلیه واکنش‌ها پایان پذیرفت. در نهایت هم میزان جذب در طول موج ٤۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و میزان TNF-α به‌صورت پیکوگرم/میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

- **تحلیل آماری داده ها:** جهت تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک‌عاملی (ANOVA) و آزمون توکی (Tukey's Test) استفاده گردید. همچنین تمام اطلاعات به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار (mean±SEM) بیان شدند و در کلیه محاسبات $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار منظور گردید.

یافته‌ها

اثر تیمار خوراکی بتاآسارون بر میزان TNF-α در موش‌های صحرایی سالم و آلزایمری‌شده در نمودار ۱ نشان داده شده است. مطابق نتایج ثبت شده در این

نمودار، مشاهده می‌شود که در میـزان TNF-α اخـتلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه کنترل سالم مشـاهده نشد. علاوه بر آن، میـزان TNF-α در حیوانـات تجربـی سـالم کـه تحـت تیمـار بـا دوزهـای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن با بتاآسارون قرار گرفتنـد، نسبت به میزان آن در گروه کنترل سالم تغییر معنی‌داری نداشت، امـا میـزان TNF-α در حیوانـات گـروه کنتـرل آلزایمری نسبت به حیوانات گروه کنترل سـالم افـزایش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین میـزان TNF-α در گروه‌های آلزایمری‌شده و تحت تیمار بـا دوزهـای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بـدن بـا بتـاآسـارون، نسبت به میزان آن در حیوانات گـروه کنتـرل آلزایمـری کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۰۱$) و این درحـالی است که میزان این مـاده در حیوانـات آلزایمـری‌شـده و دریافت‌کننده دوز ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلـوگرم وزن بـدن از بتاآسارون، نسـبت بـه میـزان آن در حیوانـات گـروه کنترل آلزایمری اختلاف معنی‌داری نداشت.



نمودار ۱- اثر تیمار خوراکی بتاآسارون در دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر میزان فاکتور نکروز توموری- آلفا.
نتایج به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار نشان داده شده‌اند.
* و *** اختلاف با گروه سالم را نشان می‌دهند ($p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۰۱$).
+++ اختلاف با گروه کنترل آلزایمری را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۰۱$).

بحث و نتیجه‌گیری

عقیده براینست که TNF-α و IL-1β مهم‌ترین سیتوکین‌های پیش‌التهابی دخیل در تغییرات رفتاری هستند (Alvarez *et al*., 2007).آزمایش‌ها و شواهد کلینیکی نیز نشان‌دهنده افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α، IL-1β، IL-6، IL-18 و اینترفرون گاما (Interferon Gamma; IFN-γ) و نیز افزایش فعالیت گیرنده‌های آن‌ها در مغز مبتلایان به اختلال آلزایمری می‌باشند (Ojala *et al*., 2009). در این ارتباط گزارش کرده‌اند که رسوب مزمن بتاآمیلویید باعث ایجاد التهاب نورونی مغز از طریق فعال‌کردن میکروگلیا می‌شود که این امر به عنوان منبع مهم سیتوکین‌های پیش‌التهابی در اختلال آلزایمر در نظر گرفته می‌شود. همچنین اتصال بتاآمیلویید به سطح سلول‌های میکروگلیایی موجب القای فعال‌سازی بیان ژن‌های پیش‌التهابی و در نهایت منجر به افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α می‌شود که این امر منجر به هایپرفسفوریلاسیون و از بین رفتن نورون‌ها می‌شود. علاوه بر آن، مطالعات نشان داده‌اند که در اختلالات آلزایمری، میزان ژن‌های مرتبط با تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α و IL-1β در پاسخ به پروتئین تائو (Tau، یک نوع فیلامنت حدواسط) افزایش یافته‌است (Klein *et al*., 2010; Wang *et al*., 2010). در توافق با نتایج حاضر مطالعات الوارز و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ نشان داده که میزان TNF-α در مبتلایان به اختلال آلزایمر دچار افزایش می‌شود که آن‌هم باعث آغاز و تداوم پاسخ‌های التهابی می‌گردد (Alvarez *et al*., 2007). در بررسی حاضر مطابق نتایج ثبت شده در بخش یافته‌ها مشخص گردید که تجویز دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ماده بتاآسارون، موجب کاهش معنی‌دار سطح سیتوکین پیش‌التهابی TNF-α نسبت به گروه آلزایمری‌شده، گردید. بر این اساس نتایج این پژوهش با تحقیقات یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ در این زمینه مطابقت دارد. به‌طوری‌که نامبردگان با مطالعه بر روی آستروسیت‌ها نشان دادند که بتاآسارون از طریق مهار ترشح TNF-α و اینترلوکین۱-بتا (Interleukin 1-β; IL-1β) و نیز مهار بیان آکواپورین٤ (aquaporin 4; AQP4) باعث حفاظت از آستروسیت‌ها و در نتیجه بهبود علائم بیماری آلزایمر در موش صحرایی آلزایمری‌شده، می‌گردد (Yang *et al*., 2017).

از طرف دیگر مطالعات روند آپوپتوزیس در سطح سلولی، نشان داده‌اند که بتاآسارون موجب مهار مسیر انتقال سیگنال پروتئین کیناز و کاهش ASK1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1) و PMKK7 (Phosphorylated Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 7) می‌شود. مپ‌کینازها (Mitogen Activated Protein Kinase; MAPK) مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های سیتوکین‌های پیش‌التهابی در هنگام التهاب هستند و در آغاز و تداوم واکنش‌های التهابی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Kang *et al*., 2012; Han *et al*., 2013). فعال‌سازی مپ‌کینازها مانند P38، ERK1/2 و KNK موجب تنظیم بیان ژن‌های دخیل در ایجاد التهاب مانند TNF-α، IL-1β، iNOS (inducible nitric oxide synthase) و COX-2 (cyclooxygenase-2) می‌شود (Han *et al*., 2013).

همچنین فعال‌شدن فاکتور نسخه‌برداری دخیل در ایجاد التهاب (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B Cells; NF-KB) موجب فعال‌سازی ژن‌های iNOS و COX-2 می‌شود (Alderton *et al*., 2001). در این ارتباط لیم و همکارانش با بررسی سلول‌های میکروگلیایی در محیط کشت سلولی در سال ۲۰۱٤، نشان دادند که بتاآسارون موجب سرکوب فعالیت میکروگلیا از طریق مهار سیتوکین‌های التهابی توسط انتقال سیگنال NF-KB در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (Lim *et al*., 2014). NF-KB یک فاکتور نسخه‌برداری مهم در فعال‌سازی میانجی‌های التهابی می‌باشد (Olajide *et al*., 2013). مهار فعالیت NF-KB و یا سرکوب ژن آن در میکروگلیا موجب مهار فعالیت آبشاری عوامل التهابی می‌شود (Jayasooriya *et al*., 2011). به‌نظر می‌رسد بتاآسارون علاوه بر مهار ژن NF-KB می‌تواند موجب مهار ژن‌های بکلین (Beclin) نیز شود. مطالعه چنگ و تنگ نیز در سال ۲۰۱۵ نشان داد که بتاآسارون به‌طور موثری موجب مهار تولید IL-1β و IL-6 و نیز TNF-α در سلول‌های نوروبلاستومای انسان (SHSY5Y) در اثر دریافت بتاآمیلویید گردید که این امر نشان می‌دهد بتاآسارون می‌تواند در به تاخیر انداختن التهاب موثر واقع شود. نامبردگان نشان دادند که بتاآسارون می‌تواند موجب مهار بیان ژن‌های Beclin-1 و LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta) و محافظت از نورون‌ها در برابر بتاآمیلویید شود و این عملکرد با اتوفاژی مهاری آن در ارتباط می‌باشد. این درحالی است که این ماده می‌تواند موجب افزایش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 شود (Chang and Teng, 2015). Bcl-2 می‌تواند از طریق اتصال به Beclin-1 موجب تنظیم اتوفاژی شود و بنابراین باعث مهار ارتباط بین Beclin-1 و PIK3c3 (Phosphatidylinositol 3 Kinase Catalytic Subunit Type 3; hvps34) گردیده و منجر به اتوفاژی و پاسخ‌های التهابی می‌شود (Zhaorigetu *et al*., 2011). Beclin-1 در اتوفاژی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند و به‌طور غیرمستقیم دارای نقش مهمی در بسیاری از روندهای زیستی سلول مانند افزایش سن و مرگ سلول می‌باشد (Huang *et al*., 2015). اما مکانیسم دیگر در این خصوص، می‌تواند مربوط به نقش احتمالی بتاآسارون در غیرفعال‌سازی گیرنده‌های مربوط به محصولات نهایی حاصل از گلیکاسیون پیشرفته (Receptor for Advanced Glycation End Products; RAGE) باشد. گیرنده‌های RAGE در سطح سلول‌های نورونی، میکروگلیاها و سلول‌های عروقی با بتاآمیلویید در ارتباط هستند و در واقع سلول‌های مهم هدف بتاآمیلویید جهت ایجاد اختلال آلزایمر می‌باشند (Chen *et al*., 2007; Yan *et al*., 2012). گیرنده‌های RAGE در میکروگلیاها در ناحیه‌ای از مغز که دچار اختلال آلزایمر شده است، دارای فعالیت مازاد می‌باشند. در ارتباط با این امر، لو و همکارانش در سال ۲۰۰۱ از

طریق بررسی‌های ایمنوشیمیایی دریافتند که نواحی هیپوکامپ، پاراهیپوکامپ و نواحی قدامی مغز مبتلایان به اختلال آلزایمر در مقایسه با گروه کنترل دچار افزایش میزان میکروگلیای حاوی RAGE فعال شدند (Lue *et al*., 2001) که این افزایش با مراحل پاتولوژیک و نیز تعداد پلاک‌ها در اختلال آلزایمر در ارتباط می‌باشد (Fang *et al*., 2010). علاوه بر آن، بسیاری از میانجی‌های التهابی که در مغز مبتلایان به اختلال آلزایمر مورد شناسایی قرار گرفته‌اند در ناحیه میکروگلیایی یافت شده‌اند و گیرنده‌های RAGE موجب آغاز روند تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی در میکروگلیا شده‌اند (Fan *et al*., 2007). یانگ و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ نشان دادند، تیمار با بتا-آسارون به مدت ۲/۵ ماه موجب گردید که تعداد پلاک‌های بتاآمیلوییدی و نیز بتاآمیلوییید ۴۲-۱ در هیپوکامپ و کورتکس موش‌های ترنس‌ژنیک Amyloid Precursor) APP/PS1 Protein/Presenilin1، موش‌های دچار موتاسیون در ژن‌های پروتئین پیش‌ساز آمیلویید و پرسنیلین۱) کاهش یابند. بر اساس مشاهدات آن‌ها، تعداد گیرنده‌های RAGE به میزان قابل توجهی در هیپوکامپ و کورتکس مغز موش‌های APP/PS1 در مقایسه با موش‌های غیر ترنس‌ژنیک افزایش یافت، لذا اعلام نمودند که این افزایش بیانگر نقش احتمالی بتاآسارون در غیرفعال‌سازی گیرنده‌های RAGE در هیپوکامپ و کورتکس موش‌های ترنس‌ژنیک APP/PS1 می‌باشد (Yang *et al*., 2016).

گلوکوکورتیکوییدها از عوامل ایجادکننده التهاب و آپوپتوزیس در بسیاری از سلول‌ها و بافت‌ها هستند و منجر به اختلالات شناختی و ناهنجاری‌های نورواندوکرینی می‌شوند و در واقع یکی از عوامل خطر در پاتولوژی بیماری آلزایمر به شمار می‌آیند. قرارگیری در معرض گلوکوکورتیکوییدها از طریق استفاده از کورتیکوسترون (corticosterone) و یا آگونیست‌های گلوکوکورتیکوییدی دارای تاثیر مهاری بر عملکردهای شناختی و حافظه انسان و پستانداران می‌باشد. مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهند اثرات گلوکوکورتیکوییدها بر حافظه به فعالیت نورآدرنرژیک آمیگدال و برهم خوردن فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال هیپوکامپ وابسته می‌باشند (Roozendaal *et al*., 2004; Dobarro *et al*., 2013). همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که فعال‌شدن فاکتور نوروتروفیک مغزی (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF) در هیپوکامپ و پروتئین‌های اتصالی مربوط به پاسخ‌های CAMP (CAMP Response Elements Binding Proteins; CREB) می‌توانند در درمان اختلالات حافظه موثر واقع شوند (Vaynman *et al*., 2008; Willians *et al*., 2008). در این خصوص، لی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که تیمار موش‌های صحرایی با بتا-آسارون موجب تعدیل پاسخ‌های کورتیکوسترون، تنظیم عملکردهای BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) و CREB (CAMP Response Element Binding Protein) و نیز عملکرد ضدآپوپتوزی گردید (Lee *et al*., 2015). مسیر CREB-BDNF در ایجاد

