

بررسی اثر فاکتور اسید فولیک بر کاتالپسی در موشهای صحرایی نر مدل پارکینسونی ایجاد شده توسط رزپین

چکیده

سابقه و هدف: بیماری پارکینسون یک اختلال عصبی پیشرونده با علائمی چون کندی در انجام حرکت، لرزش استراحت، سفتی عضلات و ناپایداری تعادلی است. با توجه به تاثیر محافظت نورونی و آنتی اکسیدانی اسید فولیک هدف این بررسی تعیین اثر اسید فولیک بر فعالیت حرکتی (کاتالپسی) موشهای صحرایی نر مدل پارکینسونی با استفاده از تست میله می باشد. مواد و روشها: در تحقیق تجربی حاضر، موشهای صحرایی به تعداد ۲۴ سر به ۴ گروه تقسیم شدند. مدل تجربی پارکینسون توسط تزریق رزپین داخل صفاق انجام گردید. گروههای آزمایش اسید فولیک با مقدار 5 mg/kg را روزانه به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند، سپس همه گروهها توسط تست میله مورد ارزیابی قرار گرفتند. یافته ها: نتایج به دست آمده نشان داد که دریافت اسید فولیک به مقدار 5 mg/kg به مدت یک هفته به طور معنی داری $p < 0/05$ کاتالپسی را در موشهای صحرایی مدل پارکینسونی بهبود می بخشد. نتیجه گیری: می توان گفت که اسید فولیک باعث بهبود کاتالپسی در موشهای صحرایی نر مدل پارکینسونی می شود.

واژگان کلیدی: اسید فولیک، پارکینسون، تست میله، رزپین، موش صحرایی نر

Effect of folic acid on catalepsy in reserpine –induced parkinsonian male rat model

Abstract

Introduction: Experimental evidence suggests that the folate deficiency and its consequent, the elevated homocysteine level, can sensitize the dopaminergic neurons of substantia nigra to the environmental toxin, whereby it may increase the risk of Parkinson disease. Parkinson's disease is a progressive neurological disorder with symptoms such as rest tremor, muscle stiffness, paucity of voluntary movements, and postural instability. Regarding the neuroprotective and antioxidant effect of the folic acid, purpose of this study was to determine the effect of folic acid on motor activity (catalepsy) in Parkinson model of rats with using the bar-test. **Materials and Methods:** In this experimental study, 24 rats were randomly divided into four groups. Experimental model of Parkinson's disease was induced by intraperitoneal injection of reserpine. Each of animals in the folic acid groups was given folic acid (5 mg / kg, i.p) every day. Then all groups were evaluated by the bar-test. **Results:** The results showed that this dose of the folic acid (5 mg / kg) for a week significantly ($p < 0/05$) improves the catalepsy in the rats model of Parkinson's disease.

Conclusion: It can be said that folic acid improves catalepsy in Rats Model of Parkinson's disease.

Keywords: Folic acid, Parkinson, bar-test, reserpine, rat

مقدمه

بیماری پارکینسون یک اختلال عصبی پیشرونده با علائمی چون کندی در انجام حرکت **Brady kinesia** لرزش استراحت، سفتی عضلات و ناپایداری تعادلی است. (۱) **Brady kinesia** یا کندی حرکات از مهم ترین علائم عدم کارکرد مناسب عقده های قاعده ای در بیماران پارکینسونی است، بر هم خوردن تعادل آخرین عارضه ای است که ممکن است در بیماری پارکینسون ایجاد شود ولی به شدت برای شخص بیمار ایجاد مشکل می کند علت اصلی این موضوع انحطاط سلولهای گلوبوس پالیدوس شناخته شده است. از دست دادن تعادل عمدتاً در مراحل پیشرفته بیماری مشاهده می شود برهم خوردن تعادل منجر به شکسته شدن استخوان ران در بیماران می شود (۲) بیماری پارکینسونی ایدیو پاتیک دومین اختلال عصبی رایج، معمولاً علائم آن در دهه ۵ یا ۶ زندگی دیده می شود و بر ۱ درصد افراد بالای ۶۵ سال تاثیر دارد. (۳) تا کنون برای بیماری پارکینسون درمان قطعی کشف نشده است بیماری پارکینسون یک ناهنجاری سیستم عصبی است و مشابه تمامی بیماریهای مرتبط با دستگاه عصبی درمان مشخص و قطعی ندارد. این بیماری همراه با علائم حرکتی و غیر حرکتی است و این علائم عمدتاً "باعث مختل شدن امور روزمره فرد مبتلا می شود. درمان های کنونی با هدف کاهش این علائم ارائه شده اند. این درمانها به سه دسته عمده دارو درمانی، فیزیوتراپی و جراحی تقسیم می شوند. (۴) امروزه استفاده

