دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم- شماره ۱۰۳
اسفند ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۹/۲۰
آخرین اصلاح‌ها:۹۱/۱۲/۱۳
پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۱

مصرف بالای کمپلکس ویتامین‌های ب شدت پارکینسونیسم القاء شده توسط سم ۶-هیدروکسی دپامین در موش صحرایی را کاهش می‌دهد

محمدحسین اسماعیلی، نگین فریدونی، محمد صوفی آبادی، محمد ساروخانی، هاشم حقدوست یزدی*

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

نویسنده مسئول: هاشم حقدوست یزدی **E-mail:hhaghdoost@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: برخی مطالعات نشان می دهند که افزایش سطح هموسیستئین پلاسما در ایجاد و یا تشدید بیماری پارکینسون نقش دارد. ویتامین های ب در گیر در متابولیسم هموسیستئین بوده و سطح هموسیستئین پلاسما را کنترل می نمایند. در این مطالعه اثر افزودنی ویتامین های ب بر پارکینسونیسم القاء شده توسط سم ۶- هیدروکسی دپامین (6-OHDA) در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: موش‌ها یک ماه قبل از جراحی تا پایان ازمایش ها آب آشامیدنی حاوی ویتامین های ب دریافت نمودند. 6-OHDA توسط جراحی استرئوتاکسیک به ناحیه استریاتوم مغز تزریق گردید. ایجاد و شدت پارکینسونیسم توسط سه آزمون رفتاری متداول مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح هموسیستئین سرم قبل از جراحی و پس از اتمام آزمون‌های رفتاری اندازه گیری گردید.

یافته‌ها: مصرف سطح بالای کمپلکس ویتامین های ب به میزان قابل توجهی شدت علائم رفتاری پارکینسونیسم را کاهش داد. همچنین افزودنی ب ۶ شدت این علائم را در آزمون چرخشی و نه آزمون پیچشی و روتارد بهبود بخشید. مصرف بالای ب۱۲ به تنهایی و همچنین مصرف توام ویتامین های ب۶،ب۱۲و فولات اثر قابل ملاحظه‌ای بر این علائم نداشت. افزودنی های ب۶، ب۱۲ و ب کمپلکس سبب کاهش معنی دار هموسیستئین سرم قبل از جراحی گردید. پس از جراحی اما سطح هموسیستئین در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت.

نتیجه‌گیری: داده‌های این تحقیق نشان می دهند که افزودنی کمپلکس ویتامین‌های ب می‌تواند اثرات ضد پارکینسونی داشته باشد که از طریق کاهش سطح هموسیستئین پلاسما میانجی نمی شود.

واژگان کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶- هیدروکسی دپامین، کمپلکس ویتامین‌های ب، هموسیستئین، استریاتوم.

مقدمه

بیماری پارکینسون دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از بیماری آلزایمر می باشد که ۲۰۰ نفر را در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا می‌سازد. این بیماری بدلیل دژنراسیون انتخابی نورون‌های دوپامینرژیک مسیر نیگرو استریاتال، رخ می‌دهد. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو و نقص در عملکرد میتوکندری‌ها نقش مهمی در پاتوژنزیس این بیماری ایفا می‌نمایند. اگر چه کشف داروی لودپا پیشرفت بزرگی در درمان این بیماری ایجاد نموده است لکن پس از چند سال درمان، برخی علائم بیماری عود می‌نمایند که سبب پایین آمدن کیفیت زندگی می‌گردند(۳-۱). از این رو درحال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش‌های نوین برای جلوگیری از مرگ نورون‌های دپامینرژیک در جسم سیاه و کند کردن پیشرفت این بیماری می‌باشد.

ویتامین‌های ب گروهی از ویتامین‌های محلول درآب می‌باشند که برای انجام بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی و همچنین عملکرد طبیعی میتوکندری‌ها ضروری می‌باشند. این ویتامین‌ها بویژه درگیر در متابولیسم هموسیستئین می‌باشند به گونه‌ای که کمبود این ویتامین‌ها سبب انباشت هموسیستئین در بدن می‌گردد. نشان داده شده است که کمبود برخی از انواع ویتامین‌های ب سبب آتروفی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ و اختلال در فرآیندهای شناختی می‌گردد که در ارتباط با افزایش هموسیستئین می‌باشد(٤). افزایش سطح هموسیستئین پلاسما همراه با افزایش خطر ابتلا به آترواسکلروزیس، بیماری‌های قلبی عروقی و مغزی عروقی، جنون و کاهش توانایی‌های شناختی مغز، افسردگی و همچنین بیماری آلزایمر می‌باشد(۱۲-۵). آزمایشات برون‌تنی نشان داده‌اند که چنانچه نورون‌های هیپوکامپی و قشری در محیط کشت در معرض Hcy قرار گیرند، حساسیت و آسیب‌پذیری آن‌ها در برابر مسمومیت ناشی از تحریک بیش از حد (excitotoxicity) افزایش می یابد(۱۳ و ١٤).

گزارشات زیادی نشان داده‌اند که سطح Hcy در پلاسما و CSF بیماران مبتلا به پارکینسون افزایش می‌یابد. بیان شده است که افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک را تسریع کرده و سبب پیشرفت بیماری پارکینسون می‌گردد(۱و ۱۵). *دووان* و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که Hcy موجب تشدید استرس اکسیداتیو، نقص عملکرد میتوکندری‌ها و اپوپتوزیس در سلول‌های دپامینرژیک انسانی می‌گردد که در معرض روتنون (یک نوع افت کش) و یا یون آهن (که یک اکسیدانت بالقوه می‌باشد) قرار گرفته‌اند(١٦). همچنین مطالعات حیوانی نشان می‌دهند که تزریق موضعی Hcy به درون هسته جسم سیاه و یا استریاتوم علائم پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA و یا MPTP را تشدید می‌نماید(١٦و١٧).

در این مطالعه فرض گردید که مصرف ویتامین‌های گروه ب به میزان چندین برابر میزان مورد نیاز ممکن است از طریق جلوگیری از نقص عملکرد میتوکندری‌ها و یا کاهش انباشت هموسیستئین در بدن اثرات سودمندی در پیشگیری از ایجاد بیماری پارکینسون داشته باشد. از این رو اثر افزودنی ویتامین‌های ب بر ایجاد و شدت پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین سطح سرمی Hcy قبل از تزریق سم و در انتهای آزمون‌های رفتاری اندازه‌گیری گردید تا رابطه احتمالی بین سطح سرمی Hcy با مصرف بالای ویتامین‌ها و همچنین شدت پارکینسونیسم ارزیابی گردد.

مواد و روشها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی: نمونه حیوانی دراین تحقیق موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار بودند که در محدوده وزنی ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم در ابتدای تحقیق قرار داشتند. موش‌ها در حیوان خانه دانشگاه در قفس‌های بزرگ با ابعاد ۲۰ × ۵۹ × ۳۸ در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی

و ۱۲ ساعت تاریکی درحالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگه‌داری می‌شدند.

موش‌ها در ۵ گروه آزمایشی قرار گرفتند: ۱-گروه کنترل (control) که آب معمولی مصرف کرده و مطابق روش شرح داده شده پارکینسونی شدند. ۲-گروهی که آب آشامیدنی حاوی تمامی ویتامین‌های ب (complex) به میزان ٤ برابر میزان طبیعی یک ماه قبل از جراحی تا پایان آزمون‌های رفتاری دریافت نمودند. ۳-گروهی که آب آشامیدنی حاوی ویتامین ب٦ (B6)، ٤برابر میزان طبیعی دریافت داشتند. ٤-گروهی که آب آشامیدنی حاوی ویتامینب۱۲(B12)، ٤برابر میزان طبیعی دریافت داشتند. ٥-گروهی که آب آشامیدنی حاوی ویتامین‌های ب٦، ب۱۲و فولات (FA+B6+B12)، ٤برابر میزان طبیعی دریافت داشتند. غیر از گروه‌های ذکر شده نتایج یک گروه دیگر به نام گروه موش‌های سالم (healthy rats) درانالیز نتایج آزمون روتارد مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های سالم تحت عمل جراحی و دریافت سم 6-OHDA قرار نگرفته و همچنین هیچ‌گونه افزودنی ویتامین نیز دریافت ننمودند. شمار موش‌ها در هر گروه ۱۲ سر بود.

در این تحقیق فرض گردید که غذای مصرفی موش‌ها دارای یک برابر حداقل میزان مورد نیاز ویتامین‌ها (minimum essential medium, MEM) بوده و ویتامین اضافی به آب اشامیدنی حیوانات اضافه گردید. در جدول ۱ میزان ویتامین ها، غذا به شکل پلیت و آب اشامیدنی مورد نیاز روزانه در موش‌های صحرایی و همچنین میزان ویتامین اضافه شده به آب آشامیدنی جهت تهیه افزودنی مورد نیاز ارائه شده است. اطلاعات مورد نیاز از منبع National Research Council of Committee on Animal Nutrition (۱۸) بدست آمد.

طراحی آزمایش: شکل ۱ مراحل مختلف این تحقیق به همراه زمان‌بندی آن‌ها را نشان می‌دهد. تمامی موش‌ها (به غیر از گروه موش‌های سالم) از جمله گروه کنترل تحت جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم ٦-هیدروکسی دپامین ۱ ماه پس از شروع تغذیه با افزودنی ویتامین قرار گرفتند. شدت پارکینسونیسم ایجاد شده به وسیله سه آزمون رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین، پیچش بدن بالا رفته (EBST) و روتارد اندازه‌گیری گردید. آزمون چرخشی قبل از جراحی استرئوتاکسیک نیز به عمل آمد و موش‌هایی که بیش از ۱۰ چرخش خالص به یک طرف بدن در عرض یک ساعت را نشان می‌دادند از آزمایش‌ها حذف می‌شدند. به منظور جلوگیری از اختلالات ناشی از تبخیر آب و یا تخریب شیمیایی ویتامین‌ها آب آشامیدنی موش‌ها هر دو تا سه روز یک بار تعویض می‌گردید. نمونه‌گیری خون و اندازه‌گیری سطح هموسیستئین سرم در دو نوبت قبل از جراحی استرئوتاکسی و در پایان آزمون‌های رفتاری صورت گرفت.

جراحی استرئو تاکسی: سم نوروتوکسیک 6-OHDA (با غلظت ٤ میکروگرم در هر میکرولیتر حل شده در سالین حاوی ۲/. درصد اسید اسکوربیک) به وسیله جراحی استرئوتاکسیک به استریاتوم نیمکره راست با مختصات بر حسب برگما AP: 0.2، L:-3.5 و DV: -8 براساس اطلس *پاکسینوز* و *واتسون* (۱۹) به مغز موش‌ها تزریق گردید. حیوانات ابتدا با استفاده از کتامین/ زایلازین (6/60 mg/kg) بیهوش شده و سپس در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) قرار داده می‌شدند. با استفاده از سرنگ هامیلتون ٤ میکرولیتر از محلول حاوی سم 6-OHDA به درون ناحیه مورد نظر به آهستگی و در عرض ٥ دقیقه تزریق شد. در پایان سرنگ برای ٥ دقیقه درمحل خود نگه داشته می‌شد و به آهستگی باسرعت 1 mm/min از مغز بیرون آورده می‌شد. سم 6-OHDA سبب تخریب نورون‌های دپامینرژیک در جسم سیاه طرف تزریق شده و مدل پارکینسونی را ایجاد می‌نماید.

آزمون های رفتاری

الف-آزمون چرخش القا شده با اپومرفین: این آزمون براساس روش به کار برده شده توسط *فوجی* و

همکاران ۱۹۹٦ (۲۰) صورت گرفت. به طورخلاصه چنانچه تزریق سم 6-OHDA سبب تخریب گسترده نورونی در هسته جسم سیاه گردد، ۲ تا ٤ هفته پس از جراحی، موش‌ها درقبال تزریق اپومرفین (آگونیست گیرنده‌های دپامینرژیک) چرخش‌های پی‌درپی به سمت مقابل محل تزریق نشان می‌دهند. تعداد این چرخش‌ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و تاثیر مداخله می باشد. برای اجرای این آزمون موش‌ها ابتدا درداخل یک استوانه پلکسی گلاس شفاف با ابعاد ۲۸ سانتیمتر قطر و ۳۸ سانتیمتر ارتفاع قرار داده می‌شدند و به آن‌ها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده می‌شد. سپس اپومرفین هیدروکلراید (0.5 mg/kg, i.p) به موش‌ها تزریق می‌شد و ۱دقیقه پس از آن تعداد چرخش ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت ۱ساعت در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای ثبت می‌گردید. در پایان تعداد چرخش خالص موش‌ها به یک طرف با جمع جبری اعداد به دست آمده محاسبه می شد.

ب- آزمون پیچش بدن بالا رفته: این آزمون بر طبق روش شرح داده شده توسط *بورلونگان* و همکاران ۱۹۹۵(۲۱) انجام گرفت. به طور خلاصه دم موش از محدوده ۲ سانتی‌متری محل اتصال با بدن گرفته شده و به بالا آورده می‌شود به طوری که بینی حیوان ۲ سانتیمتر بالای سطح اتکا قرار گیرد. در این حالت حیوان بدن خود را به سمت راست یا چپ می پیچاند که تعداد این پیچش‌ها به هر طرف نشان دهنده شدت بیماری می‌باشد. تعداد پیچش‌ها به راست یا چپ درمدت زمان ۱دقیقه شمارش می‌شد. انحراف در پیچش بدن به صورت $L/(L+R)$ (%) و یا $R/(R+L)$ (%) جایی که L: تعداد پیچش به چپ و R: تعداد پیچش به راست بودند، محاسبه گردیده و نمایش داده می شوند.

ج- آزمون روتارود: آزمون روتارد براساس روش شرح داده شده توسط *لاندبلد* و همکاران (۲۲) انجام گرفت. دستگاه روتارد (M.T6800, Borj Sanat, Iran) شامل یک میله چرخان می‌باشد که سرعت چرخش آن در طول زمان افزایش می‌یابد. مدت زمانی که حیوان بر روی میله باقی می‌ماند به عنوان عملکرد در دستگاه روتارود محاسبه می‌شود. در این تحقیق مدت زمان آزمایش ۲۰۰ ثانیه بود که در آن سرعت چرخش میله چرخان از ۵ دور در دقیقه شروع می‌شد و درعرض ۱۲۰ ثانیه به حداکثر سرعت ٤۰ دور در دقیقه می‌رسید و در باقی زمان آزمایش در حداکثر سرعت می‌ماند. آزمون در ۳ روز متوالی هر روز ۲ جلسه انجام گرفت. به منظور جلوگیری از خستگی در موش‌ها در هر روز بین جلسات آزمایش حداقل ٦۰ دقیقه فاصله در نظر گرفته می‌شد. داده‌های آزمون روتارد براساس معیار ناحیه زیر منحنی (area under the curve (AUC) که بر اساس فرمول زیر محاسبه می‌شود ارائه می‌شوند:

AUC= time on the rod (s) × [time on the rod(s) × 0.44/2]

0.44 عبارتست از میزان شتاب سرعت چرخش میله گردان دستگاه در ثانیه

نمونه‌گیری خون و اندازه گیری هموسیستئین پلاسما

الف- نمونه‌گیری خون: نمونه‌گیری خون در۲ مرحله انجام گرفت: ۱-قبل از جراحی استرئوتاکسیک و ۲- در اتمام آزمایش‌ها پس از آزمون روتارد. قبل از جراحی نمونه خون از ورید دم حیوانات تهیه گردید. به این ترتیب که حیوان در یک رسترینر مخصوص قرار گرفته به گونه‌ای که دم حیوان بیرون قرار گیرد. سپس دم حیوان اندکی گرم شده (با مالش دست) تا جریان خون دردم افزایش یافته و ورید مورد نظر اشکار گردد. سپس خونگیری با استفاده از scalp vein به عمل آمده و در یک میکروتیوب جمع‌آوری گردید.

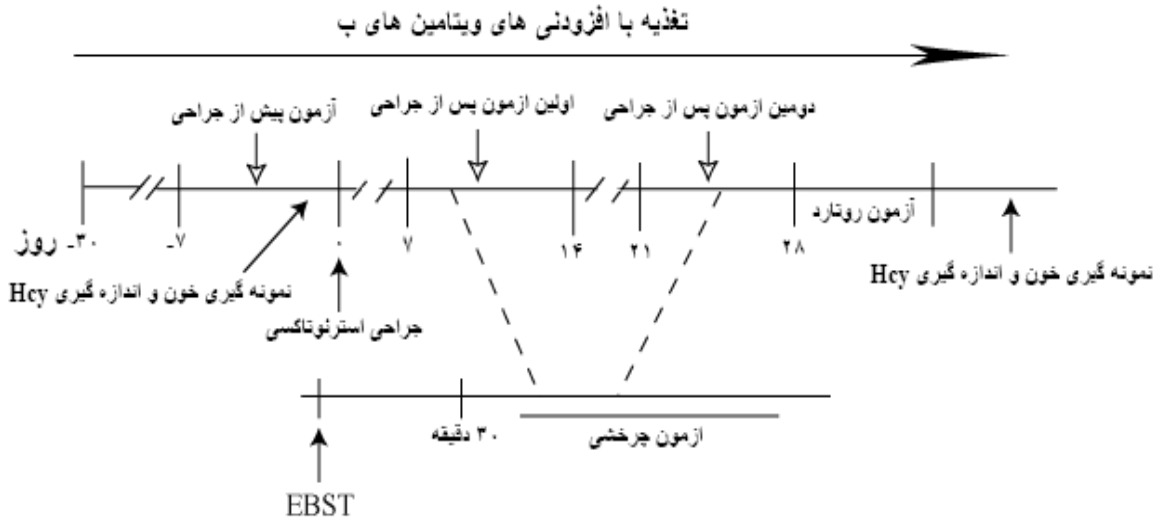
در انتهای آزمایش‌ها نمونه خون از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. به این صورت که ابتدا حیوانات با ترکیب کتامین/زیلازین بیهوش شده و سپس با استفاده از سرنگ ml ۵ از قلب خون جمع‌آوری می‌شد. نمونه خون‌های جمع‌آوری شده در ۵۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شده تا سرم از عناصر سلولی جدا گردد. سپس سرم در یک میکروتیوب دردمای ۸۰- درجه

سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری هموسیستئین نگهداری می‌گردید.

ب-اندازه‌گیری هموسیستئین پلاسما: برای اندازه‌گیری هموسیستئین سرم، از کیت الایزای شرکت Axis-Shield استفاده شد. اصول سنجش هموسیستئین با روش بکار گرفته الایزای فوق بطور خلاصه از این قرار است که ابتدا سوبسترای H_2O_2 ایجاد رنگ و کالریمتری خواهد شد. در این فرایند، منحنی استاندارد با بکارگیری ٦ کالیبراتور تهیه شد و از سه سرم کنترل با غلظت‌های کم، طبیعی و بالا استفاده شد که همگی در رنج های مطلوب بودند.

دقت تست و یا تکرارپذیری (CV%) آن کمتر از ۸٪ و حداقل میزان قابل اندازه‌گیری آن 1 µmol/L و خطی بودن آن تا 50 µmol/L بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها بر حسب میانگین بعلاوه منهای خطای معیار بیان شده‌اند. برای آنالیز آماری نتایج آزمون‌های رفتاری از آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس که به وسیله آزمون من‌ویتنی U دنبال می‌شد استفاده گردید. برای آنالیز آماری مقادیر هموسیستئین پلاسما از آزمون t-test:Two-Sample Assuming Equal Variances استفاده گردید. $P < ./.۵$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته می‌شد.



شکل۱. دیاگرام برنامه زمانی آزمایشات انجام شده دراین تحقیق را نشان می‌دهد. حیوانات از یک ماه قبل از جراحی تا پایان آزمون‌های رفتاری با آب آشامیدنی حاوی ویتامین‌های ب تغذیه می‌شدند. جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم ٦-هیدروکسی دپامین (6-OHDA) یک ماه پس از شروع تغذیه با ویتامین‌ها صورت می‌گرفت. آزمون‌های رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین و پیچش بدن بالا رفته (EBST) در سه زمان مختلف قبل از جراحی، و در هفته های دوم و چهارم پس از جراحی انجام شدند. در این روزها ابتدا EBST انجام می‌گرفت و ٦٠ دقیقه پس از آن آزمون چرخشی انجام شد. آزمون روتارد در هفته پنجم پس از جراحی صورت گرفت. نمونه گیری از خون و اندازه‌گیری هموسیستئین در دو مرحله قبل از جراحی و پس از ازمون روتارد صورت گرفت.

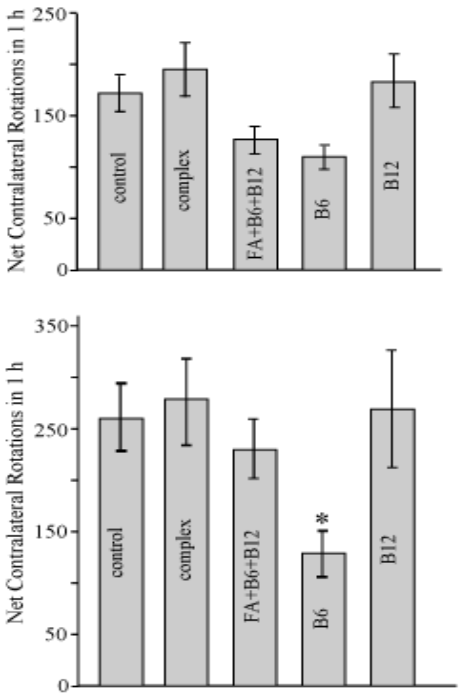
ویتامین		مقدارمورد نیازدر هرکیلوگرم رژیم غذایی (mg)	مقدارمورد نیازدر هر ۱۰۰۰ میلی لیتر آب (mg)	۴برابر (mg)
تیامین		۴	۵	۲۰
ریبوفلاوین		۴	۵	۲۰
نیاسین		۱۵	۱۵	۷۵
بیوتین		./۲	۰/۲۵	۱
فولیک اسید		۱	۱/۲۵	۵
پانتوتنات		۱۰	۱۲/۵	۵۰
ب۶		۶	۷/۵	۳۰
ب۱۲		۵۰	۶۲/۵ µg	۲۵۰

جدول ۱. مقادیر حداقل نیاز روزانه هر یک از ویتامین‌های ب در موش‌های صحرایی نشان داده شده است. می‌بایستی توجه شود که غذای طبیعی موش‌ها حاوی ۱برابر حداقل مورد نیاز روزانه ویتامین‌ها می‌باشد. لذا برای به عنوان مثال فراهم کردن افزودنی ب ۱۲ به میزان ۵ برابر طبیعی، ٤ برابر حداقل نیاز روزانه به آب اشامیدنی اضافه می گردید.

نتایج

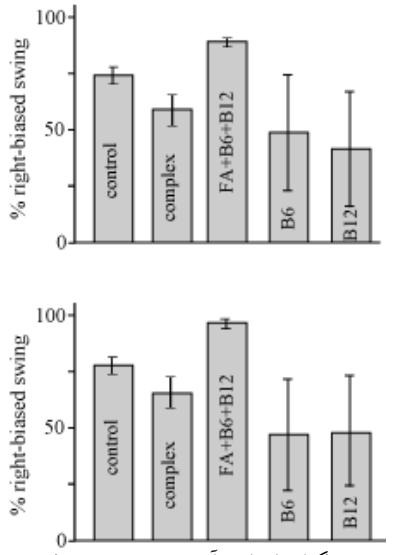
آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین: شکل ۲ اثر تغذیه با ویتامین‌های ب را بر تعداد چرخش‌های القاء شده با اپومرفین نشان می‌دهد. تمامی موش‌ها در قبال تزریق اپومرفین تعداد قابل توجهی چرخش به سمت مقابل محل تزریق نشان می‌دادند که نشان می‌دهد تجویز افزودنی ویتامین‌های‌ب نمی‌تواند از ایجاد پارکینسونیسم در موش‌های صحرایی جلوگیری نماید. با این وجود نتایج بدست آمده از برخی گروه‌های آزمایشی قابل توجه می‌باشد. موش‌های گروه B6 بهبود قابل ملاحظه‌ای را در آزمون چرخشی نشان دادند. در این موش‌ها تعداد چرخش‌ها در اولین و دومین آزمون پس از جراحی به ترتیب ۳٦ و ۵۷ ٪ کمتر از آن در گروه کنترل بود. همچنین درتمامی گروه ها تعداد چرخش‌ها در دومین آزمون پس از جراحی نسبت به اولین ازمون به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت لکن افزایش در تعداد چرخش‌ها در دومین آزمون پس از جراحی نسبت به اولین آزمون درگروه B6 کمتر از آن در دیگر گروه‌ها بود. همچنین تعداد چرخش‌ها در گروه FA+B6+B12 در اولین آزمون پس از جراحی نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه‌ای (حدود ۳۰٪) را نشان می‌داد لکن این نتیجه در دومین آزمون تکرار نشد.

آزمون پیچش بدن بالا رفته: شکل ۳ اثر تغذیه با ویتامین‌های ب را بر انحراف در پیچش موش‌ها در EBST در هفته‌های دوم و چهارم پس از جراحی نشان می‌دهد. در موش‌های گروه کنترل حدود ۷۵٪ از کل پیچش‌های ثبت شده در آزمون‌های پس از جراحی به سمت راست (محل تزریق سم) بود. نتایج مشابهی برای گروه FA+B6+B12 بدست آمد. از طرف دیگر موش‌های گروه ب کمپلکس ۱۳٪ کمتر انحراف پیچش به سمت راست را نسبت به گروه کنترل نشان دادند که البته تفاوت آن با گروه کنترل معنی دار نبود. نتایج جالبی در گروه‌های B6 و B12 به دست آمد. به این صورت که در این گروه‌ها میانگین انحراف پیچش‌ها اندکی به سمت چپ (طرف مقابل محل تزریق سم) بود. لکن موش‌ها در این گروه‌ها تفاوت‌های زیادی با یکدیگر در آزمون EBST نشان می‌دادند که احتمالاً دلیل اصلی عدم معنی‌دار بودن آماری نتایج این گروه‌ها درمقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



شکل۲. هیستوگرام‌ها نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین درهفته دوم (بالا) و چهارم (پایین) پس از جراحی را نشان می‌دهد. مقادیر میانگین±خطای معیار برای ۱۲ موش می‌باشد.

*: $P<0.05$ in compared to control group, Kruskall–Wallis nonparametric test followed by Mann–Whitney U test.



شکل ۳. هیستوگرام‌ها نتایج آزمون EBST در هفته دوم (بالا) و چهارم (پایین) پس از جراحی را نشان می‌دهد. هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه مشاهده نشد. دقت شود که رقم۵۰٪ نشان می‌دهد که تعداد پیچش ها به راست برابر بوده است با تعداد پیچش ها به چپ. مقادیر میانگین ± خطای معیار برای ۱۲ موش می‌باشد.

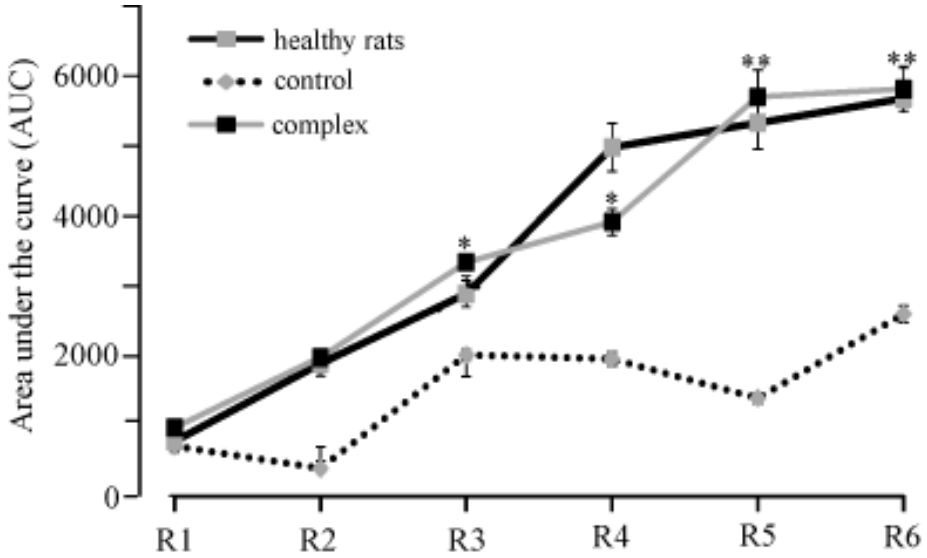
آزمون روتارد: در آزمون روتارد توانایی حرکتی بویژه یادگیری حرکتی درموش‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مطالعه موش‌های سالم و غیر پارکینسونی به زودی و در جریان سه تا چهار جلسه تمرین با دستگاه روتارد یاد گرفتند که چگونه بر روی میله چرخان این دستگاه قدم زده و تعادل خود را حفظ نمایند. این موش‌ها درجلسه سوم و یا چهارم آزمون به حداکثر زمان آزمون رسیدند و یا به آن نزدیک می‌شدند. از طرف دیگر موش‌های گروه کنترل یادگیری ضعیفی را نشان دادند و هیچ‌گاه به زمان حداکثر در آزمون نرسیدند (شکل٤). در میان موش‌های دریافت کننده افزودنی‌های ویتامین‌های ب، گروه complex اجرای حرکتی و یادگیری خوبی را نشان دادند به گونه‌ای که الگوی اجرای آن‌ها در جلسات آزمون بسیار مشابه با موش‌های سالم بوده و درجلسات پنجم و ششم زمان ماندن آن‌ها بر میله چرخان دستگاه مشابه آن درگروه موش‌های سالم بود.

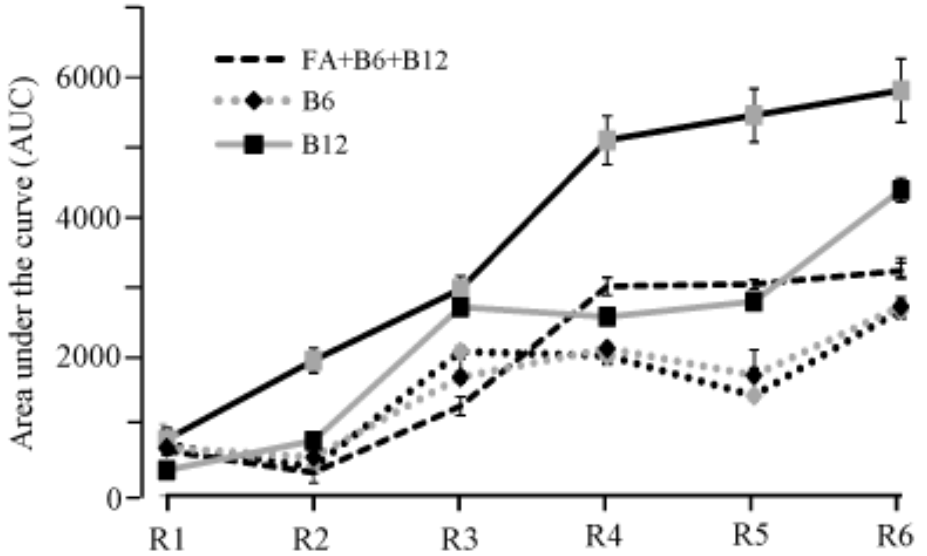
از طرف دیگر موش‌های متعلق به گروه‌های FA+B6+B12، B6 و B12 اجرای حرکتی ضعیفی را نشان داده و الگوی یادگیری آن‌ها مشابه با الگوی یادگیری در گروه کنترل بود. البته موش‌های دریافت کننده ویتامین ب۱۲ اجرای بهتری را نسبت به گروه کنترل در جلسه ششم آزمون نشان دادند.

سطح هموسیستئین سرم. میزان هموسیستئین کل سرم در دو مرحله اندازه گیری شد: ۱-قبل از جراحی یعنی ۱ماه پس از شروع تغذیه با افزودنی ویتامین‌های ب ۲- در پایان آزمون‌های رفتاری

سطح هموسیستئین سرم قبل از جراحی. شکل ۵ پانل بالا سطح هموسیستئین سرم را در خون گروه‌های مختلف آزمایشی قبل از جراحی را نشان می‌دهد. میزان هموسیستئین سرم قبل از جراحی درگروه کنترل برابر بود با ۱۳/۱±۱/۲ میکرومول در لیتر. این میزان درگروه ب کمپلکس به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر بود و برابر بود با۸±۱/۳ میکرومول در لیتر. همچنین سطح هموسیستئین پلاسما درگروه‌های دریافت کننده ویتامین

ب٦ یا ب١٢ بسیار پایین‌تر از آن در گروه کنترل بوده و به ترتیب ١/٢±٧/٢ و ٢±٧/٣ میکرومول بود. در گروه *FA+B6+B12* مقدار هموسیستئین تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشت.





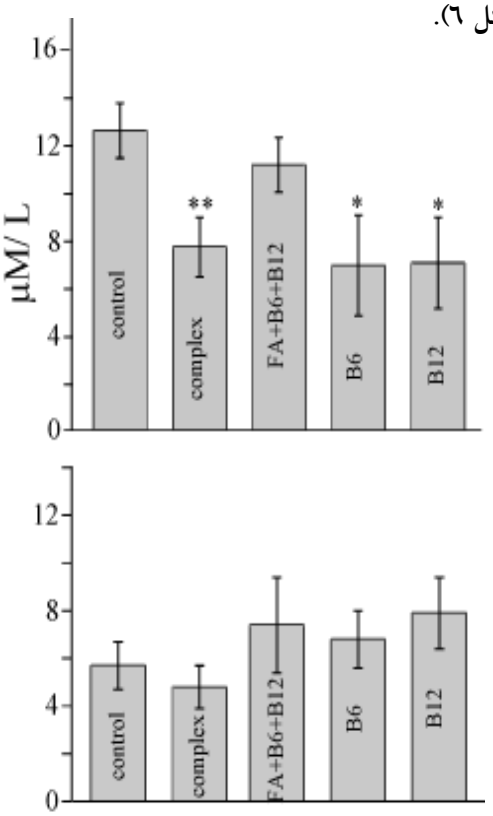
شکل ٤. عملکرد موش‌ها درگروه های مختلف آزمایشی در آزمون روتارد به تصویر کشیده شده است. موش‌ها سه روز پیاپی، هر روز ٢ جلسه تحت این آزمون قرار گرفتند و زمان ماندن بر میله چرخان در آن‌ها ثبت می گردید. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن بر میله چرخان می باشد. مقادیر میانگین ± خطای معیار برای ١٢ موش می باشد.

*: $P<0.05$ in compared to control group, Kruskall–Wallis nonparametric test followed by Mann–Whitney U test

سطح هموسیستئین سرم در پایان آزمون‌های رفتاری: شکل ٥ پانل پایین سطح هموسیستئین سرم را در گروه‌های مختلف ازمایشی در پایان آزمون‌های رفتاری نشان می‌دهد. میزان هموسیستئین سرم در این زمان در گروه کنترل برابر با ١±٥/٧ میکرومول در لیتر بود. این میزان درگروه ب کمپلکس کمتر بود و برابر با ٠/٩±٤/٨ میکرومول بود که البته این تفاوت با گروه کنترل از نقطه نظر آماری معنی‌دار نبود. در دیگر

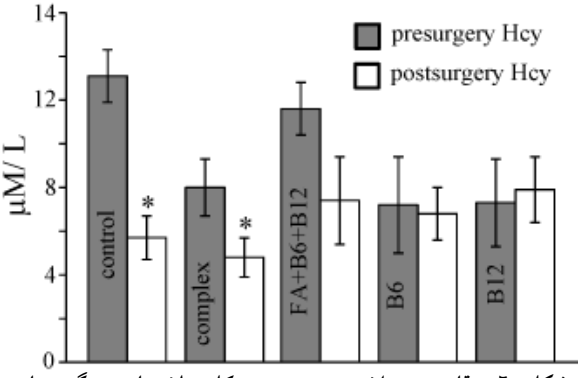
گروه‌ها (*FA+B6+B12*، *B6* و *B12*) سطح هموسیستئین پلاسما در این زمان نزدیک به ۷ میکرومول بود و تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت.

نکته قابل توجه اختلاف قابل توجه و کاملا معنی‌دار در سطح هموسیستئین پلاسما قبل و پس از جراحی بود. پس از جراحی سطح هموسیستئین پلاسما درگروه کنترل به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و از ۱۳ به حدود ٦ میکرومول در لیتر رسید. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود. این تفاوت برای گروه ب کمپلکس نیز معنی‌دار بوده و از ۸ به ۵ میکرومول درلیتر رسید. لکن دردیگر گروه‌ها (FA+B6+B12، B6 و B12) سطح هموسیستئین پلاسما پس از جراحی نسبت به آن در قبل از جراحی تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌داد (شکل ٦).



شکل ۵. میزان هموسیستئین کل سرم درگروه‌های آزمایشی قبل (پانل بالا) و پس از (پانل پایین) جراحی. سطح هموسیستئین پلاسما با روش Enzyme Immuno Assay (EIA) اندازه گیری گردید. مقادیر میانگین ± خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

*: $P<0.05$ and **: $P<0.01$ in compared to control, t-test.



شکل ٦. مقایسه میزان هموسیستئین کل پلاسما در گروه‌های آزمایشی قبل از جراحی با این میزان پس از جراحی. مقادیر میانگین ± خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

*: $P<0.05$ and **: $P<0.01$ in compared to control, paired t-test.

بحث

در این مطالعه ما فرض کردیم تغذیه با مقادیر بالای ویتامین‌های ب ممکن است از طریق کاهش سطح هموسیستئین از ایجاد پارکینسونیسم جلوگیری کرده و یا حداقل از شدت آن بکاهد. داده‌های ما نشان می‌دهند که افزودنی کمپلکس ویتامین‌های ب، ۵ برابر میزان طبیعی اثرات مفیدی در کاهش شدت پارکینسونیسم در آزمون‌های روتارد و EBST داشت لکن اثری بر آزمون چرخشی نداشت. افزودنی ویتامین ب۱۲ و یا تلفیقی از فولات، ب٦ و ب۱۲ اثری بر شدت پارکینسونیسم در هر سه آزمون رفتاری نداشت. افزودنی ویتامین ب٦ سبب کاهش تعداد چرخش‌های القاء شده با اپومرفین گردید لکن اثری بر ازمون روتارد و EBST نداشت.

اختلاف در نتایج به دست آمده برای هر یک از آزمون‌های رفتاری مختلف می‌تواند ناشی از حساسیت هر آزمون در پیش‌بینی شدت مرگ نورون‌های دپامینرژیک در هسته جسم سیاه باشد. آزمون چرخشی معتبرترین آزمون در ارزیابی پارکینسونیسم القاء شده با 6-OHDA می باشد. این آزمون می‌تواند تخریب نزدیک به کامل نورون‌ها در هسته جسم سیاه را از تخریب ضعیف در این هسته متمایز نماید لکن از تشخیص شدت آسیب بین ۸۰-۵۰٪ ناتوان می‌باشد(۲۳). از طرف دیگر گزارش شده است که زمان ماندن و

پایداری موش‌های پارکینسونی بر گردونه چرخان دستگاه روتارد به طور معکوس متناسب با میزان آسیب در هسته جسم سیاه می‌باشد. Iancu و همکاران (۲۰۰۵) گزارش نمودند که آزمون روتارد در مقایسه با ازمون چرخش القاءشده با اپومرفین و یا امفتامین و همچنین EBST توانایی پیش‌بینی دقیق‌تری در میزان آسیب نورونی در SN دارد (۲٤). در ارتباط با آزمون EBST اگرچه محققین متعددی از آن به عنوان یک آزمون رفتاری معتبر در ارزیابی اختلالات رفتاری مرتبط با دوپامین یاد می‌کنند(۲۱، ۲۵و ۲٦) لکن این آزمون حساسیت کافی در تشخیص آسیب‌های متوسط و ضعیف دارا نمی‌باشد(۲۳). براساس این اطلاعات و نتایج گرفته شده از این تحقیق می‌توان بیان نمود که افزودنی کمپلکس ویتامین‌های ب اثرات مفیدی در حفاظت نورون های‌دپامینرژیک هسته جسم سیاه و کاهش شدت علائم پارکینسونیسم دارا می‌باشد. اثر افزودنی ویتامین ب٦ مشکوک می‌باشد و داده‌های این مطالعه برای تصمیم‌گیری درمورد اثر ضد پارکینسونی این ویتامین کافی نمی‌باشد.

نتایج ما در توافق و همچنین عدم توافق با نتایج چندین مطالعه انسانی می‌باشد که ارتباط بین مصرف سطح بالای ویتامین‌های ب را با ریسک بیماری پارکینسون مورد بررسی قرار داده‌اند. یک مطالعه شاهد موردی در آلمان نشان می‌دهد که مصرف بالای فولات، ویتامین ب٦ و ب ۱۲ و نه ریبوفلاوین سبب کاهش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون می‌گردد(۲۷). از طرف دیگر یک مطالعه کوهورت پروسپکتیو در هلند نشان داد که مصرف بالای ب٦ و نه فولات یا ب ۱۲ سبب کاهش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون می‌گردد (۲۸). در تضاد با این ۲ مطالعه، در یک مطالعه جامع که در آمریکا انجام شده است هیچ گونه ارتباطی بین میزان مصرف فولات، ب ٦ یا ب۱۲ و خطر ابتلا به بیماری پارکینسون به دست نیامده است (۲۹).

نتایج ما نشان می‌دهد که مصرف بالای ویتامین‌های ب٦، ب ۱۲ و کمپلکس ویتامین‌های ب سبب کاهش معنی‌دار سطح هموسیستئین خون می‌گردد. کاهش سطح هموسیستئین پلاسما در گروه‌های ب٦، ب۱۲ و کمپلکس منطقی می باشد زیرا این ویتامین‌ها درگیر در متابولیسم طبیعی هموسیستئین بوده و مصرف بالای آن‌ها می‌تواند سبب کاهش سطح هموسیستئین پلاسما گردد (۲٤، ۳۰ و ۳۱).

از سوی دیگر سطح هموسیستئین سرم در پایان آزمون‌های رفتاری بین گروه های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت و حتی در برخی گروه‌های دریافت کننده ویتامین اندکی بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین در مقایسه سطح هموسیستئین پس از جراحی با آن در قبل از جراحی مشخص می گردد که ظاهراً تجویز 6-OHDA سبب کاهش معنی‌دار هموسیستئین سرم شده است. چنین نتیجه‌ای در موش‌های دریافت کننده افزودنی ب کمپلکس و تا حدی افزودنی تلفیقی از ویتامین‌های فولات، ب٦ و ب۱۲ نیز مشاهده گردید. لکن در گروه‌های دریافت کننده ب٦ و ب۱۲ میزان هموسیستئین در قبل و پس از جراحی تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. دو توضیح در این ارتباط وجود دارد.۱-تجویز سم 6-OHDA سبب کاهش هموسیستئین می‌گردد. نشان داده شده است که تولید هموسیستئین نیاز به واکنش‌های متیلاسیون دارد و کاتکول آمین‌ها از جمله دوپامین به عنوان پذیرنده گروه‌های متیل دراین واکنش درگیر می‌باشند(۳۰). ممکن است به دلیل کاهش نورون‌های کاتکول امینرژیک براثر تجویز سم

تولید کاتکول آمین‌ها کاهش یافته و به دنبال آن واکنش‌های متیلاسیون و تولید هموسیستئین کاهش یافته باشد. البته این توضیح مشخص نمی کند که چرا هموسیستئین درگروه complex که بهبود پارکینسونیسم رانشان می داد پس از جراحی کاهش یافته است.

۲-می تواند ناشی از اثر سن بر سطح هموسیستئین پلاسما باشد. در مطالعه‌ای که توسط *مارتینز* و همکاران (۲۰۰۵) (۳۲) انجام شد نشان داده شد که سطح هموسیستئین پلاسما در موش‌های صحرایی پس ازتولد تا سه ماهگی افزایش می یابد و از ۲/۹٤±./٤۷ به ۸/۲۹±./٦۷ میکرومول در لیتر می رسد. از سه ماهگی به بعد هموسیستئین کاهش یافته و در شش ماهگی به ٦/٤۲±۱/٦٥ و در بیست و هشت ماهگی به ٤/۸۷±./۸۱ میکرومول در لیتر می‌رسد. در این مطالعه در هنگام جراحی و تزریق سم موش‌ها در حدود سه ماه سن داشتند و اندازه‌گیری هموسیستئین پس از جراحی در پایان آزمون‌های رفتاری یعنی شش هفته پس از جراحی صورت گرفت. به عبارت دیگر در اندازه‌گیری دوم موش ها نزدیک به ٥ ماه سن داشتند. میزان هموسیستئین پلاسما در گروه کنترل پس از جراحی درحد این میزان درموش های ٦ ماهه در گزارش *مارتینز* و همکاران می باشد. این مطلب نشان می‌دهد که تزریق سم 6-OHDA و تخریب نورون‌های کاتکول امینرژیک بر سطح هموسیستئین پلاسما اثری ندارد.

در مجموع نتایج ما نشان می‌دهند که اثر افزودنی ویتامین‌های ب در کاهش شدت پارکینسونیسم دارد از طریق کاهش سطح هموسیستئین سرم میانجی نمی شود. این یافته در تضاد با مطالعات حیوانی است که نشان می‌دهد اینفوزیون هموسیستئین به درون هسته جسم سیاه و یا استریاتوم در موش‌هایی که توسط سموم پارکینسون‌زا 6-OHDA و MPTP درمان شده‌اند، سبب تشدید پارکینسونیسم در این حیوانات می‌گردد (۱٦و۳۳). از طرف دیگر نتایج ما هم راستا با برخی مطالعات انسانی است که نشان می‌دهند هیچ‌گونه ارتباطی بین بیماری پارکینسون و هموسیستئین وجود ندارد(۲۸و۳٤). با این وجود برخی مطالعات نشان داده‌اند که سطح هموسیستئین درخون بیماران پارکینسونی بیش از افراد سالم می‌باشد (۲۲-۲۰). البته دیگر نویسندگان این افزایش را ناشی از درمان با ال-دوپا در نظر گرفته‌اند(۳٦-۳٤).

از این رو چنانچه اثر افزودنی ویتامین‌های ب در کاهش شدت پارکینسونیسم القاء شده با 6-OHDA از طریق کاهش سطح هموسیستئین پلاسما میانجی نمی‌شود، پس مکانیسم یا مکانیسم‌های درگیر در این اثر چه می‌باشند؟ سمومی که در حیوانات ایجاد پارکینسون می‌نمایند مانندMPTP، 6-OHDA و روتنون از طریق مهار کمپلکس I میتوکندریایی و اسیب اکسیداتیو عمل می‌نمایند (۳-۱). اکسیداسیون ساختار بسیاری از آنزیم‌ها را تغییر داده و سبب کاهش تمایل آنها به سوبستراها یا کوانزیم‌هاشان شده و از این طریق فعالیت آنها را کاهش می‌دهد. سطوح بالای سوبستراها و کوفاکتورها می‌تواند به آنزیم‌ها متصل شده و محل فعال آنها را از آسیب اکسیداتیو محافظت نموده و فعالیت آنزیم‌هایی که به دلیل استرس اکسیداتیو تا حدودی آسیب دیده‌اند را افزایش دهد. ویتامین‌های ب پیش‌ساز کوفاکتورهای آنزیم‌های میتوکندریایی می‌باشند. پیشنهاد شده است که درمان با دوزهای بالای ویتامین ب می‌تواند آنزیم‌های مختلف را که بر اثر عوامل مختلف مانند پیری و یا بیماری‌های ژنتیکی

تمایل اتصال با کوانزیم کاهش یافته دارند را تحریک نماید(۳۷). از این رو می توان بیان نمود که احتمالاً مکانیسم اثر افزودنی ویتامین‌های ب در کاهش شدت علائم پارکینسونیسم حفاظت انزیمهای میتوکندریایی و تضعیف اثر 6-OHDA درایجاد اسیب میتوکندریایی می‌باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه ما نشان دادیم که مصرف مقادیر بالای کمپلکس ویتامین های ب اثرات ضد پارکینسونی داشته که احتمالاً از طریق حفاظت نورون‌های دوپامینرژیک هسته جسم سیاه در برابر سم پارکینسون‌زا 6-OHDA اعمال می‌شود. اندازه‌گیری سطح هموسیستئین سرم نشان داد که افزودن ویتامین‌های ب به آب آشامیدنی سبب کاهش سطح هموسیستئین سرم می‌شود ولی اثرات ضد پارکینسونی افزودنی‌های ویتامین‌های ب از طریق کاهش سطح این ماده میانجی نمی‌شود. اثر حفاظت نورونی این ویتامین‌ها احتمالاً از طریق حفاظت آنزیم های میتوکندریایی از اسیب توسط استرس اکسیداتیو اعمال می شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای دکتر *جهانی هاشمی* دانشیار گروه آمار حیاتی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت محاسبات آماری این مقاله و همچنین خانم‌ها *الهام هادی‌بیگی* و *فاطمه واعظی*، دانشجویان پزشکی این دانشگاه جهت همکاری‌شان در انجام آزمون‌های رفتاری و خونگیری از موش‌ها سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. Neuron. 2003; 39: 889–909.
2. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. Parkinsonism and Related Disorders 2005; 11: S3–S7.
3. Tsang A.H.K., Chung K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta 2009;1792: 643–650.
4. Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto JM, et al. Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. PLoS One. 2009; 21: 4-12.
5. Bertsch T, Mielke O, Höly S, Zimmer W, Casarin W, Aufenanger J, et al. Homocysteine in cerebrovascular disease: an independent risk factor for subcortical vascular encephalopathy. Clin Chem Lab Med. 2001;39: 721–724.
6. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. Arch Neurol. 2000; 57: 1422–1427.
7. Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, et al. elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. Eur Neurol. 1998; 40:225–227.
8. O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB Jr, Bottiglieri T, etal. Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. Arch Neurol. 2004; 61: 865–868.
9. Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, et al. Rotterdam Scan Study.Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam Scan Study. Neurology. 2002; 59:1375–1380.
10. Quadri P, Fragiacomo C, Pezzati R, Zanda E, Tettamanti M, Lucca U. Homocysteine and B vitamins in mild cognitive impairment and dementia. Clin Chem Lab Med. 2005; 43:1096–1100.
11. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2002; 346:476–483.
12. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. Am J Psychiatry. 2002; 159: 2099–2101.
13. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. J Neurosci. 2000; 20: 6920-6.
14. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:5923-8.
15. Olaf S, Fowler B, Piertzik K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, et al. Homocysteine, folate & vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review & treatment

recommendations. Expert Rev Neurother. 2009; 9:1393 – 1412.
16. 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. J Neurochem. 2002; 80:101–110.
17. Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, Looi JC, Brodaty H. Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. Neurology.2002; 58: 1539–1541.
18. Matter F. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995. NATIONAL ACADEMY PRESS ,Washington, D.C.
19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego, CA: Academic Press; (2007).
20. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. Mol. Brain Res. 1996; 39:127–136.
21. Borlongan CV, Randall TS, Cahill DW, Sanberg PR. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. Brain Res. 1995;676:231-4.
22. Lundblad M, Vaudano E, Cenci MA. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. J Neurochem. 2003; 84:1398-410.
23. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioral and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. J Neurosci Methods. 2005; 144(1):35-45.
24. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. Behav Brain Res. 2005; 162(1):1-10.
25. Abrous DN, Rodriguez JJ, Montaron MF, Aurousseau C, Le Moal M, Barneoud P. Behavioural recovery after unilateral lesion of the dopaminergic mesotelencephalic pathway: effect of repeated testing. Neurosci. 1998; 84(1):213-21.
26. Roghani M, Behzadi G, Baluchnejadmojarad T. Efficacy of elevated body swing test in the early model of Parkinson's disease in rat. Physiol Behav. 2002; 76(4-5):507-10.
27. Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, et al. Diet and Parkinson's disease. II: a possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food frequency questionnaire in a case–control study. Neurology. 1996; 47:644–650.
28. Lau LM, Koudstaal PJ, Van Meurs JBJ, Uitterlinder AG, Hofman A, Breteler MMB. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and PD. Ann Neurol. 2005;57:927–930.
29. Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernán MA, Logroscino G, Willett WC, et al. Folate intake and risk of Parkinson's disease. Am J Epidemiol. 2004;160:368–375.
30. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annual Review of Nutrition. 1999;19:217–246.
31. Selhub J. The many facets if hiperhomocysteinemia: studies from the Framingham Cohorts. J Nutr. 2006; 136:1726–1730.
32. Martins PJ, Galdieri LC, Souza FG, Andersen ML, Benedito-Silva AA, Tufik S, et al. Physiological variation in plasma total homocysteine concentrations in rats. Life Sciences. 2005;76: 2621–2629.
33. Xinga H, Peng H, Xuebing C, Sun S. Effect and mechanism of homocysteine on Parkinson's disease induced by 6-OHDA. Journal of Nanjing Medical University. 2008;22:12-17.
34. Todorović Z, Dzoljić E, Novaković I, Mirković D, Stojanović R, Nesić Z, Krajinović M, Prostran M, et al. Homocysteine serum levels and MTHFH C677T genotyoe in patients with Parkinson's disease, with and without levopoda therapy. J Neurol Sci. 2006;248:56–61.
35. Miller JW, Selhub J, Nadeau MR, Thomas CA, Feldman RG, Wolf PA. Effect of L-dopa on plasma homocysteine in PD patients: relationship to B-vitamin status. Neurology. 2003; 60: 1125–1129.
36. Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Peplonska B, Lokk J, Chodakowska-Zebrowska M, et al. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2006;404:56–60.
37. Jia H, Liu Z, Li X, Feng Z, Hao J, Li X, et al. Synergistic anti-Parkinsonism activity of high doses of B vitamins in a chronic cellular model. Neurobiol Aging. 2010;31:636-46.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Twenteeth Year, No.103 February, March 2013

High intake of B complex attenuates 6-hydroxydopamine-induced arkinsonism in rat

Mohammad Hossein Esmaeili, Negin Fraidouni, Mohammad Sophiabadi, Mohammad Sarookhani, Hashem haghdoost-Yazdi*

Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

E-mail: hhaghdoost@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Several lines of evidence show that high plasma level of homocysteine (Hcy) induces development or exacerbates Parkinson's disease. B vitamins are necessary for Hcy metabolism and control plasma level of Hcy. In the present study, we studied the effect of B vitamin supplementation on the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced Parkinsonism in rat.

Materials and Methods: Rats were nourished with B vitamin supplements from 1 month before the surgery till the end of experiment. 6-OHDA was injected into the striatum of rat brains by stereotaxic surgery. Development and severity of the Parkinsonism were assessed by three conventional behavioral tests. Serum level of Hcy was measured before the surgery and at the end of experiment.

Results: Supplement of B complex significantly attenuated behavioral symptoms of the Parkinsonism. Supplement of B_6 improved rotational behavior of the rats but had no effect on the swing and rotarod tests. Supplements of B_{12} and combination of B_6, B_{12} and folate had no remarkable effect. Supplements of B_6, B_{12} and B complex decreased serum level of Hcy before the surgery. In the end of the experiment, however, there was no significant difference for serum level of Hcy between experimental groups.

Conclusion: Our results indicate that high intake of B complex can provide anti-Parkinsonism effect which is not mediated by lowering plasma Hcy.

Key words: Parkinson's disease, 6-OHDA, B complex, Hcy, Striatum

Received: 2012/12/10

Last revised: 2013/3/3

Accepted: 2013/3/11