حافظه بلندمدت بسیار مهم می‌باشد (Saura and Valero, 2011) و اختلالات حافظه حاصل از کورتیکوسترون منجر به کاهش شدید میزان BDNF و CREB در هیپوکامپ و نیز عملکرد ضعیف در آزمایش‌های مربوط به یادگیری و حافظه می‌شود (Lee *et al*., 2014).

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب بتاآسارون، از طریق کاهش غلظت TNF-α موجب بهبود التهاب در مغز موش صحرایی می‌شود. هرچند که بررسی تاثیر این ماده بر دیگر فاکتورهای التهابی مغز و نیز تعمیم این نتایج به انسان به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند در این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

- Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochemical Journal, 357(3): 593-615.
- Alvarez, A., Cacabelos, R., Sanpedro, C., Garcia-Fantini, M. and Aleix-andre, M. (2007). Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. Neurobiology of Aging, 28(4): 533-536.
- Ansari, N. and Khodagholi, F. (2013). Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect. Current Neuropharmacology, 11(4): 414-429.
- Bertram, L., Lill, C.M. and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. Neuron, 68(2): 270-281.
- Chang, W. and Teng, J. (2015). β-asarone prevents Aβ25-35-induced inflammatory responses and autophagy in SH-SY5Y cells: down expression Beclin-1, LC3B and up expression Bcl-2. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(11): 20658-20663.
- Chen, X., Walker, D.G., Schmidt, A.M., Arancio, O., Lue, L.F. and Yan, S.D. (2007). RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. Current Molecular Medicine, 7(8): 735-742.
- Chen, Y.Z., Wang, Q.W., Liang, Y. and Fang, Y.Q. (2007). Protective effects of beta-asarone on cultured rat cortical neurons damage induced by glutamate. Zhong Yao Cai, 30(4): 436-438.
- Cho, J., Kim, Y.H., Kong, J.Y., Yang, C.H. and Park, C.G. (2002). Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of Acorus gramineus. Life Sciences, 71(5): 591-599.
- Chun, H.S., Kim, J.M., Choi, E.H. and Chang, N. (2008). Neuroprotective effects of several Korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. Journal of Medical Food, 11(2): 246-251.
- Dobarro, M., Orejana, L., Aguirre, N. and Ramírez, M.J. (2013). Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration. International Journal of Neuropsychopharmacology, 16(6): 1351-1360.

- Fan, R., Xu, F., Previti, M.L., Davis, J., Grande, A.M., Robinson, J.K., et al. (2007). Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. Journal of Neuroscience, 27(12): 3057-3063.
- Fang, F., Lue, L.F., Yan, S., Xu, H., Luddy, J.S., Chen, D., et al. (2010). RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. The FASEB Journal, 24(4): 1043-1055.
- Fang, Y.Q., Fang, R.M., Fang, G.L., Jiang, Y. and Fu, S.Y. (2008). Effects of beta-asarone on expression of c-fos in kindling epilepsy rat brain. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 33(5): 534-536.
- Fang, Y.Q., Li, L. and Wu, Q.D. (2003). Effects of beta-asarone on gene expression in mouse brain. Zhong Yao Cai, 26(9): 650-652.
- Fang, Y.Q. and Wei, G. (2002). To analyze if the Rhizoma Acori Tatarimowii naph-tha can go through the BBB or not with GC-MS. Zhong Yao Xin Yao Yu: Ling Chuang Yao Li, 13(3): 181-182.
- Fu, S.Y., Fang, R.M., Fang, G.L., Xie, Y.H. and Fang, Y.Q. (2008). Effects of beta-asarone on expression of FOS and GAD65 in cortex of epileptic rat induced by penicillin. Zhong Yao Cai, 31(1): 79-81.
- Geng, Y., Li, C., Liu, J., Xing, G., Zhou, L., Dong, M., et al. (2010). Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33(5): 836-843.
- Han, L., Yin, K., Zhang, S., Wu, Z., Wang, C., Zhang, Q., et al. (2013). Dalesconols B inhibits lipopolysaccharide induced inflammation and suppresses NF-kappaB and p38/JNK activation in microglial cells. Neurochemistry International, 62(7): 913-921.
- Huang, L., Deng, M., He, Y. and Fang, Y. (2015). β-asarone and levodopa coadministration protects against 6-OHDA-induced damage in parkinsonian rat mesencephalon by regulting autophagy: down expression Beclin-1 and LC3B and up expression p62. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 42(3): 269-277.
- Imbimbo, B.P., Lombard, J. and Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer's disease. Neuroimaging Clinics of North America, 15(4): 727-753.
- Jayasooriya, R.G., Kang, C.H., Seo, M.J., Choi, Y.H., Jeong, Y.K. and Kim, G.Y. (2011). Exopolysaccharide of Laetiporus sulphureus var. miniatus down regulates LPS-induced production of NO, PGE(2), and TNF-alpha in BV2 microglia cells via suppression of the NF-kappaB pathway. Food and Chemical Toxicology, 49(11): 2758-2764.
- Jean, Y.Y., Baleriola, J., Fà, M., Hengst, U. and Troy, C.M. (2015). Stereotaxic infusion of oligomeric Amyloid-beta into the mouse hippocampus. Journal of Visualized Experiments, 100(6): e52805.
- Kang, C.H., Jayasooriya, R.G., Dilshara, M.G., Choi, Y.H., Jeong, Y.K., Kim, N.D., et al. (2012). Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-kappaB activation and ERK phosphorylation. Food and Chemical Toxicology, 50(12): 4270-4276.
- Klein, R.L., Dayton, R.D., Diaczynsky, C.G. and Wang, D.B. (2010). Pronounced micro gliosis and neurodegeneration in aged rats after tau gene transfer. Neurobiology of Aging, 31(12): 2091-2102.
- Lee, B., Sur, B., Cho, S.G., Yeom, M., Shim, I., Lee, H., et al. (2015). Effect of Beta-Asarone on impairment of spatial working memory and apoptosis in the hippocampus of rats exposed to chronic corticosterone administration. Biomolecules and Therapeutics (Seoul), 23(6): 571-581.
- Lee, B., Sur, B., Shim, I., Lee, H. and Hahm, D.H. (2014). Baicalin improves chronic corticosterone-induced learning and memory deficits via the enhancement of impaired hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression in the rat. Journal of Natural Medicines, 68(1): 132-143.
- Li, C., Xing, G., Dong, M., Zhou, L., Li, J., Wang, G., et al. (2010). Beta-asarone protection against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via JNK signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. European Journal of Pharmacology, 635(1-3): 96-102.

- Li, Z., Zhao, G., Qian, S., Yang, Z., Chen, X., Chen, J., et al. (2012). Cerebrovascular protection of beta-asarone in Alzheimer's disease rats: a behavioral, cerebral blood flow, biochemical and genic study. Journal of Ethnopharmacology, 144(2): 305-312.
- Lim, H.W., Kumar, H., Kim, B.W., More, S.V., Kim, I.W., Park, J.I., et al. (2014). β-Asarone (cis-2,4,5-trimethoxy-1-allyl phenyl), attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF-κB signaling and the JNK pathway in LPS activated BV-2 microglia cells. Food and Chemical Toxicology, 72(10): 265-272.
- Liu, J., Li, C., Xing, G., Zhou, L., Dong, M., Geng, Y., et al. (2010). Beta-asarone attenuates neuronal apoptosis induced by Beta amyloid in rat hippocampus. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 130(5): 737-746.
- Lue, L.F., Walker, D.G., Brachova, L., Beach, T.G., Rogers, J., Schmidt, A.M., et al. (2001). Involvement of microglial receptor for advanced glycation end products (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. Experimental Neurology, 171(1): 29-45.
- Maltseva, A.V., Bystryakc, S. and Galzitskayad, O.V. (2011). The role of β-amyloid peptide in neurodegenerative diseases. Ageing Research Reviews, 10(4)**:** 440-452.
- Ojala, J., Alafuzoff, I., Herukka, S.K., Van Groen, T., Tanila, H. and Pirttilä, T. (2009). Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. Neurobiology of Aging, 30(2): 198-209.
- Olajide, O.A., Bhatia, H.S., De Oliveira, A.C., Wright, C.W. and Fiebich, B.L. (2013). Antineuroinflammatory properties of synthetic cryptolepine in human neuroblastoma cells: possible involvement of NF-kappaB and p38 MAPK inhibition. European Journal of Medicinal Chemistry, 63(5): 333-339.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed., San Diego: Academic Press, pp: 45-46.
- Pettigrew, L.C., Kindy, M.S., Scheff, S., Springer, J.E., Kryscio, R.J., Li, Y., et al. (2008). Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. Journal of Neuroinflammation, 5: 47.
- Qaseem, A., Snow, V., Cross, J.T.J.r., Forciea, M.A., Hopkins, R.J.r., Shekelle, P., et al. (2008). Current Pharmacologic Treatment of Dementia: A Clinical Practice Guideline from the American College of Physicians and the American Academy of Family Physicians. Annal of Internal Medicine, 148(5): 370–378.
- Qiduan, W.U., Qinghe, W.U., Qiwen, W. and Yuzhi, C. (2008). Study on anti-thrombosis effect of volatile oil of Acorus Tatarinowii Schott and b-asarone. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 19(1): 29-31.
- Roozendaal, B., Hahn, E.L., Nathan, S.V., De Quervain, D.J. and McGaugh, J.L. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. Journal of Neuroscience, 24(37): 8161-8169.
- Saura, C.A. and Valero, J. (2011). The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Nature Reviews Neuroscience, 22(2): 153-169.
- Thies, W. and Bleiler, L. (2012). Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's and Dementia, 8(2): 131-168.
- Vaynman, S., Ying, Z. and Gomez-Pinilla, F. (2008). Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. Neuroscience, 122(3): 647-657.
- Wang, D.B., Dayton, R.D., Zweig, R.M. and Klein, R.L. (2010). Transcriptome analysis of a tau overexpression model in rats implicates an early pro-inflammatory response. Experimental Neurology, 224(1): 197-206.
- Wei, G., Chen, Y.B., Chen, D.F., Lai, X.P., Liu, D.H., Deng, R.D., et al. (2013). Beta Asarone inhibits neuronal apoptosis via the CaMKII/CREB/Bcl-2 signaling pathway in an in vitro model and AbetaPP/PS1 mice. Journal of Alzheimer's Disease, 33(3): 863-880.

- Willians, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., et al. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. Free Radical Biology and Medicine, 45(3): 295-305.
- Yan, S.S., Chen, D., Yan, S., Guo, L., Du, H. and Chen, J.X. (2012). RAGE is a key cellular target for Abeta-induced perturbation in Alzheimer's disease. Frontiers in Bioscience, 4(1): 240-250.
- Yang, C., Li, X., Mo, Y., Liu, S., Zhao, L., Ma, X., et al. (2016). β-Asarone mitigates amyloidosis and down regulates RAGE in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Cellular and Molecular Neurobiology, 36(1): 121-130.
- Yang, Y., Xuan, L., Chen, H., Dai, S., Ji, L., Bao, Y., et al. (2017). Neuroprotective effects and mechanism of β-Asarone against Aβ1–42-induced injury in astrocytes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 17(1): 1-14.
- Yang, Y.X., Chen, Y.T., Zhou, X.J., Hong, C.L., Li, C.Y. and Guo, J.Y. (2013). Beta-asarone, a major component of Acorus tatarinowii Schott, attenuates focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13(1): 236.
- Yi-zhi, C., Ruo-ming, F., Gang, W., Shuang-feng, L., Yu-feng, H.E., Shu-ying, W., et al. (2004). Effect of volatile oil of Acorus and b-Asarone on Vasomotion and anti-platelet Aggregation in Rats with Hyperlipidemia. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 24(1): 16-18.
- Zhaorigetu, S., Yang, Z., Toma, I., McCaffrey, T.A. and Hu, C.A. (2011). Apolipoprotein L6, induced in atherosclerotic lesions, promotes apoptosis and blocks Beclin 1-dependent autophagy in atherosclerotic cells. The Journal of Biological Chemistry, 286(31): 27389-27398.
- Zou, D.J., Wang, G., Liu, J.C., Dong, M.X., Li, X.M., Zhang, C., et al. (2011). Beta-asarone attenuates beta-amyloid-induced apoptosis through the inhibition of the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in SH-SY5Y cells. Die Pharmazie, 66(1): 44-51.