از اسید فولیک به عنوان یک مکمل غذایی، رو به افزایش است و تحقیقات، پیرامون اسید فولیک و ارتباط آن با بیماریهای مختلفی همچون نقص لوله عصبی، سکنه ی مغزی، صرع، ضعف عملکردهای شناختی، آلزایمر و پارکینسون از دهه ی گذشته آغاز شده است (۵)

واژه ی اسید فولیک برای نخستین بار در سال ۱۹۴۱ توسط میشل و همکارانش به دلیل استخراج این ویتامین از سبزیجات برگ سبز انتخاب شد. از دیگر نام های این ویتامین می توان به ویتامین **B9**، ویتامین **M**، ویتامین **Bc**، فاکتور ویلز، فاکتور **L** - کازنی اشاره نمود (۶) انسان ها قادر به ساختن فولات نیستند و باید آن را از رژیم های غذایی به دست آورند، منبع اصلی فولات، سبزیجات به ویژه (اسفناج، مارچوبه، کلم بوکلی)، مرکبات، جگر، قارچ و همه ی غلات می باشد (۷ و ۵) غالب فولات رژیم غذایی به شکل ۵-متیل ترا هیدروفولات و ۱۰ - فرمیل ترا هیدرو فولات می باشد که به آسانی از عرض اپی تلیوم روده ای منتقل می شوند. سلولها در سرتاسر بدن حاملهای فولات را بیان می کنند و در نتیجه فولات ها در متابولیسم واحد های یک کرینه تقریباً در همه ی انواع سلولها نقش حیاتی دارند (۵)

بنابراین در این کار پژوهشی اثر اسید فولیک بر کاتالپسی در موشهای صحرایی نرمدل پارکینسونی ناشی از رزوپین مورد بررسی قرار گرفت.

یک بارفیکس چوبی که دارای یک سکو می باشد و ارتفاع بارفیکس از سکو ۹ سانتی متر و قطر میله بارفیکس ۰/۹ سانتی متر است ، بررسی شد .

برای انجام آزمایش ، حیوان بر روی سکو قرار داده شد و دو دست آن به آرامی روی میله بارفیکس قرار داده شد مدت زمانی که حیوان در این وضعیت باقی ماند ثبت شد . بدیهی است هر چه کاتالپسی حیوان شدیدتر بود مدت زمان بیشتری در وضعیت اتصال سپری می کرد .(۸)

رژیم غذایی اسید فولیک :

جهت بررسی اثر تجویز اسید فولیک بر فعالیت حرکتی ، برای هر گروه اسید فولیک به فرم پتروئیل گلو تامیک اسید ، ساخت شرکت سیگما تهیه و در سود ۰/۵ مولار حل شد ، و به ۲ گروه حیوانات با مقدار دوز 5 mg/kg/day ، در مدت سه هفته به صورت داخل صفاقی تزریق شد .(۹)

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از تحقیق از نرم افزار SPSS با به کارگیری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه زوج ها (Paired Samples Test) و سطح معنی دار در همه این حالات $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفته و نمودارهای میانگین به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شد.

مواد و روشها

پروژه حاضر بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (انستیتو پاستور کرج) انجام گردید، موشها در محدوده وزنی 20 ± 240 گرم استفاده شد . هر سه یا چهار موش در یک قفس و در شرایط کنترل شده از نظر دما و نور (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص موش در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند . موش ها بر اساس استاندارد های رعایت حقوق حیوانات مصوبه دانشگاه آزاد اسلامی و معاهده هلسنیکی نگهداری شدند .

حیوانات به طور تصادفی در ۴ گروه قرار گرفتند .

- ۱- گروه کنترل $n=6$
- ۲- گروه پارکینسون (reserpine) $n= 6$
- ۳- گروه اسید فولیک $n= 6$
- ۴- گروه پارکینسون + اسید فولیک $n= 6$

ایجاد مدل پارکینسون با رزپین :

در این مطالعه موشها به منظور نمایش علائم پارکینسون ، ۲ بار در روز دوز (1mg/kg) رزپین (ساخت sigma-Aldrich,Indi) را بطور داخل صفاقی دریافت کردند .(۸)

آزمایش رفتاری (تست میله) :

ارزیابی رفتاری هر موش یک روز قبل و ۷ روز بعد از تجویز Reserpine انجام شد. نمایش حرکت با

مقایسه گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه پارکینسون کاهش معنی دار دیده شد .

