IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
دوره ۳، شماره ٤، پیاپی ۱۲، صفحه ۲٤٥-۲۳٥

مقاله پژوهشی

تجویز هموسیستئین در دوره پس از تولد رفتارهای شبه‌اضطراب القا می کند: اثر محافظتی اسید فولیک

حکیمه کوهپیما، ایران گودرزی*

دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

دریافت: ۱۸ اردیبهشت ۱۳۹۹ پذیرش: ۴ مرداد ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف: اضطراب اختلال شایع عصبی است که بر اثر تحریک و یا تخریب نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکمپ بروز می‌کند. هموسیستئین اخیراً به عنوان یک آمینو اسید تحریکی بالقوه و یک فاکتور خطر در اختلالات سیستم عصبی مرکزی شناخته شده است. این مطالعه جهت بررسی اثرات تجویز هموسیستئین بر رفتارهای شبه اضطرابی طراحی گردید. همچنین ما احتمال نقش محافظتی اسید فولیک را به عنوان آنتی اکسیدانت بالقوه در مقابل اثرات ناشی از هایپرهموسیستئینمیا در هیپوکمپ بررسی نمودیم.

روش‌ها: موش‌های نوزاد به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول نرمال سالین، گروه دوم هموسیستئین را به صورت زیر جلدی روزانه دو بار به فاصله ۸ ساعت (۰/۶-۰/۳ میکرومول بر گرم وزن موش) دریافت کردند. گروه سوم هموسیستئین+ اسید فولیک (میکرومول ۰/۰۱۱) و گروه چهارم اسید فولیک را از روز ۴-۲۵ پس از تولد دریافت کردند. در روز ۲۶ام فعالیت جستجوگرایانه و اضطراب با استفاده از اوپن فیلد و ماز بعلاوه شکل مرتفع به ترتیب ارزیابی شد. سپس مطالعه بافتی صورت گرفت.

یافته‌ها: تجویز هموسیستئین میزان هموسیستئین کل را در پلاسما افزایش داد. اسید فولیک میزان هموسیستئین پلاسما را بطور معناداری کاهش داد. هموسیستئین رفتار شبه اضطراب را القا نمود. تعداد ایستادن حیوان به طور معنی‌داری به دنبال تجویز هموسیستئین نسبت به کنترل کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$). درصد مدت زمان سپری شده در بازوهای باز ماز بعلاوه شکل مرتفع بطور معناداری کاهش و درصد مدت زمان حضور در بازوهای بسته در موش‌های در معرض هموسیستئین نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($p < ۰/۰۰۱$). تیمار اسیدفولیک درصد زمان حضور در بازوهای باز را افزایش و درصد زمان حضور در بازوهای بسته را در گروه "هموسیستئین+ اسید فولیک" نسبت به موش‌های گروه هموسیستئین کاهش معنادار داد ($p < ۰/۰۵$). بررسی بافت‌شناسی نشان داد که تغییر معناداری در تعداد سلول‌های هیپوکامپ بین گروه‌ها وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: افزایش سطح هموسیستئین پلاسما در دوران پس از تولد رفتارهای شبه اضطراب القا می‌نماید. اسید فولیک اثر محافظتی در برابر اضطراب ناشی از هموسیستئین دارد.

واژه‌های کلیدی: اسید فولیک، اضطراب، موش صحرایی، هموسیستئین، هیپوکمپ

مقدمه

اضطراب احساس ناخوشایند عصبانیت، تنش، نگرانی است که همراه با فعالیت سیستم عصبی اتونومیک تعریف می‌شود. مطالعات آماری نشان می‌دهد که وابسته به سن و روش‌های بررسی ۱/۸ جمعیت دنیا از طیف‌های مختلفی از اختلالات اضطرابی رنج می‌برند [۱]. اضطراب معمولاً همراه با افسردگی بخش مهمی از اختلالات روان شناختی را مخصوصاً در زمان طفولیت و کودکی تشکیل می‌دهند که در نهایت منجر به نتایج منفی و نواقص عملکردی می‌گردند [۲].

مطالعات نشان داده‌اند که تحریک و یا تخریب بخش‌های مختلف سیستم لیمبیک از جمله قشر پیشانی و هیپوکمپ در نخستی‌ها، در ایجاد اضطراب دخالت دارند [۳]، بنابراین شناسایی و کنترل عوامل محرک این سیستم می‌تواند کمک شایانی به درمان اضطراب کند.

هموسیستئین اخیراً به عنوان یک عامل تحریکی بالقوه

* نویسنده مسئول مکاتبات: irangoudarzi@du.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-6665-3202)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

سیستم عصبی مرکزی شناخته شده است که در چرخه متابولیسم متیونین ساخته می‌شود و مشارکت آن به عنوان ریسک فاکتور در طیف وسیع اختلالات مغزی توجه مطالعات را به خود جلب کرده است. تحقیقات روبه‌رشدی نشان داده‌اند که افزایش غیرطبیعی هموسیستئین در ارتباط با افزایش خطر بیماری‌های نورولوژیک و روان‌شناختی از جمله دمانس، افسردگی، اسکیزوفرنی و بیماری الزایمر می‌باشد. با این حال، ارتباط هموسیستئین و اختلالات اضطرابی مبهم است و نتایج مطالعات کلینیک به صورت ضد و نقیض گزارش شده است. در حالی که مطالعه هوردالاند[1] هیچ ارتباطی بین هموسیستئین و اضطراب نشان نداد [۴]، مطالعه بالینی پیتساوس[2] ارتباط مستقیم بین افزایش هموسیستئین و میزان اضطراب در زنان و مردان گزارش کرده است [۵] .

به‌هرحال اگر چه مکانیسم دقیق عصبی-رفتاری عمل هموسیستئین واضح نیست، اما برهمکنش هموسیستئین با انتقال عصبی گلوتامات به نظر می‌رسد مکانیسم مهمی باشد که به صورت یک آمینواسید تحریکی بتواند آسیب‌پذیری سلول‌های عصبی را به آسیب های اکسیداتیو و سمیت نورونی درشرایط آزمایشگاه[3] و محیط زنده[4] به طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش دهد [۶].

بنابراین باتوجه‌به اینکه گزارشاتی وجود دارد که تحریک شدید سلول‌های هیپوکمپ در اختلالات اضطرابی نقش دارد و سیستم گلوتاماترژیک اصلی‌ترین سیستم دخیل درهیپوکمپ بوده و بیشتر نورون‌های موجود درهیپوکمپ گلوتاماترژیک می‌باشند [۷]. بنابراین، این احتمال وجود دارد که هموسیستئین، میزان رهایش گلوتامات از این نورون‌ها را تغییر داده و به تبع آن باعث تغییر در فعالیت گیرنده‌های گلوتاماتی و تحریک‌پذیری بیشتر هیپوکمپ شود. بعلاوه، ارتباط نزدیکی بین تجمع رادیکال‌های آزاد در هیپوکمپ و افزایش اضطراب در موش‌ها گزارش شده است و شواهد بیانگر آسیب القا شده در هیپوکمپ ناشی از استرس اکسیداتیواند [۹، ۸].

هموسیستئین با اتواکسیداسیون، پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون پروتئین‌ها تولید گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنشگر را افزایش می‌دهد و از طریق اکسیداسیون تیول بدلیل داشتن گروه (SH) منجر به تولید سوپراکسیدهای داخل سلولی می‌شود [۱۰]. افزایش سطح رادیکال‌های آزاد درون سلول توسط هموسیستئین باعث آزادشدن سیتوکروم c میتوکندریایی به درون سیتوزول و فعالیت کاسپاز ۳ و راه‌اندازی مسیر آپوپتوزی در سلول می‌شود [۱۱]. بنابراین مکانیسم احتمالی دیگری که هموسیستئین می‌تواند از طریق آن درآسیب، نورودژنراسیون و بیماری‌های وابسته به استرس از جمله افسردگی و اضطراب نقش داشته باشد القای استرس اکسیداتیو می‌باشد. از طرف دیگر اگر افزایش هموسیستئین نوروتوکسین باشد، استفاده از داروهای کاهنده سطح هموسیستئین باید اثرات محافظتی باشد. همانطور که مطالعات پیشین نشان داده‌اند استفاده از اسید فولیک که نقش آن در پایین آوردن سطح پلاسمایی هموسیستئین اثبات شده، توانسته به بهبود شرایط اکسیداتیو ناشی از هموسیستئین در قشر آهیانه کمک کند [۱۲].

لذا، با توجه به مطالب ذکر شده و اینکه افزایش سطح هموسیستئین پلاسما در بسیاری از کودکان با اختلالات ذهنی شدید گزارش شده در حالی که بررسی اثرات هموسیستئین بر اضطراب و افسردگی محدود است بر آن شدیم اثرات تجویز هموسیستئین در ایجاد اضطراب را بررسی و همچنین اثر تجویزاسید فولیک بر تغییرات رفتاری و بافتی مدل هایپرهموسیستئینمیا را مطالعه نماییم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، از موش های صحرائی نر ۴ روزه نژاد ویستار استفاده شد. کلیه حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، ۲ ± ۲۲ °C نگهداری شدند. بچه موش‌ها تا روز ۲۱ پس از تولد از شیر مادر تغذیه و بعد از اتمام دوره شیرخوارگی دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. درتمامی مراحل آزمایش، اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق مصوبات دانشگاه دامغان مورد نظر قرار گرفت.

هموسیستئین و اسید فولیک از شرکت سیگما خریداری شد و پس از حل‌شدن در نرمال سالین، pH 7.4 تنظیم شد. موش‌های نر در روز چهارم پس از تولد به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شده که شامل گروه کنترل، گروه هموسیستئین،

[1] Hordaland
[2] Pitsavos
[3] In vitro
[4] In vivo

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

هموسیستئین + اسیدفولیک و اسیدفولیک می‌باشد. گروه کنترل نرمال سالین را به صورت تزریق زیر پوستی، روزی دوبار و با فاصله ۸ ساعت دریافت کردند. به موش‌های گروه دوم روزانه دوبار و با فاصله ۸ ساعت با دوز هفته اول ۰/۳، هفته دوم ۰/۴و هفته آخر ۰/۶ میکرو مول بر گرم وزن هموسیستئین تجویز شد [۱۳]. در گروه سوم همزمان با هموسیستئین اسید فولیک (۰/۰۱۱ µmole) روزانه یکبار به صورت درون‌صفاقی تجویز شد [۱۲] و گروه چهارم اسید فولیک را به‌تنهایی در همین دوره زمانی دریافت کردند. پس از اتمام دوره تزریق، جهت سنجش غلظت هموسیستئین خونگیری از قلب موش‌ها ۱ ساعت پس از آخرین تزریق و با استفاده از ضد انعقاد EDTA صورت گرفت. سپس تست رفتاری از موش‌ها به عمل آمده و تعدادی از موش‌ها پرفیوژن شده و مغز جهت مطالعه بافت‌شناسی در فرمالین فیکس شد (شکل ۱).

مطالعه رفتاری

آزمون میدان باز[5]

از آزمون میدان باز برای ارزیابی فعالیت جستجوگرانه‌ی حیوان به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. بدین منظور در روز ۲۵ پس از تولد، حیوان در جعبه‌ای از جنس پلکسی گلس[6] که به ۱۶ مربع با اندازه‌های مساوی تقسیم شده قرار داده شد و پارامترهای کراسینگ[7] یعنی تعداد مربع‌هایی که حیوان از آن عبور می‌کند و تعداد دفعاتی که موش روی دو پای خود می‌ایستد[8] ارزیابی شد [۱۴].

آزمون ماز بعلاوه مرتفع[9]

این ماز از دو بازوی باز و دو بازوی بسته به شکل بعلاوه (طول هر بازو ۵۰ سانتیمتر و پهنای ۱۰ سانتیمتر بوده و ارتفاع دیواره بازوی بسته ۳۰ سانتیمتر می‌باشد) تشکیل شده است و ۵۰ سانتیمتر از سطح زمین ارتفاع دارد. پس از آشنایی حیوان با ماز، حیوان در مرکز ماز قرارداده شد و آزادانه به مدت ۵ دقیقه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت و زمان حضور حیوان در بازوهای باز و بسته با استفاده از کورنومتر اندازه‌گیری گردید. سپس درصد زمان حضور در بازوهای باز و بسته محاسبه گردید. درصد زمان حضور در بازوی باز به‌صورت درصد نسبت زمان سپری شده در بازوی باز به مجموع ورود به بازوی باز و بسته محاسبه گردید. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته قرارگرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظراست. این ماز برای سنجش رفتار اضطرابی حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲].

مطالعه بافتی

پس از انجام آزمایشات رفتاری در روز ۲۶ پس از تولد، تعدادی از موش‌ها در همه‌ی گروه های مورد آزمایش با کتامین و زایلزین بیهوش گردیده و پس از پرفیوژن‌کردن، مغز موش‌ها در ماده فیکس‌کننده فرمالین تثبیت گردید. در ادامه، پس از طی مراحل پردازش بافتی مثل آبگیری با غلظت‌های مختلف اتانول و شفاف‌سازی با زایلول با پارافین قالب‌گیری انجام شد. سپس توسط دستگاه میکروتوم روتاری برش‌گیری و از برش‌ها لام تهیه شد. در پایان از رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله برای رنگ‌آمیزی استفاده گردید. از هر گروه ۳ مغز و از هر مغز ۳ برش شمارش شد. شمارش با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی۴۰× و به کمک گرید در ابعاد ۲۵۰ میکرون انجام شد.

تجزیه و آنالیز آماری

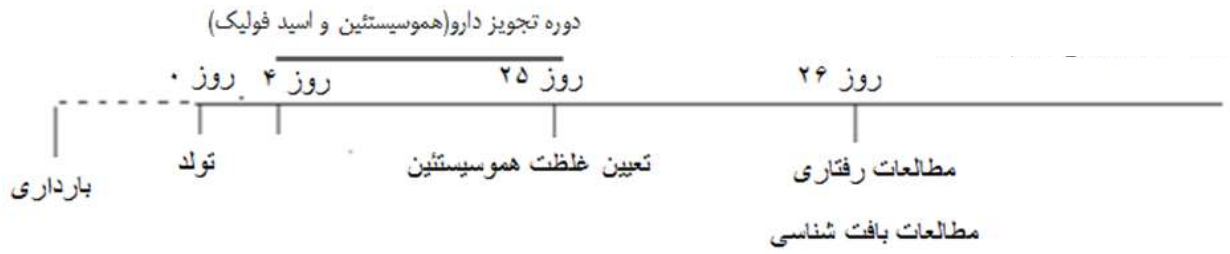
نتایج به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد ارائه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مشخص گردید و به دنبال آن از آزمون توکی[10] برای مشخص‌کردن سطح معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد. حداقل تفاوت معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ درنظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم گردید.

یافته‌ها

در این آزمایش با تزریق هموسیستئین به صورت زیرجلدی، روزانه دو بار و به فاصله ۸ ساعت، از روز ۲۵-۴ پس از تولد، مدل هایپرهموسیستئینمیا ایجاد شد و با این مدل تزریق سطح

[5] Open field
[6] Plexiglass
[7] Crossing
[8] Rearing
[9] Elevated plus maze
[10] Tukey post hoc

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]



شکل ۱– نمودار زمانی انجام آزمایش

هموسیستئین پلاسما در ۲۴ ساعت بالا نگه داشته شد. نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که غلظت هموسیستئین پلاسما یک ساعت بعد از تزریق هموسیستئین نسبت به کنترل افزایش معناداری داشت ($p < ۰/۰۰۱$). تجویز اسید فولیک یک ساعت قبل از هموسیستئین به صورت داخل‌صفاقی غلظت هموسیستئین پلاسما را در گروه "هموسیستئین + اسید فولیک" به طور معناداری کاهش داد ($p < ۰/۰۰۱$).

تاثیر هموسیستئین بر فعالیت‌های حرکتی و رفتارهای جستجوگرانه

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری در پارامتر تعداد مربع‌های پیموده شده بین گروه‌ها وجود ندارد (۱۴– ۱۲ = n و ۰/۸۸ = p و ۰/۲۱۸ = ۴۹وF_3) (نمودار ۱الف). تفاوت معنی‌داری در پارامتر تعداد ایستادن بین گروه‌ها مشاهده گردید (۱۴– ۱۲ = n و ۳/۸ = ۴۹ و F_3، و ۰/۰۱۵ = p). آزمون تکمیلی توکی نشان داد که تجویز هموسیستئین تعداد ایستادن حیوانات گروه هموسیستئین را نسبت به گروه کنترل کاهش داد که بیانگر افزایش اضطراب وکاهش فعالیت جستجوگرایانه در این بچه موش‌ها بود. تجویز اسید فولیک تغییر معنی‌داری در تعداد ایستادن حیوانات نسبت به گروه هموسیستئین ایجاد نکرد (نمودار ۱ب).

تاثیر تجویز هموسیستئین بر میزان اضطراب

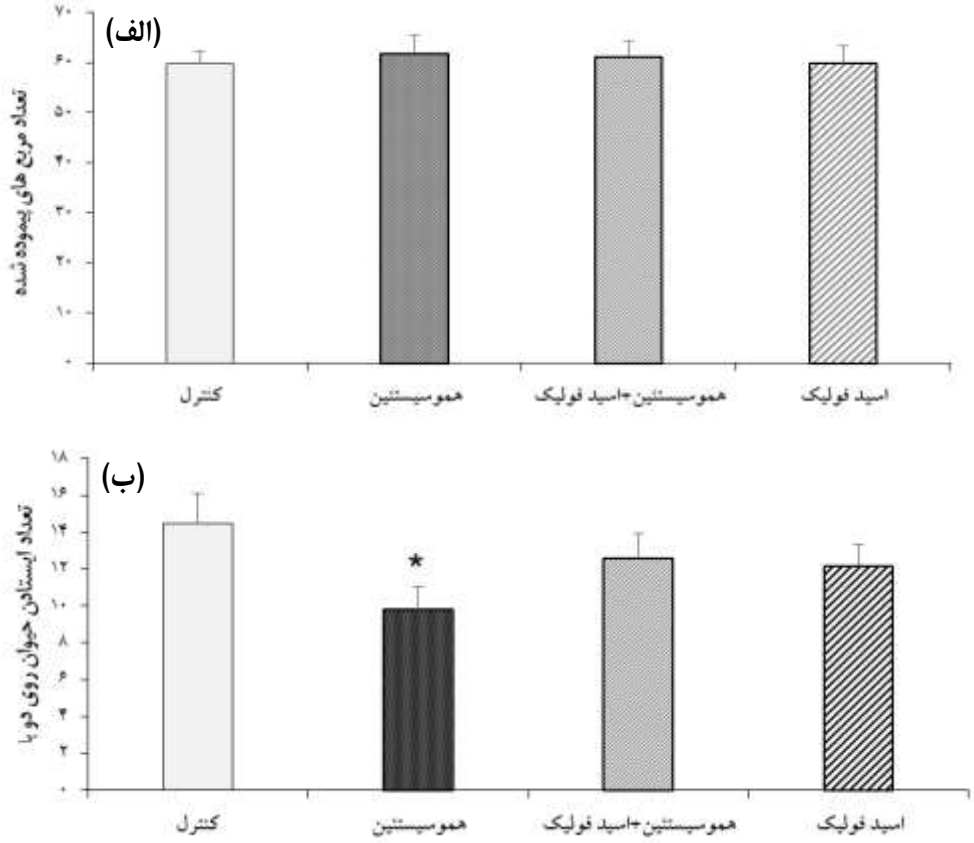
نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در پارامتر زمان سپری شده در بازوی باز (۱۴–۱۲ = n و ۹/۵ = ۴۸ و F_3، ۰/۰۰۰ = p) و بسته (۰/۰۰۰ = p، ۲۵/۵ = ۴۸ و F_3) وجود دارد (نمودار ۲). آزمون تکمیلی توکی نشان داد کاهش معنی‌داری در زمان سپری‌شده دربازوی باز در موش‌های تیمار شده با هموسیستئین نسبت به کنترل وجود دارد که نشان‌دهنده افزایش اضطراب در این گروه است ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین تجویز توام هموسیستئین و اسید فولیک به طور معنی‌داری مدت زمان سپری‌شده در بازوی باز را در گروه "هموسیستئین + اسید فولیک" نسبت به گروه هموسیستئین افزایش داد ($p < ۰/۰۵$). تجویز هموسیستئین سبب افزایش معناداری در زمان حضور در بازوهای بسته در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < ۰/۰۰۱$)، درحالی‌که تجویز اسید فولیک زمان حضور در بازوهای بسته را در موش‌های در معرض هموسیستئین کاهش معنی‌داری داد ($p < ۰/۰۵$). اسید فولیک به تنهایی اختلاف معنی‌داری از نظر مدت زمان حضور در بازوی بسته و بازوی باز با کنترل نداشت. مقایسه درصد زمان سپری‌شده در بازوی باز و بسته در نمودار (نمودار ۲ج) ملاحظه می‌شود. اختلاف معنی‌داری بین درصد مدت زمان سپری شده در بازوی باز نسبت به بازوی بسته در گروه هموسیستئین و گروه هموسیستئین + اسید فولیک وجود دارد (نمودار ۲ج).

جدول ۱– اثرات تجویز اسید فولیک بر غلظت هموسیستئین پلاسما

گروه	غلظت هموسیستئین پلاسما (میکرومول/لیتر)
کنترل	۱۱/۶ ± ۰/۲
هموسیستئین	۱۱۲ ± ۱۱/۵***
هموسیستئین + اسید فولیک	۸۸/۲ ± ۳/۵###
اسید فولیک	۱۲/۸ ± ۰/۹۹

داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند (n = ۴). ***$p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل و ###$p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه هموسیستئین.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]



نمودار ۱- تاثیر هموسیستئین و اسید فولیک بر رفتارهای جستجوگرایانه. الف- تجویز هموسیستئین تغییر معنی‌داری در تعداد مربع‌های پیموده‌شده در گروه‌های مختلف ایجاد نکرد. ب- پارامتر تعداد ایستادن بدنبال تجویز هموسیستئین کاهش معناداری را نسبت به کنترل یافت ($*p < ۰/۰۵$) . داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده اند (تعداد نمونه ۱۴-۱۲).

نتایج بافت شناسی

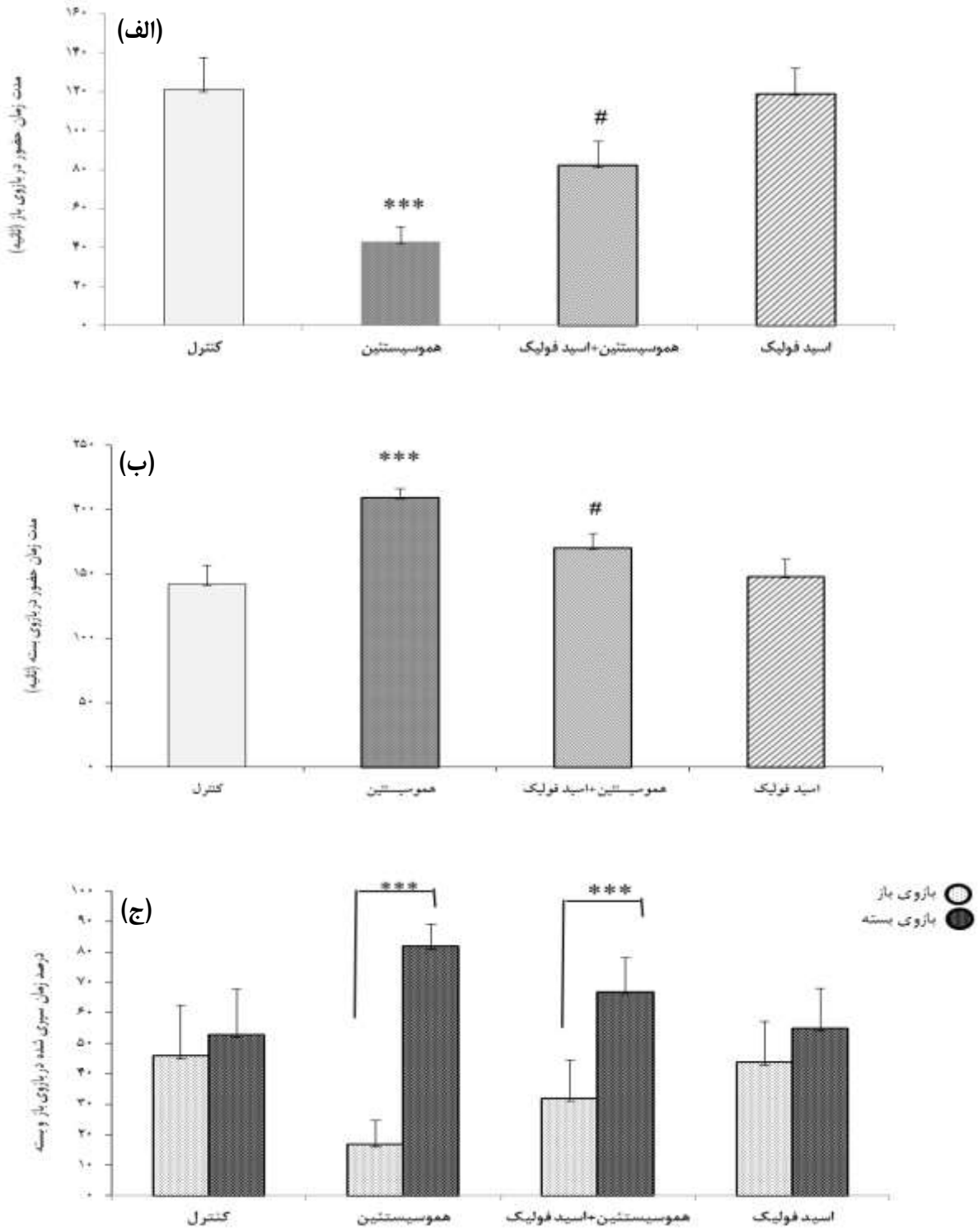
با توجه به شکل ۲، در گروه تیمار شده با هموسیستئین و "هموسیستئین + اسید فولیک" پراکندگی ظاهری بیشتری در سلول‌های ناحیه CA1 و CA3 نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. شمارش تعداد سلول‌های هیپوکمپ در ناحیه CA1 و CA3 اختلاف معنی‌داری در درصد تعداد سلول‌های هیپوکمپ نسبت به کنترل مشاهده نشد ($p = ۰/۹۷$ ، $F_{۳,۸} = ۰/۰۷۲$).

بحث

اضطراب یک اختلال عصبی شایع اما درمان‌پذیر است که یافتن علل ایجادکننده آن به دلیل درگیرکردن بسیاری از افراد مخصوصاً کودکان و نوجوانان ضرورت دارد. هدف این مطالعه بررسی اثرات هموسیستئین در ایجاد اختلالات شبه اضطرابی و یافتن اثرات آن بر هیپوکمپ در موش‌های نوزاد بود. یافته‌های ما نشان داد تجویز هموسیستئین سطح پلاسمایی آن را در بچه موش‌ها افزایش داد و اسیدفولیک به طور معنی‌داری موجب کاهش سطح هموسیستئین پلاسما شد. نتایج حاصل از تست رفتاری اوپن فیلد نشان داد که در گروه‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری از نظر تحرک، بین موش های تیمارشده با هموسیستئین و کنترل وجود نداشت اما این موش‌ها فعالیت جستجوگرایانه کمتری نسبت به کنترل داشتند. از آنجا که پارامتر تعداد ایستادن حیوان در واقع توجه موش را به محیط اطراف و کنجکاوی جهت شناخت محیط را نشان می‌دهد این نتیجه را شاید بتوان به کاهش تمرکز و توجه در موش‌های تحت تجویز هموسیستئین نسبت داد. در همین راستا، اونالاپو[11] و همکاران [۱۵] با تجویز مزمن ال-متیونین در رت‌های جوان، کاهش در فعالیت لوکوموتور و فعالیت جستجوگرایانه را گزارش کرده‌اند. از آنجاکه رژیم با متیونین

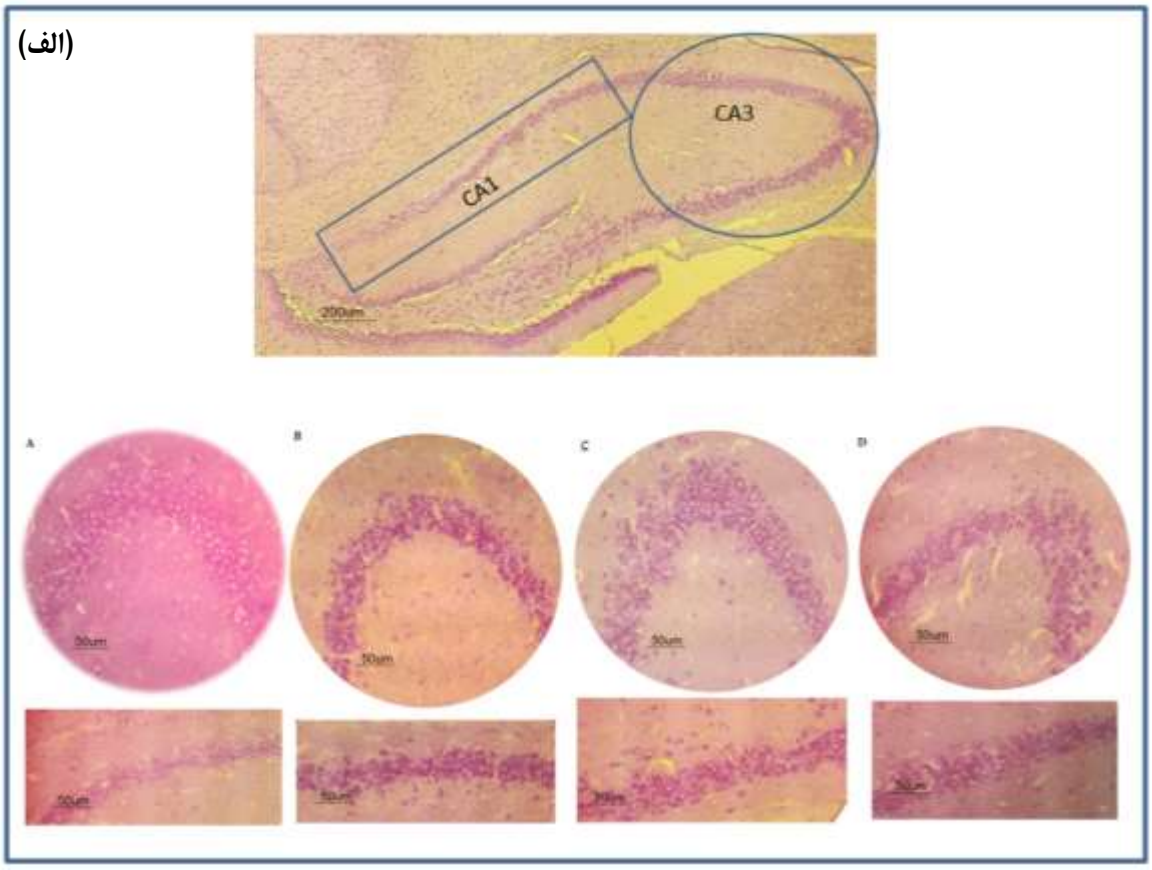
[11] Onaolapo

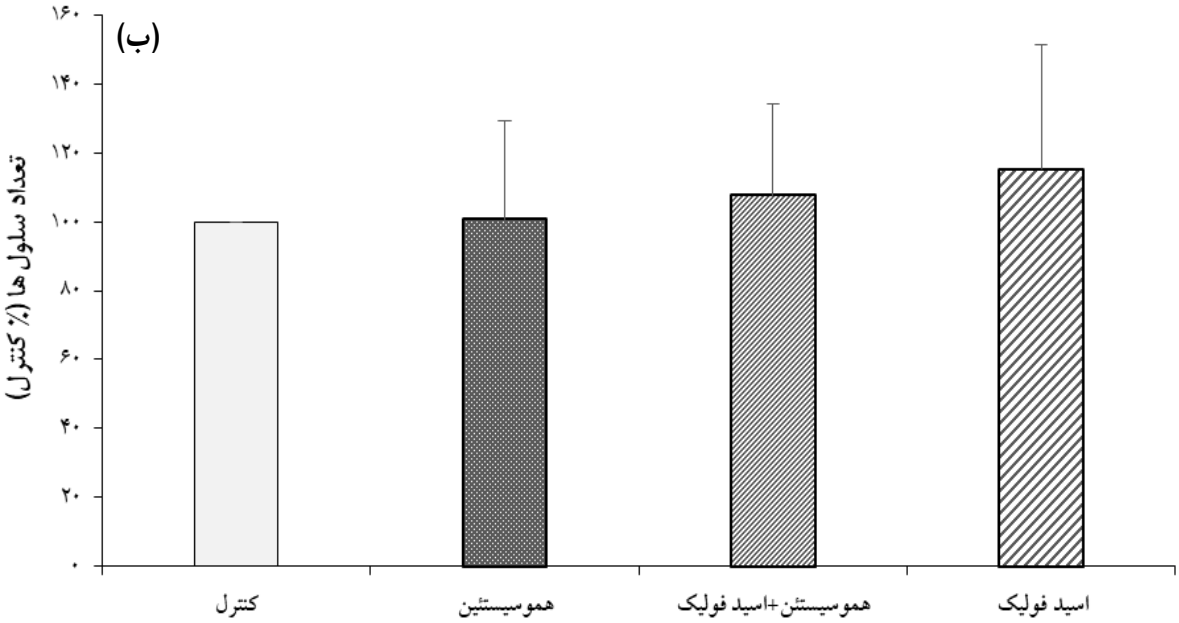
[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]



نمودار ۲- تاثیر هموسیستئن و اسیدفولیک بر رفتارهای شبه اضطراب. الف- هموسیستئین فاکتور مدت زمان حضور در بازوی باز را نسبت به کنترل کاهش معنادار داد ($p < ۰/۰۰۱^{***}$) و اسیدفولیک آن را بهبود بخشید ($p < ۰/۰۵^{\#}$). ب- هموسیستئین فاکتور مدت زمان حضور در بازوی بسته را افزایش معنادار داد ($p < ۰/۰۰۱^{***}$) و تجویز اسیدفولیک آن را بهبود بخشید ($p < ۰/۰۵^{\#}$). ج- مقایسه درصد زمان سپری شده در بازوی باز و بسته نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین درصد مدت زمان سپری شده در بازوی باز نسبت به بازوی بسته در گروه‌های هموسیستئین ($p < ۰/۰۰۱^{***}$) و "هموسیستئین + اسیدفولیک" ($p < ۰/۰۰۱^{***}$) است. داده‌ها به‌صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند (تعداد نمونه ۱۴-۱۲).

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]





شکل ۲- تاثیر هموسیستئن و اسیدفولیک بر تعداد سلول‌های هیپوکامپ. الف- نمای هیپوکمپ را در ناحیه CA3 و CA1 در چهار گروه مورد آزمایش نشان می‌دهد (A) ناحیه گروه کنترل، (B) گروه هموسیستئین، (C) گروه هموسیستئین + اسید فولیک، (D) گروه اسید فولیک. ب-نمودار نشان‌دهنده عدم وجود تغییرات معنادار در تعداد سلول‌های هیپوکامپ در ناحیه CA1 و CA3 در هر یک از گروه‌های مورد آزمایش نسبت به کنترل می‌باشد.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

اضافی موجب افزایش هموسیستئین پلاسما می‌شود این داده‌ها می‌تواند موید نتایج ما باشد.

یکی از مهمترین روش‌ها برای ارزیابی میزان اضطراب استفاده از ماز مرتفع بعلاوه است. نتایج حاصل از این تست نشان داد موش‌های تحت تیمار هموسیستئین زمان بیشتری را نسبت به موش‌های کنترل در بازوی بسته ماز سپری کرده‌اند و درصد زمان حضور در بازوی بسته به طور معنی‌داری بیشتر از کنترل بود که بیانگر افزایش اضطراب و استرس در این موش‌ها است. همچنین این مطالعه نشان داد اسید فولیک به طور معنی‌داری زمان سپری شده در بازوی بسته و درصد حضور در بازوی بسته را کاهش و زمان سپری شده در بازوی باز را افزایش داده است که بیانگر کاهش اضطراب در موش‌های تیمار شده با "هموسیستئین + اسید فولیک" است.

این یافته ها همراستا با مطالعات پیشین است که گزارش کرده اند تجویز حاد و مزمن متیونین منجر به افزایش اضطراب در موش‌های جوان شده است وکمبود ویتامین B با اثر سینرژیک رفتارهای اضطرابی را تشدید کرده است. از آنجا که فولات (اسید فولیک) به عنوان دهنده گروه متیل و ویتامین‌های گروه B به عنوان کوفاکتور در تبدیل هموسیستئین به متیونین به کمک آنزیم متیونین سنتاز ضروری‌اند [۱۵]. آسیب‌پذیری متابولیسم هموسیستئین در مغز قبلاً به دنبال افزایش بازجذب متیونین و کاهش میزان ویتامین‌های گروه B و فولات (B12, B9, B6) تاییدشده که منجر به افزایش سطح هموسیستئین سرم تا ۶-۵ برابر در موش شده است [۹]. بنابراین احتمال اثر هموسیستئین در تغییرات رفتاری ایجاد شده وجود دارد.

به‌هرحال در شکل‌گیری اختلالاتی چون افسردگی و اضطراب عوامل مختلف می‌تواند درگیر باشد. این احتمال وجود دارد که هموسیستئین با تغییر انتقال عصبی در اختلالات رفتاری دخیل باشد. هموسیستئین و ترکیبات مشتق آن به عنوان آگونیست گیرنده‌های گلوتامات عمل کرده و موجب افزایش فعالیت گیرنده‌های N-متیل دی آسپارتات[12] و متابوتروپیک می‌شوند که سهم عمده‌ای در نقاط مختلف مغز در تنظیم اعمال شناختی دارند. همچنین هموسیستئین آنتاگونیست نسبی گیرنده‌های گابا بوده که مهار آن‌ها موجب افزایش تحریک‌پذیری نورونی و اضطراب می‌شود [۱۶]. به علاوه در مطالعات متعددی به نقش احتمالی هموسیستئین در تنظیم عملکرد سایر نوروترانسمیترها از جمله استیل‌کولین، دوپامین و سروتونین و عملکرد چندگانه هموسیستئین در مغز اشاره شده که این می‌تواند احتمال ارتباط آن را با بیماری‌های ذهنی و اختلال رفتاری اضطراب توضیح دهد. بعلاوه مطالعات کلینیکی با استفاده از مکمل اسید فولیک ۵ میلی‌گرم در روز نشان داده‌اند که اسیدفولیک از طریق کاهش سطح هموسیستئین و همچنین تغییر در نوروترانسمیترهای مونوآمینی، اثرات مفید قابل ملاحظه‌ای در درمان افسردگی ناشی از استرس داشته است [۱۷]. با توجه به مکانیسم‌های مشترک درگیر در افسردگی و اضطراب این نتایج می‌تواند یافته‌های ما را مبنی بر اثرات مفید اسیدفولیک بر بهبود رفتارهای مرتبط با اضطراب را تایید کند.

یکی دیگر از عوامل بروز رفتارهای شبه‌اضطرابی ممکن است تحریک و یا تخریب قسمتی از مغز باشد که در ارتباط با این رفتارها هستند. مطالعات پیشین به اهمیت هیپوکمپ در ایجاد اضطراب اشاره کرده‌اند. استفاده از آنتاگونیست رسپتورهای N-متیل‌دی‌آسپارتات در هیپوکمپ پشتی نقش مهمی در کاهش اضطراب داشته است [۱۸]. بنابراین آسیب به هیپوکمپ می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی ایجاد اضطراب توسط هموسیستئین باشد.

قبلاً مطالعه کشت سلول‌های هیپوکمپ نشان داده است که در شرایط آزمایشگاه این سلول‌ها به هموسیستئین حساسند و به دنبال در معرض قرارگیری با هموسیستئین آپوپتوز، شکسته‌شدن رشته های DNA و نقص عملکردی میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و فعالیت کاسپازها رخ می‌دهد [۱۹]. به علاوه مطالعه قبلی ما نشان داد که در مخچه موش‌های تیمارشده با هموسیستئین استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی به واسطه آپوپتوز القا شده و تعداد سلول‌های پورکنژ کاهش یافته است [۱۴]. لذا مطالعات بافت‌شناسی جهت بررسی اثرات هموسیستئین بر نورون‌های هیپوکمپ انجام شد که در نتایج حاصل از مطالعه ما، اختلاف معنی‌داری در تعداد سلول‌ها بین گروه تیمار شده با هموسیستئین و گروه کنترل مشاهده نشد.

هر چند این نتایج مغایر با برخی از یافته‌های قبلی است اما در توافق با مطالعه هرنسی[13] و همکاران است که نشان داد در

[12] NMDA

[13] Hrnci

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

موش‌های با رژیم غذایی غنی از متیونین گرچه اضطراب القا شده است اما بخش‌های مختلف مغز آسیب‌پذیری متفاوتی نسبت به افزایش هموسیستئین پلاسما نشان داشتند. قشر مغز و هسته‌های دمدار حساسیت بالایی به آسیب اکسیداتیو ناشی از هموسیستئین نشان دادند که این حساسیت در هیپوکمپ و تالاموس کمتر مشاهده شد. بخشی از کاهش آسیب‌پذیری این نواحی احتمالاً به دلیل پاسخ سازشی یا حفاظتی بیشتر در مقابل سمیت ایجاد شده توسط هموسیستئین و کاهش اثرات تخریبی آن می‌باشد. در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله کاتالاز و گلوتاتیون در هیپوکمپ افزایش یافته است که سد دفاعی بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو میباشند [۱].

از طرفی با پیشرفت تکنیک‌های شمارش سلولی در مدل‌های حیوانی استرس مزمن که معمولاً همراه با درجات مختلف اضطراب است کمتر تغییرات کلی در تعداد سلول‌های هیپوکمپ گزارش شده است. همچنین در مطالعات مغز انسان در بیماران با اختلال افسردگی نیز از دست رفتن تعداد سلول‌ها مشاهده نشده است. این درحالی است که نقاط شاخه‌زنی دندریتی و طول کلی دندریت‌های راسی در ناحیه CA1 و CA3 در شرایط استرس مزمن تغییر می‌کند و ممکن است به تغییرات رفتاری نسبت داده شود [۲۰].

نتیجه‌گیری

دراین بررسی هایپرهموسیستئینمیا رفتارهای اضطرابی را در موش‌ها القا نمود و تجویز اسید فولیک اثرات محافظتی در برابر اضطراب داشت. تعداد سلول‌ها در هیپوکمپ تحت تاثیر هموسیستئین قرار نگرفت لذا دستیابی به مکانیسم های اثر هموسیستئین نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری و حمایت‌های مالی دانشگاه دامغان در فرآیند انجام این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه دامغان انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ح.ک: انجام آزمایش و نوشتن مقاله؛ ا.گ: طراحی تحقیق و تحلیل نتایج.

فهرست منابع

[1] Hrncic D, Mikic J, Rasic-Markovi A, Velimirovic M, Stojkovic T, Obrenovic R, Rankov-Petrovic B, Šušic V, Djuric D, Petronijevic N, Stanojlovic O, Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brainoxidative stress. ***Can J Physiol Pharmacol*** 94 (2016) 1074-1082.

[2] Chung K, Chiou H, Chen Y, Associations between serum homocysteine levels and anxiety and depression among children andadolescents in Taiwan. ***Sci Rep*** 7 (2017) 1-7.

[3] Kaplan HI, Sadock BJ, Synopsis of psychiatry behavioral sciences. Translated by: Rezaei F, 10th ed. Tehran: Arjmand Publication, 2007: 60-150.

[4] Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM, Folate, vitamin B12, homocysteine and the MTHFR 677C¡T polymorphism in anxiety and depression. The Hordaland Homocysteine Study. ***Arch Gen Psychiatry*** 60 (2003) 618–626.

[5] Pitsavos C, Panagiotakos D, Papageorgiou C, Tsetsekou E, Soldatos C, Stefanadis C, Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: The ATTICA Study. ***Atherosclerosis*** 185 (2006) 320–326.

[6] Baydas G, Reiter R, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S, Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro-and anti-apoptotic protein levels. ***Neuroscience*** 135 (2005) 879-886.

[7] Bertoglio LJ, Carobrez AP, Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. ***Psychopharmacology*** 170 (2003) 335-342.

[8] Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN, Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. ***FASEB J*** 10 (1996) 1532-1538.

[9] Mijailovic N, Selakovic D, Joksimovic J, Mihailovic V, Katanic J, Jakovljevic V, Nikolic T, Bolevich S, Zivkovic V, Pantic M, Rosic G, The anxiolytic effects

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

of atorvastatin and simvastatin on dietaryinduced increase in homocysteine levels in rats. ***Mol Cell Biochem*** 452 (2019) 199-217.

[10] Jacobsen DW, Hyperhomocysteinemia and oxidative stress time for a reality check. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol*** 20 (2000) 1182-1184.

[11] Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST, Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. ***J Pineal Res*** 37 (2004) 55-70.

[12] Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Protective effect of folic acid. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats. ***Neurochem Int*** 13 (2009) 54-57.

[13] Scherer EB, Cunha AA, Kolling J, Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT, Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. ***Int J Dev Neurosci*** 29 (2011) 693-699.

[14] Koohpeyma H, Goudarzi I, Salmani ME, Lashkarbolouki T, Shabani M, Administration of homocysteine induces cerebellar damage in rats: protective effect of folic acid. ***Neurotox Res*** 35 (2019) 724-738.

[15] Onaolapo AY, Onaolapo OJ, Blessing IC, Hameed SA, Raimot R, Low-dose L-methionine-associated changes in behavioural indices in young rats. ***Int J Neurosci Behav Sci*** 4 (2016) 11-19.

[16] Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, Frydecka D, Misiak B, Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders—focus on cognition. ***Front Behav Neurosci*** 10 (2014) 338-343.

[17] Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G, Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. ***West Afr J Med*** 47 (2001) 1102-1104.

[18] Lesage A, Steckler T, Metabotropic glutamate mGlu1 receptor stimulation and blockade: therapeutic opportunities in psychiatric illness. ***Eur J Pharmacol*** 639 (2010) 2-16.

[19] Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP, Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. ***J Neurosci*** 20 (2000) 6920–6926.

[20] Conrad CD, Ortiz JB, Judd JM, Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: methodological and functional considerations. ***Physiol behav*** 178 (2017) 66-81.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

Research paper

Postnatal homocysteine administration induces anxiety-like behavior in rats: protective effects of folic acid

Hakimeh Koohpeyma, Iran Goudarzi*

School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

Received: 12 May 2020 Accepted: 25 August 2020

Abstract

Background and aims: Anxiety is a prevalent neuropsychiatric disorder caused by excitation or destruction of various areas of the brain, including the hippocampus. Homocysteine (Hcy) has recently been identified as a potentially excitatory amino acid and a risk factor for central nervous system disorders. Therefore, this study was designed to investigate the effects of homocysteine administration on anxiety-like behavior in rats. Also, we aimed to investigate the possible protective role of folic acid administration as a potent antioxidant on alterations elicited by hyperhomocysteinemia in the hippocampus.

Methods: The rat pups were divided randomly into four groups. Group I received normal saline, group II received Hcy subcutaneously twice a day at 8-h intervals (0.3- 0.6 µmol/g body weight), group III received Hcy + folic acid (0.011 µmol/g body weight) and group IV received folic acid on postnatal day (PD) 4 until 25. On the 26th day, anxiety and exploratory behavior of animals was examined using the open field and elevated plus maze tests, respectively. Also, histological study was performed.

Results: Hcy administration increased the plasma total Hcy level. Folic acid significantly reduced plasma Hcy level. Hcy induced anxiety-like behavior. The number of rearing significantly reduced following Hcy administration ($p < 0.05$). The percentage of time spent in the open arms of the elevated plus maze significantly reduced and percentage of time spent in the closed arms increased following Hcy exposure in the rats ($p < 0.001$) as the control group. Folic acid treatment significantly elevated the percentage of time spent in the open arms and reduced the percentage of time spent in the closed arms in Hcy + Folic acid exposure rats as Hcy rats ($p < 0.05$). Histological study indicated that there was no significant change in number of hippocampal cells among groups.

Conclusion: Hcy can induce anxiety-like behavior and folic acid has protective effect against Hcy- induced anxiety.

Keywords: Folic acid, Anxiety, Rat, Homocysteine, Hippocampus

Please cite this article as follows:

Koohpeyma H, Goudarzi I, Postnatal homocysteine administration induces anxiety-like behavior in rats: protective effects of folic acid. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 3 (2019) 235-245.

*Corresponding author: irangoudarzi@du.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-6665-3202)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]