

مقاله پژوهشی

تجویز هموسیستین در دوره پس از تولد رفتارهای شبه اضطراب القا می کند: اثر محافظتی اسید فولیک

حکیمه کوهیما، ایران گودرزی*

دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

پذیرش: ۴ مرداد ۱۳۹۹

دریافت: ۱۸ اردیبهشت ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف: اضطراب اختلال شایع عصبی است که بر اثر تحریک و یا تخریب نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکمپ بروز می کند. هموسیستین 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 هموسیستین بر رفتارهای شبه اضطرابی طراحی گردید. همچنین ما احتمال نقش محافظتی اسید فولیک را به عنوان آنتی اکسیدانت بالقوه در مقابل اثرات ناشی از هاپیرهموسیستینمیا در هیپوکمپ بررسی نمودیم.

روش ها: موش های نوزاد به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول نرمال سالین، گروه دوم هموسیستین را به صورت زیر جلدی روزانه دو بار به فاصله ۸ ساعت (۰/۳-۰/۶ میکرومول بر گرم وزن موش) دریافت کردند. گروه سوم هموسیستین + اسید فولیک (میکرومول ۰/۱۱) و گروه چهارم اسید فولیک را از روز ۴-۲۵ پس از تولد دریافت کردند. در روز ۲۶م فعالیت جستجوگرانه و اضطراب با استفاده از اوپن فیلد و ماز بعلاوه شکل مرتفع به ترتیب ارزیابی شد. سپس مطالعه بافتی صورت گرفت.

یافته ها: تجویز هموسیستین میزان هموسیستین کل را در پلاسما افزایش داد. اسید فولیک میزان هموسیستین پلاسما را بطور معناداری کاهش داد. هموسیستین رفتار شبه اضطراب را القا نمود. تعداد ایستادن حیوان به طور معنی داری به دنبال تجویز هموسیستین نسبت به کنترل کاهش یافت ($p < 0/05$). درصد مدت زمان سپری شده در بازوهای باز ماز بعلاوه شکل مرتفع بطور معناداری کاهش و درصد مدت زمان حضور در بازوهای بسته در موش های در معرض هموسیستین نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($p < 0/01$). تیمار اسیدفولیک درصد زمان حضور در بازوهای باز را افزایش و درصد زمان حضور در بازوهای بسته را در گروه "هموسیستین + اسید فولیک" نسبت به موش های گروه هموسیستین کاهش معنادار داد ($p < 0/05$). بررسی بافت شناسی نشان داد که تغییر معناداری در تعداد سلول های هیپوکامپ بین گروه ها وجود ندارد.

نتیجه گیری: افزایش سطح هموسیستین پلاسما در دوران پس از تولد رفتارهای شبه اضطراب القا می نماید. اسید فولیک اثر محافظتی در برابر اضطراب ناشی از هموسیستین دارد.

واژه های کلیدی: اسید فولیک، اضطراب، موش صحرایی، هموسیستین، هیپوکمپ

مقدمه

اضطراب احساس ناخوشایند عصبانیت، تنش، نگرانی است که همراه با فعالیت سیستم عصبی اتونومیک تعریف می شود. مطالعات آماری نشان می دهد که وابسته به سن و روش های بررسی ۱/۸ جمعیت دنیا از طیف های مختلفی از اختلالات اضطرابی رنج می برند [۱]. اضطراب معمولاً همراه با افسردگی بخش مهمی از اختلالات روان شناختی را مخصوصاً در زمان طفولیت و کودکی تشکیل می دهند که در نهایت منجر به نتایج

منفی و نواقص عملکردی می گردند [۲].