($P < 0/05$)

در بررسی اثر تجویز اسید فولیک در موشهای پارکینسونی بر تست میله در هفته دوم:

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در مقایسه گروه پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار وجود دارد. ($P < 0/001$ ***) و در مقایسه گروه اسید فولیک با گروه کنترل اختلاف معنی دار مشاهده نشد. و نیز در مقایسه گروه اسید فولیک + پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار مشاهده شد.

($P < 0/01$ **) و همچنین در مقایسه گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه پارکینسون کاهش معنی دار دیده شد. ($P < 0/05$)

در بررسی اثر تجویز اسید فولیک در موشهای پارکینسونی بر تست میله در هفته سوم:

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در مقایسه گروه پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار وجود دارد. ($P < 0/001$ ***) و در مقایسه گروه اسید فولیک با گروه کنترل اختلاف معنی دار مشاهده نشد. و نیز در مقایسه گروه اسید فولیک + پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار مشاهده شد. (

$P < 0/01$ **) و همچنین در مقایسه گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه پارکینسون کاهش معنی دار دیده شد. ($P < 0/01$ **))

نتایج

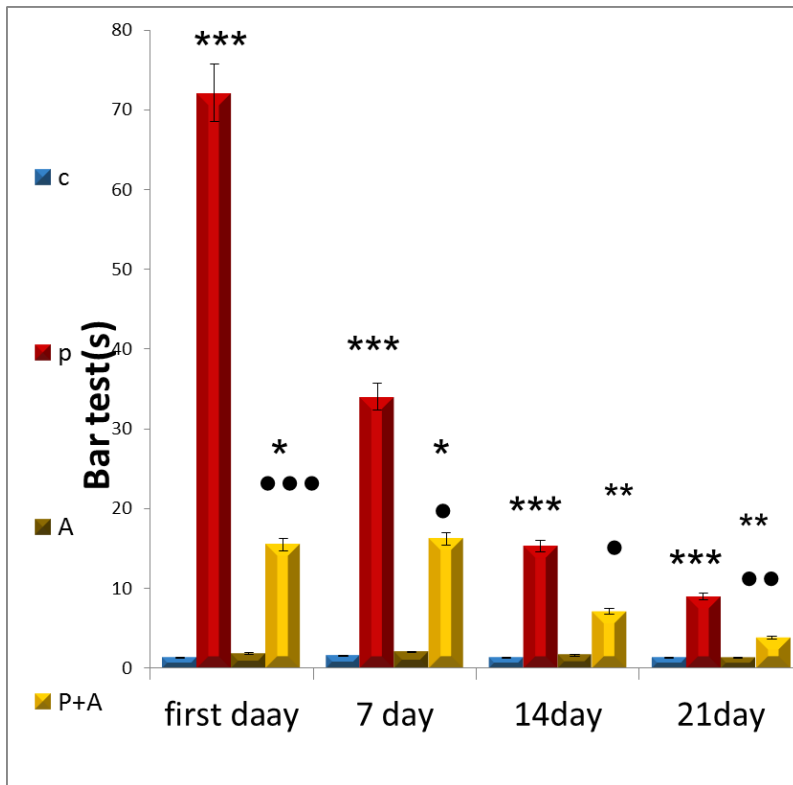
در بررسی اثر تجویز اسید فولیک در موشهای پارکینسونی بر تست میله در روز اول :

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در مقایسه گروه پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار وجود دارد. ($P < 0/001$ ***) و در مقایسه گروه اسید فولیک با گروه کنترل اختلاف معنی دار مشاهده نشد. و نیز در مقایسه گروه اسید فولیک + پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار مشاهده شد. ($P < 0/05$ *) . همچنین در مقایسه گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه پارکینسون کاهش معنی دار دیده شد .

($P < 0/001$ ***)

در بررسی اثر تجویز اسید فولیک در موشهای پارکینسونی بر تست میله در هفته اول:

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در مقایسه گروه پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار وجود دارد. ($P < 0/001$ ***) و در مقایسه گروه اسید فولیک با گروه کنترل اختلاف معنی دار مشاهده نشد. و نیز در مقایسه گروه اسید فولیک + پارکینسون با گروه کنترل افزایش معنی دار مشاهده شد. ($P < 0/05$ *) و همچنین در



نمودار ۱: بررسی اثر تجویز اسید فولیک در موشهای پارکینسونی بر تست میله در روز اول، هفته اول، دوم و سوم

[S] Commented [1]: روز اول در نمودار دارای اشتباه تایپی اشتباه است لطفا اصلاح شود.

*** $P < 0.001$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است

** $P < 0.01$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است

* $P < 0.05$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است .

● $P < 0.05$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه پارکینسونی است

● ● $P < 0.01$. اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است

● ● ● $P < 0.001$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه پارکینسون است

ستون ها بیانگر Mean±SEM است (n=6)

بحث

براساس پژوهشهای انجام گرفته ، بیماری پارکینسون بیماری پیش رونده ای است که در سنین بزرگ سالی و در دامنه ی سنی ۶۰-۵۵ سال بیشترین شیوع را دارد (۱۰) (دوزهای متفاوت از ۱۰ تا ۱۰۰ mg/kg رزپین ، دامنه وسیعی از محدودیت حرکتی شبیه پارکینسون، بطور عمده بی حرکتی ، کاهش حرکت ، کاتالپسی ، سفتی عضو بدن ، لرزش دهان ایجاد می کند. (۱۱)

نتایج این پروژه نشان داد که در مقایسه گروه پارکینسونی و گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه کنترل برتست میله افزایش معنی دار وجود دارد. (نمودار ۱) ، با توجه به مطالب ذکر شده مشخص می شود که رزپین توانسته باعث ایجاد کاتالپسی در موشها شود. نتایج حاصل از تست میله در مطالعه حاضر نشان دهنده تفاوت معنی داری بین گروههای پارکینسونی و گروه کنترل سالم می باشد.

ارتباط بین رزپین و پارکینسون ابتدا بوسیله **classon et al** کشف شد که مرحله بی حرکتی را در جوندگان بوسیله رزپین القا می کرد و با **L-dopa** آرام می شدند. (۱۲)

تجویز حاد عامل تخلیه کننده مونو آمینی رزپین باعث بیماری پارکینسونیسم دارویی موقت (کندی حرکت ، کاتالپسی، لرزش وسفتی عضلانی) می باشد و برای مطالعه **PD** در مدل‌های حیوانی (۱۳) مفید است. در واقع با مشاهدات ، تایید شده که در نورونهای کاتکول آمینرژیک جمعیت نسبتاً فراوان از میکرو پراکسی زوم های کاتالاز مثبت ایجاد شده است . استرس اکسیداتیو

ایجاد شده با رزپین، با افزایش متابولیسم دوپامین بعنوان یک نتیجه از کاهش مولکولهای دوپامین در وزیکولها (۱۴) و افزایش بازگشت دوپامین است . این کاهش مونو آمینی ۳۰ دقیقه پس از تزریق شروع می شود و ممکن است تا ۱۴ روز ادامه یابد و در نهایت پس از ۲۱ روز از باز یابی به سطح طبیعی برگردد (۱۵) تغییرات ناشی از رزپین موقتی هستند و تجویز رزپین به جسم مخطط نیز تغییرات مورفولوژیک در نورون های جسم سیاه ایجاد نمی کند. (۱۵)

نتایج بدست آمده از پروژه حاضر نشان داد که در مقایسه گروه پارکینسون + اسید فولیک با گروه پارکینسون برتست میله کاهش معنی دار وجود دارد . این نتایج نشان می دهد که اسید فولیک باعث بهبود وضعیت کاتالپسی ناشی از رزپین می شود . برخی مطالعات نشان می دهند تیمار با اسید فولیک به طور معنی داری مرگ نورونهای حرکتی در اختلالات حرکتی را کاهش می دهد. (۱۶)

مطالعات (Duan et al., 2002) شواهدی تهیه کرد که هموسیستین می تواند اثرات نورو توکسین های محیطی روی نورونهای دوپامینرژیک را تشدید کند ، ولی نمی تواند بطور قطع ثابت کند که هموسیستین میانجی اثر کاهش فولات روی ابتلا به نورو توکسین ها است . (۱۷) با این حال مشاهده شد که کاهش فولات اثرات تخریب سلولی نورو توکسین محیطی را افزایش می دهد که بطور بالقوه بسیار مهم است . مفهوم اصلی این است که کاهش فولات فاکتور خطر برای پارکینسون است. (۱۷) نتایج مطالعات بسیاری نشان می دهند که افزایش سطح هموسیستین که ممکن است ناشی از کمبود فولات یا مومتاسیون در آنزیم های درگیر

KE, Koller W. Handbook of Parkinson's disease: CRC Press; 2012.