مطالعات نشان داده اند که تحریک و یا تخریب بخش های مختلف سیستم لیمبیک از جمله قشر پیشانی و هیپوکمپ در نخستنی ها، در ایجاد اضطراب دخالت دارند [۳]، بنابراین شناسایی و کنترل عوامل محرک این سیستم می تواند کمک شایانی به درمان اضطراب کند. هموسیستین اخیراً به عنوان یک عامل تحریکی بالقوه

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 آزاد شدن 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 در آسیب، نورودژنراسیون و بیماری‌های وابسته به استرس از جمله افسردگی و اضطراب نقش داشته باشد القای استرس اکسیداتیو می‌باشد. از طرف دیگر اگر افزایش هموسیستئین نوروکسین 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 تجویز اسید فولیک بر تغییرات رفتاری و بافتی مدل هایپرهموسیستئینمیا را مطالعه نماییم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، از موش‌های صحرایی نر ۴ روزه نژاد ویستار استفاده شد. کلیه حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 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. در تمامی 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 حل شدن 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،

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^۱ هیچ ارتباطی بین هموسیستئین و اضطراب نشان نداد [۴]، مطالعه بالینی پیتساوس^۲ 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 آسیب‌های اکسیداتیو و سمیت نورونی در شرایط آزمایشگاه^۳ و محیط زنده^۴ به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد [۶].

بنابراین باتوجه‌به اینکه گزارشی وجود دارد که تحریک شدید سلول‌های هیپوکمپ در اختلالات اضطرابی نقش دارد و سیستم گلوتاماترژیک اصلی‌ترین سیستم دخیل در هیپوکمپ بوده و بیشتر نورون‌های موجود در هیپوکمپ 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 اکسیداتیو^{۸، ۹} است.

هموسیستئین با اتواکسیداسیون، پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون پروتئین‌ها تولید گونه‌های اکسیژن و نیتروژن

¹ Hordaland

² Pitsavos

³ In vitro

⁴ In vivo

سپس درصد زمان حضور در بازوهای باز و بسته محاسبه گردید. درصد زمان حضور در بازوی باز به صورت 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 قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است. این ماز برای سنجش رفتار اضطرابی حیوان مورد استفاده قرار می گیرد [۲].

مطالعه بافتی

پس از انجام آزمایشات رفتاری در روز ۲۶ پس از تولد، تعدادی از موش‌ها در همه‌ی گروه‌های مورد آزمایش با کتامین و زایلین بیهوش گردیده و پس از پرفیوژن کردن، مغز موش‌ها در ماده فیکس کننده فرمالین تثبیت گردید. در ادامه، پس از طی مراحل پردازش بافتی مثل آگیری 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 و بوله برای رنگ‌آمیزی استفاده گردید. از هر گروه ۳ مغز و از هر مغز ۳ برش شمارش شد. شمارش با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی $\times 40$ و به کمک گرید در ابعاد ۲۵۰ میکرون انجام شد.

تجزیه و آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین $\pm$ میانگین خطای استاندارد ارائه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها 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^{۱۰} برای مشخص کردن سطح معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد. حداقل تفاوت معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر 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

هموسیستئین + اسیدفولیک و اسیدفولیک می‌باشد. گروه کنترل نرمال سالیان را به صورت تزریق زیر پوستی، روزی دو بار و با فاصله ۸ ساعت دریافت کردند. به موش‌های گروه دوم روزانه دو بار و با فاصله ۸ ساعت با دوز هفته اول ۰/۳، هفته دوم ۰/۴ و هفته آخر ۰/۶ میکرو مول بر گرم وزن هموسیستئین تجویز شد [۱۳]. در گروه سوم همزمان با هموسیستئین اسید فولیک ($0.11 \mu\text{mole}$) روزانه یکبار به صورت درون صفاقی 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^۵

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^۶ که به ۱۶ مربع با اندازه‌های مساوی تقسیم شده قرار داده شد و پارامترهای کراسینگ^۷ یعنی تعداد مربع‌هایی که حیوان از آن عبور می‌کند و تعداد دفعاتی که موش روی دو پای خود می‌ایستد^۸ ارزیابی شد [۱۴].

آزمون ماز بعلاوه مرتفع^۹

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 قرار داده 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.

⁵ Open field

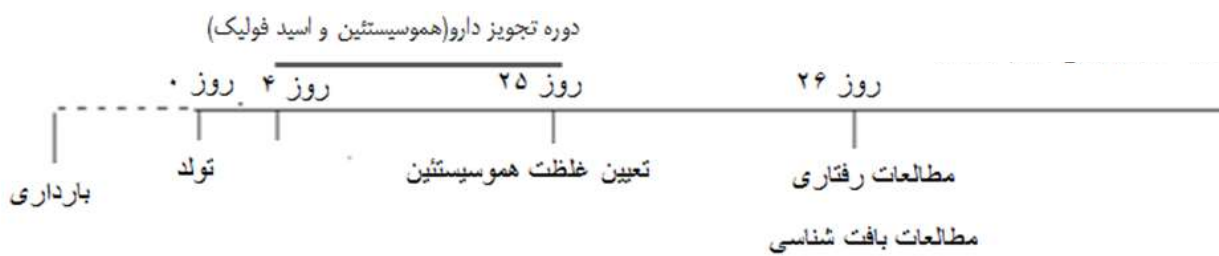
⁶ Plexiglass

⁷ Crossing

⁸ Rearing

⁹ Elevated plus maze

¹⁰ Tukey post hoc



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 ($p < 0.001$). تجویز اسید فولیک یک ساعت قبل از هموسیستئین به صورت داخل صفاقی غلظت هموسیستئین پلاسما را در گروه "هموسیستئین + اسید فولیک" به طور معناداری کاهش داد ($p < 0.001$).

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 ($n = 12-14$ و $p = 0.88$ و $F_{3,49} = 0.218$) (نمودار ۱الف). تفاوت معنی‌داری در پارامتر تعداد ایستادن بین گروه‌ها مشاهده گردید ($n = 12-14$ و $p = 0.015$ و $F_{3,49} = 3.8$). آزمون تکمیلی توکی نشان داد که تجویز هموسیستئین تعداد ایستادن حیوانات گروه هموسیستئین را نسبت به گروه کنترل کاهش داد که بیانگر افزایش اضطراب و کاهش فعالیت جستجوگرانه 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

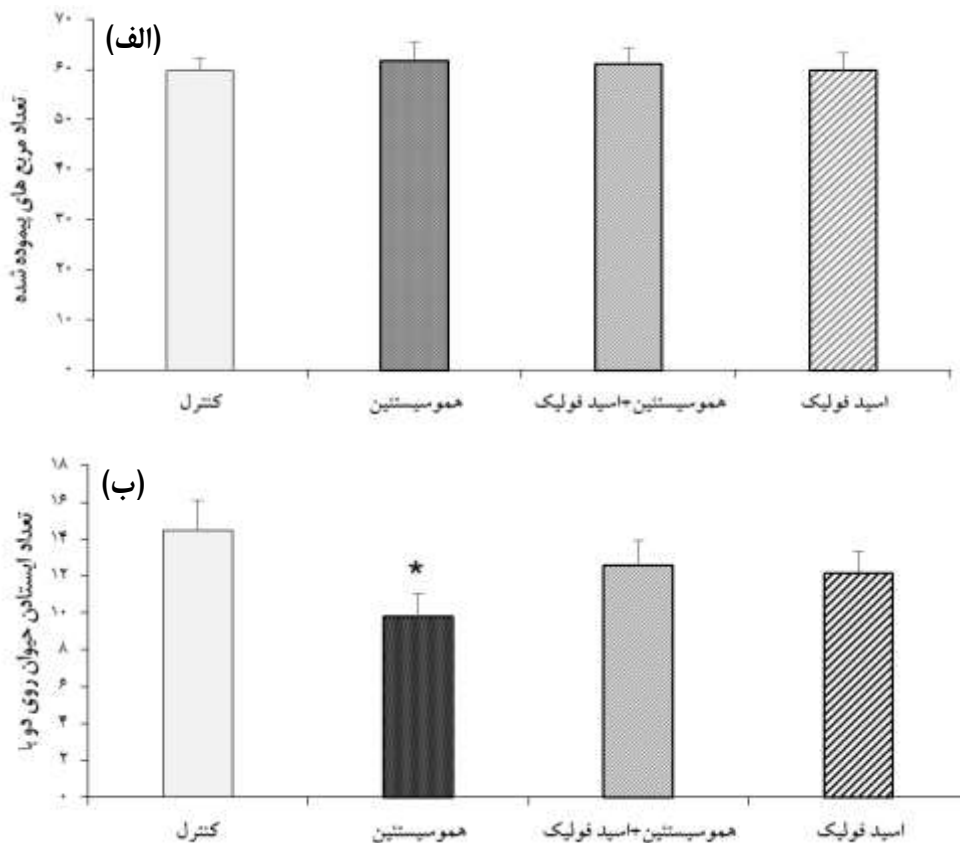
نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در پارامتر زمان سپری شده در بازوی باز ($n = 12-14$ و $p = 0.000$ و $F_{3,48} = 9.5$) و بسته ($n = 12-14$ و $p = 0.000$ و $F_{3,48} = 25.5$) وجود دارد (نمودار ۲). آزمون تکمیلی توکی نشان داد کاهش معنی‌داری در

زمان سپری شده در بازوی باز در موش‌های تیمار شده با هموسیستئین نسبت به کنترل وجود دارد که نشان‌دهنده افزایش اضطراب در این گروه است ($p < 0.001$). همچنین تجویز توام هموسیستئین و اسید فولیک به طور معنی‌داری مدت زمان سپری شده در بازوی باز را در گروه "هموسیستئین + اسید فولیک" نسبت به گروه هموسیستئین افزایش داد ($p < 0.005$). تجویز هموسیستئین سبب افزایش معناداری در زمان حضور در بازوهای بسته در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0.001$), درحالی‌که تجویز اسید فولیک زمان حضور در بازوهای بسته را در موش‌های در معرض هموسیستئین کاهش معنی‌داری داد ($p < 0.005$). اسید فولیک به تنهایی اختلاف معنی‌داری از نظر مدت زمان حضور در بازوی بسته و بازوی باز با کنترل نداشت. مقایسه درصد زمان سپری شده در بازوی باز 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	11.6 ± 0.2
هموسیستئین	$11.2 \pm 11.5^{***}$
هموسیستئین + اسید فولیک	$8.2 \pm 3.5^{###}$
اسید فولیک	12.8 ± 0.99

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند ($n = 4$). $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه هموسیستئین.



نمودار ۱- تاثیر هموسیستئین و اسید فولیک بر رفتارهای جستجوگرانه. الف- تجویز هموسیستئین تغییر معنی داری در تعداد مربع های پیموده شده در گروه های مختلف ایجاد نکرد. ب- پارامتر تعداد ایستادن بدنبال تجویز هموسیستئین کاهش معناداری را نسبت به کنترل یافت ($p < 0.05$). داده ها به صورت میانگین $\pm$ میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده اند (تعداد نمونه ۱۴-۱۲).

نتایج بافت شناسی

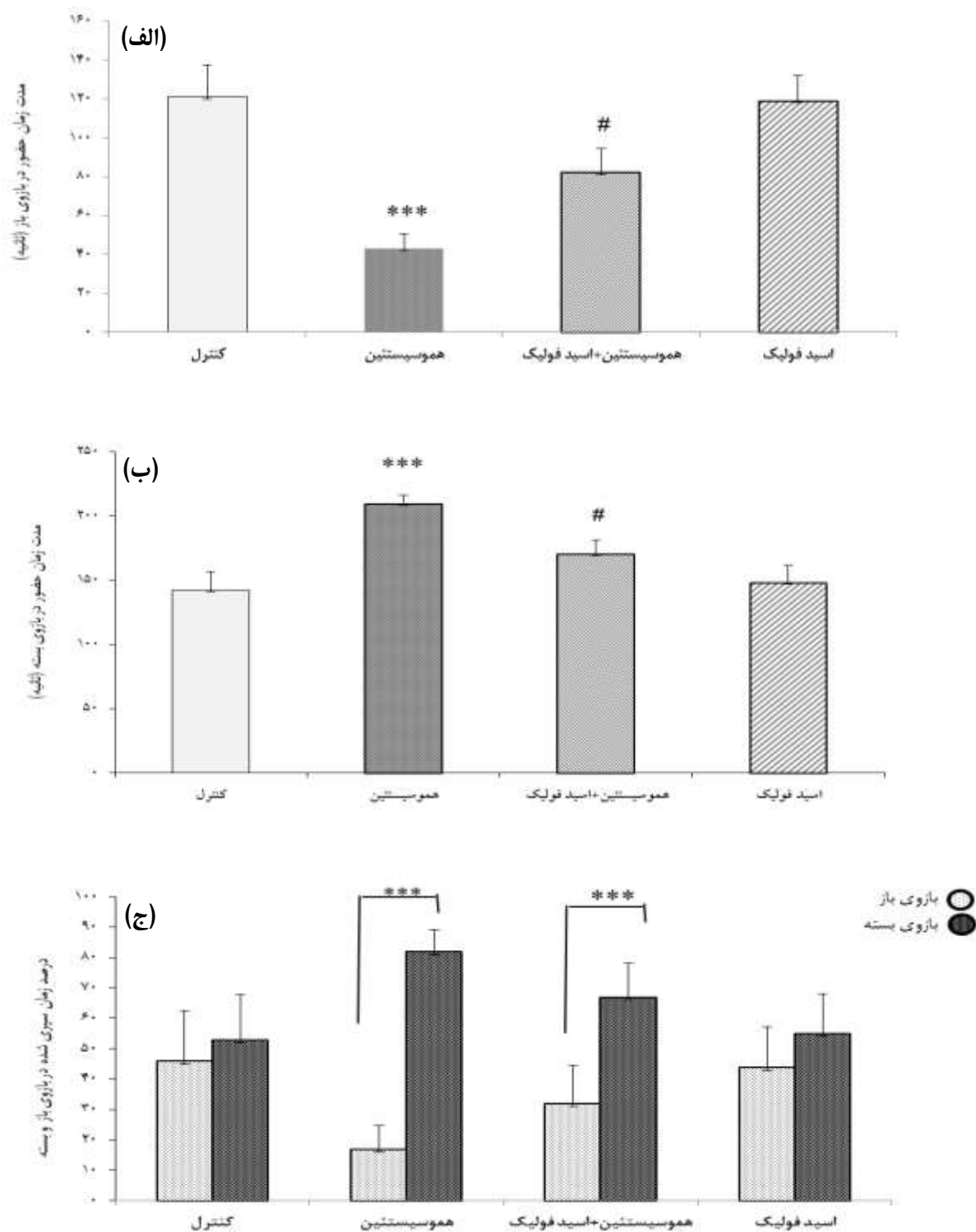
با توجه به شکل ۲، در گروه تیمار شده با هموسیستئین و "هموسیستئین + اسید فولیک" پراکندگی ظاهری بیشتری در سلول های ناحیه CA1 و CA3 نسبت به گروه کنترل مشاهده می شود. شمارش تعداد سلول های هیپوکمپ در ناحیه CA1 و CA3 اختلاف معنی داری در درصد تعداد سلول های هیپوکمپ نسبت به کنترل مشاهده نشد ($F_{3,8} = 0.072$, $p = 0.97$).

بحث

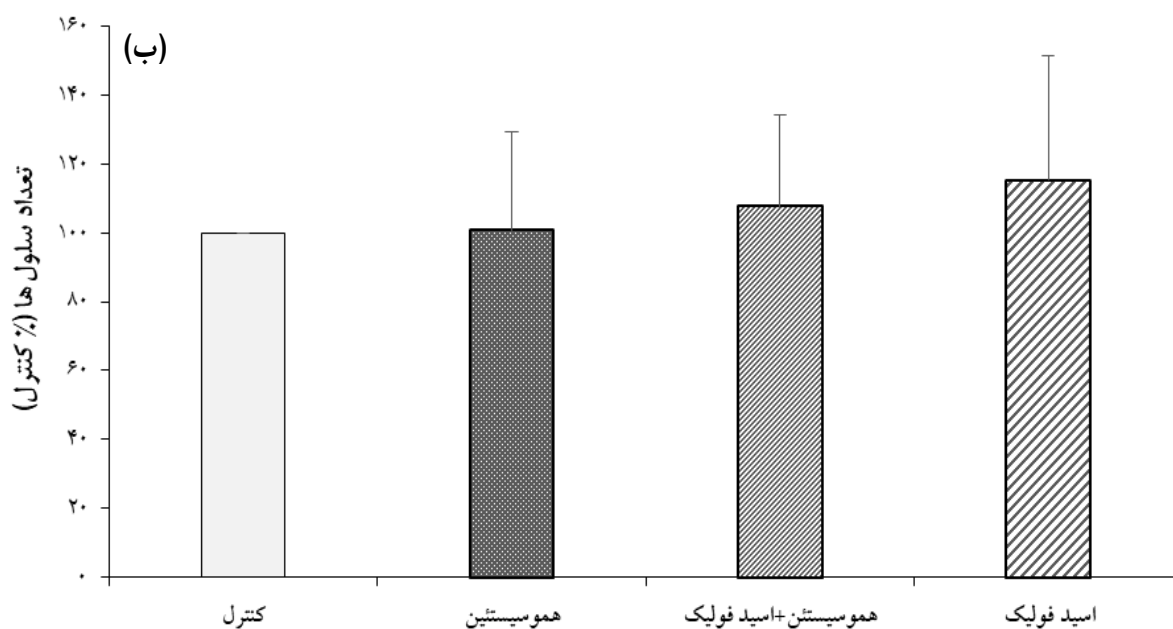
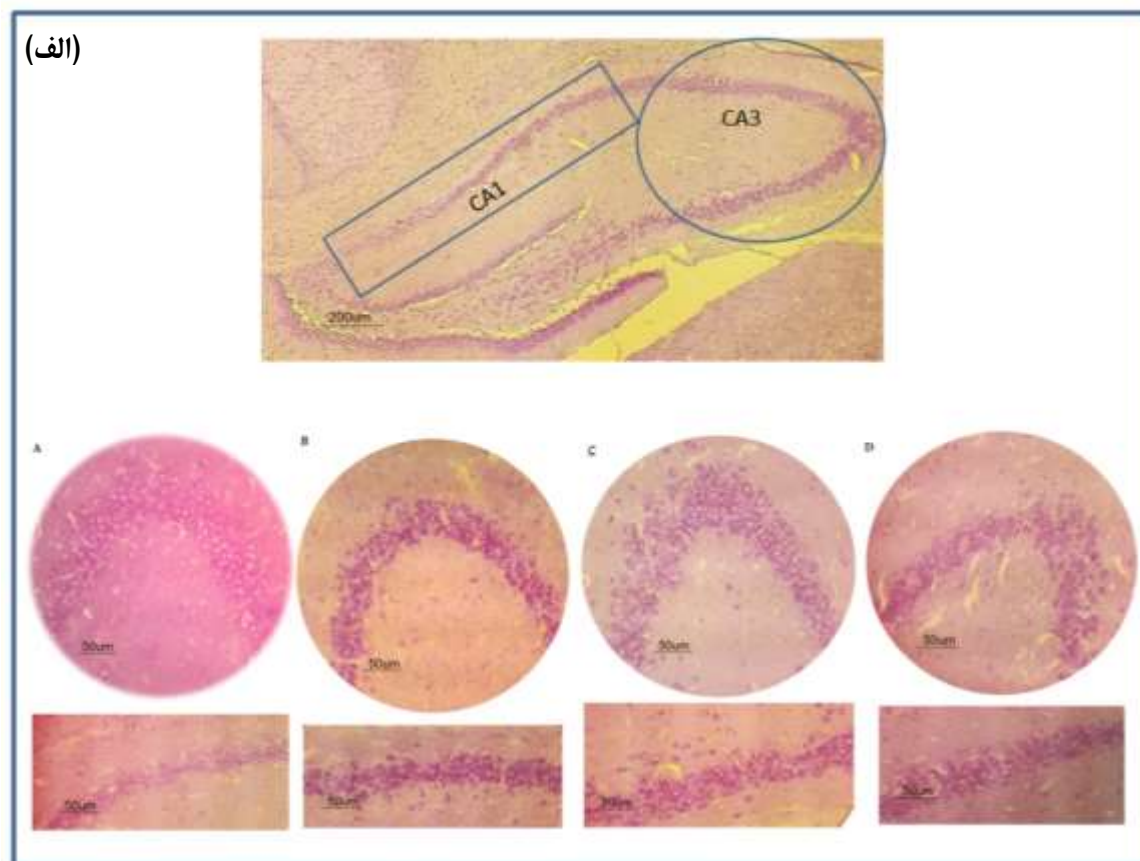
اضطراب یک اختلال عصبی شایع اما درمان پذیر است که یافتن علل ایجادکننده آن به دلیل درگیرکردن بسیاری از افراد مخصوصاً کودکان و نوجوانان ضرورت دارد. هدف این مطالعه بررسی اثرات هموسیستئین در ایجاد اختلالات شبه اضطرابی و یافتن اثرات آن بر هیپوکمپ در موش های نوزاد بود. یافته های ما نشان داد تجویز هموسیستئین سطح پلاسمایی آن را در بچه

موش ها افزایش داد و اسیدفولیک به طور معنی داری موجب کاهش سطح هموسیستئین پلاسما شد. نتایج حاصل از تست رفتاری اوپن فیلد نشان داد که در گروه های مورد آزمایش اختلاف معنی داری از نظر تحرک، بین موش های تیمار شده با هموسیستئین و کنترل وجود نداشت اما این موش ها فعالیت جستجوگرانه 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 می دهد این نتیجه را شاید بتوان به کاهش تمرکز و توجه در موش های تحت تجویز هموسیستئین نسبت داد. در همین راستا، اونالاپو^{۱۱} و همکاران [۱۵] با تجویز مزمن ال-متیونین در رت های جوان، کاهش در فعالیت لوکوموتور و فعالیت جستجوگرانه را گزارش کرده اند. از آنجا که رژیم با متیونین

¹¹ Onalapo



نمودار ۲- تاثیر هموسیستئین و اسیدفولیک بر رفتارهای شبه اضطراب. الف- هموسیستئین فاکتور مدت زمان حضور در بازوی باز را نسبت به کنترل کاهش معنادار داد ($p < 0.001$) و اسیدفولیک آن را بهبود بخشید ($p < 0.05$). ب- هموسیستئین فاکتور مدت زمان حضور در بازوی بسته را افزایش معنادار داد ($p < 0.001$) و تجویز اسیدفولیک آن را بهبود بخشید ($p < 0.05$). 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 ($p < 0.001$) و "هموسیستئین + اسیدفولیک" ($p < 0.001$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند (تعداد نمونه ۱۲-۱۴).



شکل ۲- تاثیر هموسیستئین و اسیدفولیک بر تعداد سلول های هیپوکامپ. الف- نمای هیپوکامپ را در ناحیه CA1 و CA3 در چهار گروه مورد آزمایش نشان می دهد (A) ناحیه گروه کنترل، (B) گروه هموسیستئین، (C) گروه هموسیستئین + اسید فولیک، (D) گروه اسید فولیک. ب- نمودار نشان دهنده عدم وجود تغییرات معنادار در تعداد سلول های هیپوکامپ در ناحیه CA1 و CA3 در هر یک از گروه های مورد آزمایش نسبت به کنترل می باشد.

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 یافته‌ها همراستا با مطالعات پیشین است که گزارش کرده‌اند تجویز حاد و مزمن متیونین منجر به افزایش اضطراب در موش‌های جوان شده است و کمبود 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) تایید شده که منجر به افزایش سطح هموسیستئین سرم تا ۵-۶ برابر در موش شده است [۹]. بنابراین احتمال اثر هموسیستئین در تغییرات رفتاری ایجاد شده وجود دارد.

به‌رحال 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 دی‌آسپاراتات^{۱۲} 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 استیل کولین، دوپامین و سروتونین و عملکرد چنگانه 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 مونوآمین، 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-متیل دی‌آسپاراتات در هیپوکمپ پستی 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 رشته‌های DNA و نقص عملکردی میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و فعالیت کاسپازها رخ می‌دهد [۱۹]. به علاوه مطالعه قبلی ما نشان داد که در مخچه موش‌های تیمار شده 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^{۱۳} و همکاران است که نشان داد در

¹³ Hrnai

¹² NMDA

نتیجه گیری

در این 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 مکانیسم‌های 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] Hrnčić D, Mikic J, Rasic-Marković A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, Rankov-Petrović B, Šušić V, Djurić D, Petronijević N, Stanojlović O, Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative 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 and adolescents 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.

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 گلوکاتیون 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].

- [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

- of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced 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.

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 $\mu\text{mol/g}$ body weight), group III received Hcy + folic acid (0.011 $\mu\text{mol/g}$ 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)