3. Dutra MF, Jaeger M, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, Marcuzzo S, Achaval M. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurological Sciences*. 2012 Oct 1;33(5):1137-44.
4. Graybiel AM. The basal ganglia. *Current Biology*. 2000 Jul 15;10(14):R509-11.
5. Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing research reviews*. 2002 Feb 28;1(1):95-111.
6. Hassing L, Wahlin Å, Winblad B, Bäckman L. Further evidence on the effects of vitamin B₁₂ and folate levels on episodic memory functioning: a population-based study of healthy very old adults. *Biological psychiatry*. 1999;45(11):1472-80.
7. Meshkin B, Blum K. Folate nutrigenetics: a convergence of dietary folate metabolism, folic acid supplementation, and folate antagonist pharmacogenetics. *Drug metabolism letters*. 2007 Jan 1;1(1):55-60.
8. Singh A, Naidu PS, Kulkarni SK. FK506 as effective adjunct to L-dopa in reserpine-induced catalepsy in rats. *Indian journal of experimental biology*. 2003 Nov 31;41(11):1264-8.
9. Khombi Shoostari M, Moazedi MA, Parham GA. The effects of different doses of folic acid on motor activity of rat. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2010 Oct 15;14(3):217-22.
10. Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, Horak FB, Okun MS, Foote KD, Krack P, Pahwa R. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Archives of neurology*. 2011 Feb 14;68(2):165-.
11. Baskin P, Salamone J. Vacuous jaw movements in rats induced by acute reserpine administration: interactions

در کاتابولیسیم هموسیستین باشد، بیشتر، دستگاه عصبی مرکزی را تحت تأثیر قرار می دهد. شواهد اخیر بیان می کنند، تغییر در سرنوشت متابولیت های هموسیستینی منجر به هیپرهموسیستینمی می شود که نقش مهمی را در پاتوبیولوژی اختلالات نورودژنراتیو به ویژه بیماری پارکینسون ایفا میکند. (۱۸)

فرهودی و همکاران طی مطالعه ای نشان دادند هموسیستین سرم در بیماران پارکینسونی نسبت به افراد غیرپارکینسونی بیشتر است، اما با شدت بیماری در گروه های مختلف ارتباط معنی داری ندارد آنها بیان کردند در زمینه ی اثر درمان کاهش دهنده های سطح هموسیستین با استفاده از تجویز مکمل های ویتامینی (گروه B و اسید فولیک) در بیماری پارکینسون باید مطالعات بیشتری انجام گیرد. (۱۹)

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهد که دریافت اسید فولیک موجب بهبود فعالیت حرکتی در موش های صحرایی نر بالغ می شود؛ بنابراین به نظرمی رسد مطالعاتی از این قبیل اطلاعات سودمندی را در جهت کاربرد اسید فولیک و به طور کلی ویتامین های گروه B به منظور درمان و یا پیشگیری اختلالات نورودژنراتیو از قبیل پارکینسون فراهم می کند، که تحقق این امر مستلزم پژوهش های بیشتر می باشد.

منابع

1. Amara AW, Watts RL, Walker HC. The effects of deep brain stimulation on sleep in Parkinson's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2011;4(1):15-24
2. Pahwa R, Lyons KE, editors. *Handbook of Parkinson's disease*. Crc Press; 2013 May 9. Pahwa R, Lyons

The Journal of nutrition. 2007 Feb 1;137(2):311-4.

19. . Neuman JC, Albright KA, Schalinske KL. Exercise prevents hyperhomocysteinemia in a dietary folate-restricted mouse model. Nutrition research. 2013 Jun 30;33(6):487-93.

- with different doses of apomorphine. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1993 Dec 31;46(4):793-7.
12. Carlsson M, Carlsson A. Marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice following treatment with atropine in combination with clonidine. Journal of Neural Transmission-Parkinson's Disease and Dementia Section. 1989 Dec 1;1(4):317-22.
13. Santos JR, Cunha JA, Dierschnabel AL, Campêlo CL, Leão AH, Silva AF, Engelberth RC, Izídio GS, Cavalcante JS, Abílio VC, Ribeiro AM. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. Behavioural brain research. 2013 Sep 15;253:68-77.
14. McKenna O, Arnold G, Holtzman E. Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. Brain research. 1976 Nov 26;117(2):181-94.
15. Leão AH, Sarmiento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. Brain Pathology. 2015 Jul 1;25(4):377-90.
16. Duncan GE, Perri MG, Anton SD, Limacher MC, Martin AD, Lowenthal DT, Arning E, Bottiglieri T, Stacpoole PW. Effects of exercise on emerging and traditional cardiovascular risk factors. Preventive medicine. 2004 Nov 30;39(5):894-902.
17. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. Journal of neurochemistry. 2002 Jan 1;80(1):101-10.
18. Williams KT, Schalinske KL. New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism.