



High intake of folic acid attenuates 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats independent of serum level of homocysteine

Negin Fraidouni, Mohammad Sarookhani, Mohammad Sophiabadi, Hashem Haghdost-Yazdi*

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

Received: 29 May 2012

Accepted: 30 Jul 2012

Abstract

Introduction: High levels of homocysteine (Hcy) might accelerate dopaminergic cell death through oxidative stress and excitotoxicity. Folate plays an important role in the control of plasma levels of Hcy. In this study, effect of supplementation with folic acid on the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced Parkinsonism in rat and also serum level of Hcy was investigated.

Methods: Rats were fed with folic acid supplements from 1 month before stereotaxic injection of 6-OHDA until to the end of experiments. 6-OHDA was injected into the striatum and development and severity of the Parkinsonism were assessed by conventional behavioral tests. Serum levels of Hcy before surgery and at the end of the behavioral tests were measured.

Results: Our results show that 10-fold supplementation, but not 2-fold supplementation of folic acid, significantly attenuates severity of 6-OHDA-induced Parkinsonism. 5-fold supplementation of folic acid also slightly decreased behavioral symptoms of Parkinsonism. Measurement of Hcy levels of sera before surgery show that high intake of folate has no effect on the plasma concentrations of Hcy. However, Hcy in the group of rats that received 10-fold supplement of folic acid was significantly higher than the control group at the end of the behavioral tests.

Conclusion: Our results indicate that high intake of folic acid provides anti-Parkinsonism effect in a dose dependent manner, but this effect is not mediated by lowering plasma Hcy.

Key words: Parkinson's disease, 6-OHDA, folic acid, serum level of homocysteine, striatum

* Corresponding author e-mail: hhaghdost@qums.ac.ir
hhaghdost@gmail.com

Available online at: www.phypha.ir/ppj

مصرف بالای اسید فولیک شدت پارکینسونیسم القاء شده توسط سم ۶-هیدروکسی دوپامین در موش صحرایی را بدون اثر بر هموستتین سرم کاهش می دهد

نگین فریدونی، محمد ساروخانی، محمد صوفی آبادی، هاشم حقدوست یزدی*
مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین
دریافت: ۹ خرداد ۹۱ پذیرش: ۹ مرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: گزارش شده است که افزایش سطح هموستتین خون مرگ نوروں های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون را تشدید می نماید. فولات در کنترل سطح هموستتین پلاسما نقش مهمی ایفا می نماید. در این تحقیق اثر مصرف مقادیر بالای اسیدفولیک بر پارکینسونیسم القاء شده توسط سم ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) در موش صحرایی و همچنین بر سطح سرمی هموستتین مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: موش های صحرایی نر از یک ماه قبل از دریافت سم 6-OHDA تا پایان آزمون های رفتاری (۶ هفته پس از جراحی) آب آشامیدنی حاوی مقادیر مختلف اسیدفولیک دریافت نمودند. 6-OHDA به ناحیه استریاتوم مغز تزریق گردیده و شدت پارکینسونیسم توسط آزمون های رفتاری متداول مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح هموستتین سرم قبل از جراحی و پس از اتمام آزمون های رفتاری اندازه گیری شد.

یافته ها: مصرف اسیدفولیک به میزان ۱۰ برابر و نه ۲ برابر نیاز روزانه آن، به میزان قابل توجهی شدت پارکینسونیسم القاء شده توسط سم 6-OHDA را کاهش داد. مصرف اسیدفولیک به میزان ۵ برابر نیز سبب کاهش خفیف علائم رفتاری پارکینسونیسم گردید. مصرف بالای اسیدفولیک اثری بر سطح سرمی هموستتین قبل از جراحی نداشت ولی در پایان آزمون های رفتاری و در گروه فولات ۱۰ برابر سطح سرمی هموستتین به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از گروه کنترل بود.

نتیجه گیری: مصرف بالای اسیدفولیک به صورت وابسته به دوز اثر ضد پارکینسونی داشته ولی این اثر از طریق کاهش سطح هموستتین سرم میانجی نمی شود.

واژه های کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶-هیدروکسی دوپامین، اسیدفولیک، سطح سرمی هموستتین، استریاتوم

مقدمه

نوروں های دوپامینرژیک مسیر نیگرو استریاتال، رخ می دهد. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو و نقص در عملکرد میتوکندری ها نقش مهمی در پاتوژنیز این بیماری ایفا می نمایند. اگر چه کشف داروی لودوپا پیشرفت بزرگی در درمان این بیماری ایجاد نموده است لکن پس از چند سال درمان، برخی علائم بیماری عود می نمایند که سبب پایین آمدن کیفیت زندگی می گردند [۹، ۳۲، ۴۴]. از این رو در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش های نوین برای جلوگیری از مرگ نوروں های دوپامینرژیک در جسم سیاه و کند کردن

بیماری پارکینسون دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از بیماری آلزایمر می باشد که ۲۰۰ نفر را در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا می سازد. این بیماری بدلیل دژنراسیون انتخابی

hhaghdooost@qums.ac.ir
hhaghdooost@gmail.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

پیشرفت این بیماری می باشد.

در چند دهه اخیر هموسیستئین (Hcy) توجه زیادی را به خود جلب نموده است زیرا افزایش سطح هموسیستئین پلاسما همراه با افزایش خطر ابتلا به آترواسکلووزیس، بیماری های قلبی عروقی و مغزی عروقی، جنون و کاهش توانایی های شناختی مغز، افسردگی و همچنین بیماری آلزایمر می باشد [۳، ۱۱، ۲۰، ۳۰، ۳۳، ۳۴، ۴۱، ۴۲]. آزمایشات برون تنی (*in vitro*) نشان داده اند که چنانچه نورون های هیپوکامپی و قشری در محیط کشت در معرض Hcy قرار گیرند، حساسیت و آسیب پذیری آن ها در برابر مسمومیت ناشی از تحریک بیش از حد (excitotoxicity) افزایش می یابد [۱۹، ۲۲].

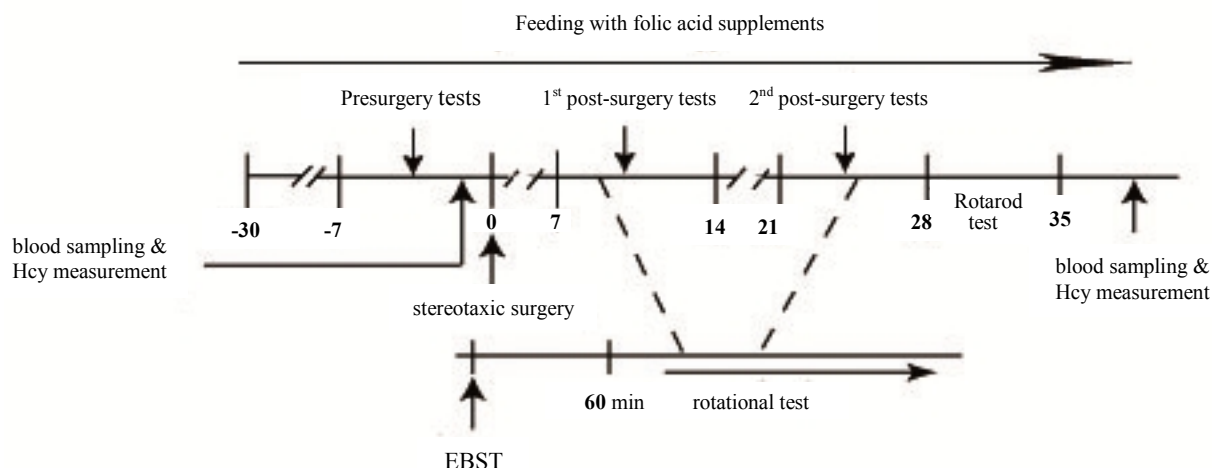
گزارشات زیادی نشان داده اند که سطح Hcy در پلاسما و CSF بیماران مبتلا به پارکینسون افزایش می یابد. بیان شده است که افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، دژنراسیون نورون های دوپامینرژیک را تسریع کرده و سبب پیشرفت بیماری پارکینسون می گردد [۹، ۲۸]. دووان و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که Hcy موجب تشدید استرس اکسیداتیو، نقص عملکرد میتوکندری ها و آپوپتوزیس در سلول های دوپامینرژیک انسانی می گردد که در معرض روتنون (یک نوع آفت کش) و یا یون آهن (که یک اکسیدانت بالقوه می باشد) قرار گرفته اند [۱۳]. همچنین مطالعات حیوانی نشان می دهند که تزریق موضعی Hcy به درون هسته جسم سیاه و یا استریاتوم علائم پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA و یا 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) را تشدید می نماید [۱۳، ۳۷].

هموسیستئین از متابولیسم اسید آمینه متیونین ایجاد می گردد که می تواند دوباره متیله شده و تبدیل به متیونین گردد. آنزیمی که واکنش اخیر را انجام می دهد نیاز به فولات و ب۱۲ دارد و کوانزیم های ب۱۲، فولات و ب۶ همراه با کولین سطح هموسیستئین سرم را کنترل می نمایند. از این رو کمبود این ویتامین ها سبب انباشت هموسیستئین می گردد. نشان داده شده است که کمبود فولات و ب۱۲ سبب آتروفی نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ و اختلال در فرآیندهای شناختی می گردد که در ارتباط با افزایش هموسیستئین می باشد [۲۹].

در این میان فولات دارای اهمیت خاصی می باشد چرا که یک ارتباط معکوس بین سطح پلاسمایی فولات با میزان

هموسیستئین پلاسما وجود دارد [۱۵]. مدل های کشت سلولی و حیوانی بیماری های نورودژنراتیو نشان داده اند که رژیم پایین فولات و یا سطح بالای هموسیستئین می تواند نورون ها را مستعد مرگ نماید. کمبود فولات و سطح بالای هموسیستئین منجر به تجمع آسیب های DNA و حساس شدن نورون ها به مسمومیت توسط پروتئین بتا آمیلوئید در مدل های تجربی آلزایمر شده و همچنین نورون های دوپامینرژیک را در مدل های تجربی پارکینسون در معرض خطر قرار می دهند [۱۱]. به غیر از کنترل سطح هموسیستئین خون، فولات به عنوان یک کوفاکتور در واکنش های بیوشیمیایی نقش ایفا می نماید. در سیستم عصبی مرکزی فولات برای سنتز اسیدهای نوکلئیک و واکنش های متیلاسیون ضروری می باشد. در همین ارتباط گزارش شده است که افزایش فولات در رژیم غذایی سبب کاهش خطر ابتلا به آلزایمر می گردد. در اشخاص با مشکل در عملکردهای شناختی که دارای سطح پایین فولات در خون می باشند استفاده از افزودنی های فولات سبب بهبود حافظه و عملکرد این اشخاص می شود. یکی از اهداف رادیکال های آزاد اکسیژن اسیدهای نوکلئیک می باشد که در این میان DNA موجود در میتوکندری ها (mtDNA) به ویژه آسیب پذیر می باشد چرا که فرآیند ترمیم در این DNA ضعیف بوده و این DNA در نزدیکی زنجیره تنفسی که محل تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد قرار دارد. آسیب اکسیداتیو به mtDNA سبب آپوپتوزیس نورون ها و ایجاد بیماری پارکینسون می گردد. گزارش های متعددی نشان داده اند که فولات در رژیم غذایی می تواند از انباشت mtDNA آسیب دیده جلوگیری نمایند. Chen و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که کمبود فولات در رژیم غذایی سبب حذف فولات در مغز شده و پرواکسیداسیون لیپیدها و آسیب به mtDNA در نواحی مختلف مغز را سبب می گردد. افزودن فولات به رژیم غذایی بافت های مغز را غنی از فولات کرده و مغزهای مستعد آلزایمر را در برابر آسیب های ناشی از کمبود فولات محافظت می نمایند [۸].

در این تحقیق اثر افزودن اسیدفولیک به میزان چندین برابر میزان مورد نیاز به رژیم غذایی بر ایجاد و شدت پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA در موش های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین سطح سرمی Hcy قبل از تزریق



شکل ۱- دیاگرام برنامه زمانی آزمایشات انجام شده در این تحقیق را نشان می دهد. حیوانات از یک ماه قبل از جراحی تا پایان آزمون های رفتاری با آب آشامیدنی حاوی دوزهای مختلف اسید فولیک تغذیه می شدند. جراحی استروئوتاکسیک و تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) یک ماه پس از شروع تغذیه با اسید فولیک صورت می گرفت. آزمون های 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 می گرفت و ۶۰ دقیقه پس از آن آزمون چرخشی انجام شد. آزمون روتارد در هفته پنجم پس از جراحی صورت گرفت. نمونه گیری از خون و اندازه گیری هموسیستئین در دو مرحله قبل از جراحی و پس از آزمون روتارد صورت گرفت.

موش های سالم در آنالیز نتایج آزمون روتارد مورد استفاده قرار گرفت. موش های سالم تحت عمل جراحی و دریافت سم 6-OHDA قرار نگرفته و همچنین هیچ گونه افزودنی اسیدفولیک نیز دریافت ننمودند. شمار موش ها در هر گروه ۱۲ سر بود.

در این تحقیق فرض گردید که غذای مصرفی موش ها دارای یک برابر حداقل میزان مورد نیاز ویتامین ها (minimum essential medium, MEM) بوده و ویتامین اضافی برای تأمین افزودنی اسیدفولیک مورد نیاز، به آب آشامیدنی حیوانات اضافه گردید. در جدول ۱ میزان فولات، غذا به شکل پلیت و آب آشامیدنی مورد نیاز روزانه در موش های صحرایی و همچنین میزان اسیدفولیک 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 [۲۵] بدست آمد.

طراحی آزمایش: شکل ۱ مراحل مختلف این تحقیق به همراه زمان بندی آن ها را نشان می دهد. تمامی موش ها (به غیر از گروه موش های سالم) از جمله گروه کنترل تحت جراحی استروئوتاکسیک و تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین ۱ ماه پس از شروع تغذیه با افزودنی اسیدفولیک قرار گرفتند. شدت پارکینسونیسم ایجاد شده به وسیله سه آزمون رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین، پیچش بدن بالا رفته (EBST) و روتارد

سم و در انتهای آزمون های رفتاری اندازه گیری گردید تا رابطه احتمالی بین سطح سرمی Hcy با مصرف بالای اسیدفولیک و همچنین شدت پارکینسونیسم ارزیابی گردد.

مواد و روش ها

حیوانات و گروه های آزمایشی: نمونه حیوانی در این

تحقیق موش های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار بودند که در محدوده وزنی ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم (در محدوده سنی ۳ تا ۴ ماهگی) در ابتدای تحقیق قرار داشتند. موش ها در حیوان خانه دانشگاه در قفس های بزرگ با ابعاد ۲۰ × ۵۹ × ۳۸ سانتی متر 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 نگه داری می شدند.

موش ها در ۴ گروه قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل که آب معمولی مصرف کرده و مطابق روش شرح داده شده پارکینسونی شدند. ۲ و ۳ و ۴ - گروه های فولات دو برابر (FA 2X)، فولات ۵ برابر (FA 5X) و فولات ۱۰ برابر (FA 10X) که آب آشامیدنی حاوی اسیدفولیک به میزان ۱، ۴ و ۹ برابر میزان طبیعی یک ماه قبل از جراحی تا پایان آزمون های رفتاری پس از جراحی دریافت نمودند. به غیر از گروه های ذکر شده نتایج یک گروه دیگر به نام گروه

جدول ۱- مقادیر حداقل نیاز روزانه (MEM) فولات، غذا و آب آشامیدنی در موش های صحرایی به همراه مقادیر اسید فولیک اضافه شده به آب آشامیدنی جهت تولید افزودنی اسید فولیک لازم نشان داده شده است. می بایستی توجه شود که غذای طبیعی موش ها حاوی ۱ برابر حداقل مورد نیاز روزانه اسید فولیک می باشد. لذا برای به عنوان مثال فراهم کردن افزودنی فولات به میزان ۵ برابر طبیعی، ۴ برابر حداقل نیاز روزانه به آب آشامیدنی اضافه می گردید.

	MEM (mg/kg diet)	Requirements for 2-fold Supplementation (mg/1L)	Requirements for 5-fold Supplementation (mg/1L)	Requirements for 10-fold Supplementation (mg/1 L)
Folic acid	0.2 mg/kg diet	1.25	5	11.25
Food	15 mg/day			
Drinking water	12 ml/day			

اپومرفین (آگونیست گیرنده های دوپامینرژیک) چرخش های پی در پی به سمت مقابل محل تزریق نشان می دهند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و تأثیر مداخله می باشد. برای اجرای این آزمون موش ها ابتدا در داخل یک استوانه پلکسی گلاس شفاف با ابعاد ۲۸ سانتیمتر قطر و ۳۸ سانتیمتر ارتفاع قرار داده می شدند و به آن ها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده می شد. سپس اپومرفین هیدروکلراید (0.5 mg/kg, i.p) به موش ها تزریق می شد و ۱۰ دقیقه پس از آن تعداد چرخش ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت ۱ ساعت ثبت می گردید. در پایان تعداد چرخش خالص موش ها 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 Borlongan و همکاران در سال ۱۹۹۵ [۴] انجام گرفت. به طور خلاصه دم موش از محدوده ۲ سانتی متری محل اتصال با بدن گرفته شده و به بالا آورده می شود 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 پیچش ها به هر طرف نشان دهنده شدت بیماری می باشد. تعداد پیچش ها به راست یا چپ در مدت زمان ۱ دقیقه شمارش می شد. انحراف در پیچش بدن به صورت $(\%) \frac{L}{(L+R)}$ و یا $(\%) \frac{R}{(R+L)}$ جایی که L: تعداد پیچش به چپ و R: تعداد پیچش به راست بودند، محاسبه گردیده و نمایش داده می شوند.

ج- آزمون روتارود: در این آزمون توانایی حرکتی، حفظ تعادل و همچنین یادگیری حرکتی حیوانات مورد ارزیابی قرار می گیرد. در این تحقیق آزمون روتارد بر اساس روش شرح داده

اندازه گیری گردید. به منظور جلوگیری از اختلالات ناشی از تبخیر آب و یا تخریب شیمیایی ویتامین ها آب آشامیدنی موش ها هر دو تا سه روز یک بار تعویض می گردید. نمونه گیری خون و اندازه گیری سطح هموسیستئین پلاسما در دو نوبت قبل از جراحی استرئوتاکسی و در پایان آزمون های رفتاری صورت گرفت.

جراحی استرئوتاکسی: یک ماه پس از شروع تغذیه با اسیدفولیک سم نوروتوکسیک 6-OHDA (با غلظت ۴ میکروگرم در هر میکرولیتر حل شده در سالین حاوی ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک) به وسیله جراحی استرئوتاکسیک به استریاتوم نیمکره راست با مختصات بر حسب برگما $AP: 0.2$, $L: -3.5$ و $DV: -8$ و بر اساس اطلس پاکسینوز و واتسون [۳۱] به مغز موش ها تزریق گردید. حیوانات ابتدا با استفاده از کتامین / زایلازین (6/60 mg/kg) بیهوش شده و سپس در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) قرار داده می شدند. با استفاده از سرنگ هامیلتون ۴ میکرولیتر از محلول حاوی سم 6-OHDA به درون ناحیه مورد نظر به آهستگی و در عرض ۵ دقیقه تزریق شد. در پایان سرنگ برای ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته می شد و به آهستگی با سرعت 1 mm/min از مغز بیرون آورده می شد. سم 6-OHDA سبب تخریب نورون های دوپامینرژیک در جسم سیاه طرف تزریق شده و مدل پارکینسونی را ایجاد می نماید.

آزمون های رفتاری:

الف- آزمون چرخش القا شده با اپومرفین: این آزمون بر اساس روش به کار برده شده توسط فوجی و همکاران ۱۹۹۶ [۱۴] صورت گرفت. به طور خلاصه چنانچه تزریق سم 6-OHDA سبب تخریب گسترده نورونی در هسته جسم سیاه گردد، ۲ تا ۴ هفته پس از جراحی، موش ها در قبال تزریق

می‌گردید.

ب- اندازه گیری هموسیستئین پلاسما: برای اندازه گیری 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 هموسیستئین متصل به پروتئین به نوع آزاد احیا گشته و سپس طی یک واکنش آنزیمی جداگانه به ماده S-adenosyl-L-Homocystein (SAH) تبدیل می‌شود. حال این ماده در یک واکنش الایزای رقابتی مورد سنجش قرار می‌گیرد که در آن با SAH متصل به جداره رقابت می‌کند. و در نهایت با استفاده از آنتی بادی‌های نشان‌دار با آنزیم HRP و نیز سوبسترای H_2O_2 ایجاد رنگ و کالبریمتری خواهد شد. در این فرایند، منحنی استاندارد با بکارگیری ۶ کالبراتور تهیه شد و از سه سرم کنترل با غلظت‌های کم، طبیعی و بالا استفاده شد که همگی در رنج‌های مطلوب بودند.

دقت تست و یا تکرار پذیری (CV%) آن کمتر از ۸٪ و حداقل میزان قابل اندازه گیری آن $1 \mu\text{mol/L}$ و خطی بودن آن تا $50 \mu\text{mol/L}$ بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها بر حسب میانگین بعلاوه منهای خطای معیار بیان شده‌اند. برای آنالیز آماری نتایج آزمون‌های رفتاری از آزمون Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA که به وسیله آزمون two-tailed Mann-Whitney U استفاده گردید. برای آنالیز آماری مقادیر هموسیستئین پلاسما از آزمون t-test: Two-Sample Assuming Equal Variances استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته می‌شد.

یافته ها

آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین: شکل ۲ اثر تغذیه با افزودنی اسیدفولیک 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 دوزهای بالاتر از حد طبیعی اسیدفولیک نمی‌تواند از ایجاد پارکینسونیسم القاء

شده توسط لاندبلد و همکاران [۲۳] 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 روتارد 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 در عرض ۱۲۰ ثانیه به حداکثر سرعت ۴۰ 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 ۶۰ دقیقه فاصله در نظر گرفته می‌شد. داده‌های آزمون روتارد بر اساس معیار ناحیه زیر منحنی area under the curve (AUC) که بر اساس فرمول زیر محاسبه می‌شود ارائه می‌شوند:

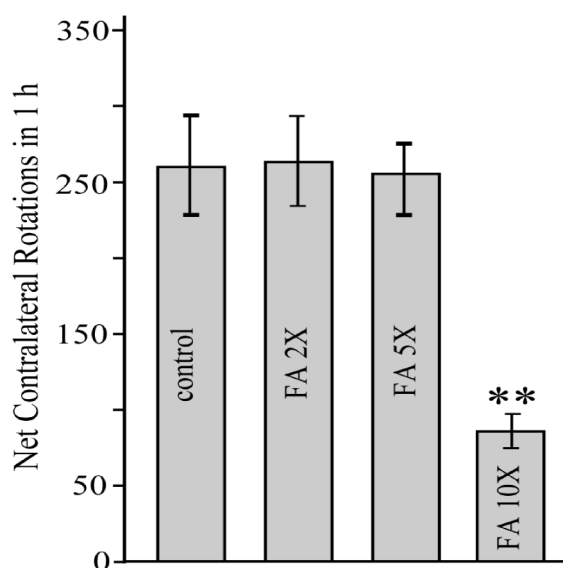
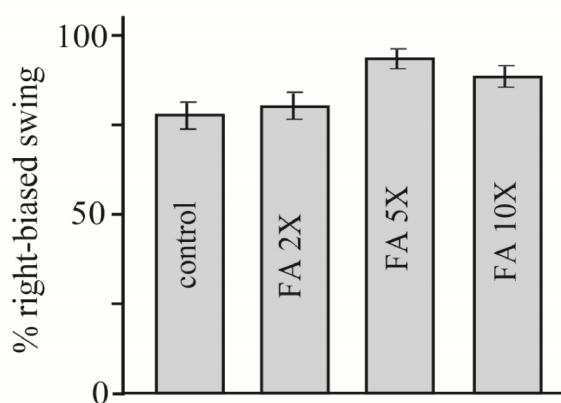
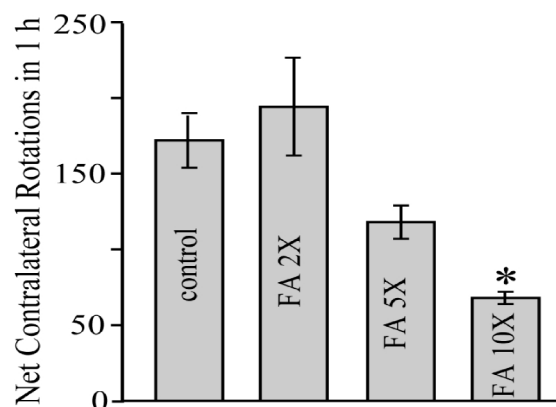
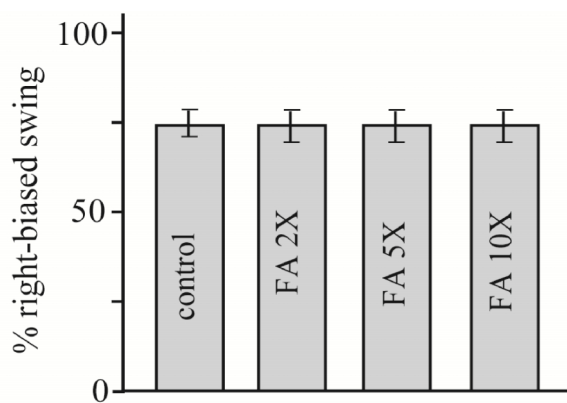
$$AUC = \text{time on the rod (s)} \times [\text{time on the rod(s)} \times 0.44/2]$$

0.44 عبارتست از میزان شتاب سرعت چرخش میله گردان

دستگاه در ثانیه

نمونه گیری خون و اندازه گیری هموسیستئین پلاسما: الف- نمونه گیری خون: نمونه گیری خون در ۲ 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 یک رستریئر مخصوص قرار گرفته به گونه ای 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 آشکار گردد. سپس خونگیری (بین ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر) با استفاده از scalp vein به عمل آمده و در یک میکروتیوب جمع آوری گردید.

در انتهای آزمایش‌ها نمونه خون از قلب حیوانات جمع آوری شد. به این صورت که ابتدا حیوانات با ترکیب کتامین / زایلازین بیهوش شده و سپس با استفاده از سرنگ ۵ ml از قلب خون جمع آوری می‌شد. نمونه خون‌های جمع آوری شده در 5000 rpm برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شده تا سرم از عناصر سلولی جدا گردد. سپس سرم در یک میکروتیوب در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه گیری هموسیستئین نگهداری



شکل ۳- هیستوگرام نتایج آزمون EBST در هفته دوم (بالا) و چهارم (پایین) پس از جراحی را نشان می دهد. هیچ گونه تفاوت معنی داری بین گروه مشاهده نشد. دقت شود که رقم ۵۰٪ نشان می دهد که تعداد پیچش ها به راست برابر بوده است با تعداد پیچش ها به چپ. مقادیر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

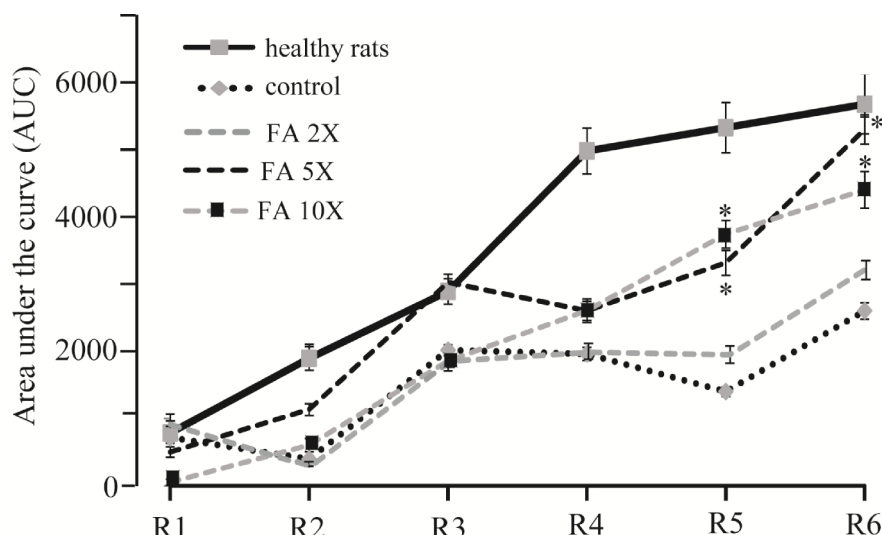
جراحی نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه ای (حدود ۳۰٪) را نشان می داد. آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین همچنین نشان می دهد که تغذیه با اسیدفولیک به میزان ۲ برابر حد طبیعی (گروه FA 2X) اثری بر شدت پارکینسونیسم القاء شده با 6-OHDA ندارد.

آزمون پیچش بدن بالا رفته: شکل ۳ اثر تغذیه با افزودنی اسیدفولیک را بر انحراف در پیچش موش ها در EBST در هفته های دوم و چهارم پس از جراحی نشان می دهد. هنگامی که موش های صحرایی از ناحیه دم بالا گرفته می شوند پیچش هایی را به سمت چپ یا راست بدن نشان می دهند. در موش های پارکینسونی شده توسط 6-OHDA این پیچش ها به یک سمت بدن متمایل و یا اصطلاحاً انحراف دارند. انحراف بیشتر نشان دهنده شدت بیشتر پارکینسونیسم می باشد. در این تحقیق در موش های گروه کنترل حدود ۷۵٪ از کل

شکل ۲- هیستوگرام نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین در هفته دوم (بالا) و چهارم (پایین) پس از جراحی را نشان می دهد. مقادیر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

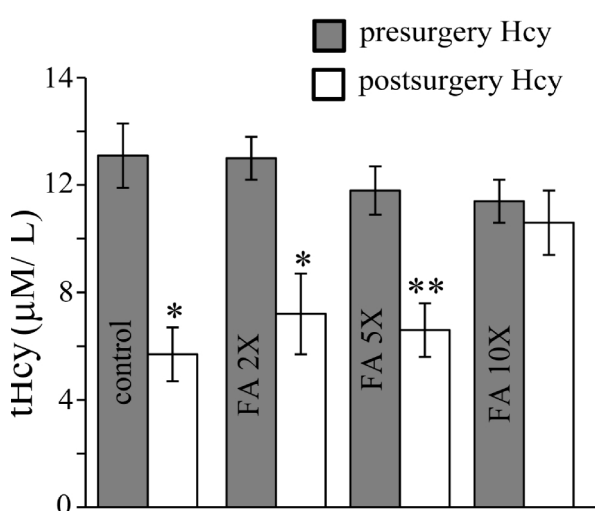
*: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$ in compared to control group, Kruskal-Wallis nonparametric test followed by Mann-Whitney U test.

شده با 6-OHDA جلوگیری نماید. با وجود این تغذیه با اسیدفولیک به میزان ۱۰ برابر نیاز طبیعی اثر قابل ملاحظه ای بر تعداد چرخش ها داشت. در گروه FA 10X تعداد چرخش ها به سمت مقابل محل تزریق در هر ۲ آزمون پس از جراحی بیش از ۶۰٪ کمتر از آن در گروه کنترل بود. همچنین تمامی گروه های آزمایشی، تعداد چرخش ها در دومین آزمون پس از جراحی نسبت به اولین آزمون به میزان قابل ملاحظه ای افزایش یافت لکن این افزایش در گروه FA 10X به میزان قابل ملاحظه ای کمتر از آن در دیگر گروه ها بود. تعداد چرخش ها در گروه FA 5X در اولین آزمون پس از



شکل ۴- عملکرد موش ها در گروه های مختلف آزمایشی در آزمون روتارد به تصویر کشیده شده است. موش ها سه روز پیپی، هر روز ۲ جلسه تحت این آزمون قرار گرفتند و زمان ماندن بر میله چرخان در آن ها ثبت می گردید. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن بر میله چرخان می باشد. مقادیر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

Kruskall-Wallis nonparametric test followed by Mann-Whitney U test. *: $P < 0.05$ در مقایسه با گروه

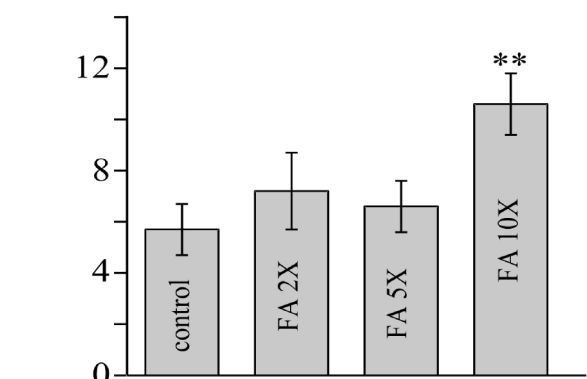
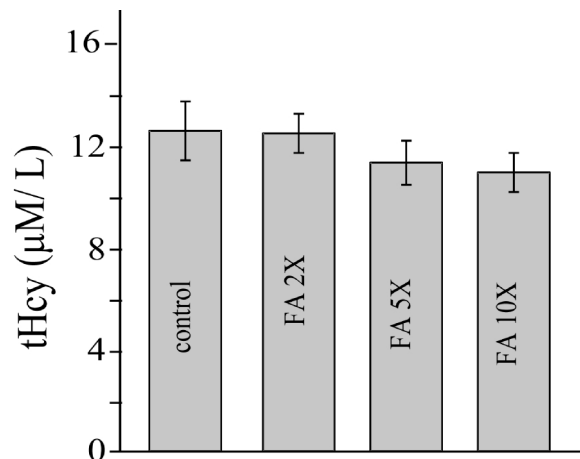


شکل ۶- مقایسه سطح هموسیستین کل سرم در گروه های آزمایشی قبل از جراحی با آن پس از جراحی. مقادیر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

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

پیچش های ثبت شده در مدت ۱ دقیقه در آزمون های پس از جراحی به سمت راست (محل تزریق سم) بود. نتایج مشابهی برای گروه های FA2X، FA5X و FA10X بدست آمد که نشان می دهد تغذیه با مقادیر بالای اسیدفولیک بر رفتار پیچشی موش های صحرایی درمان شده با سم 6-OHDA اثری ندارد.

آزمون روتارد: در آزمون روتارد توانایی حرکتی بویژه یادگیری حرکتی در موش ها مورد بررسی قرار می گیرد. در این



شکل ۵- میزان هموسیستین کل سرم در گروه های آزمایشی قبل (پانل بالا) و پس از (پانل پایین) جراحی. سطح هموسیستین پلاسما با روش Enzyme Immuno Assay (EIA) اندازه گیری گردید. مقادیر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۱۲ موش می باشد.

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

میزان هموسیستئین سرم موش های گروه های FA2X و FA5X تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان نمی داد این میزان در گروه FA10X به طور قابل توجه و معنی داری بیش از گروه کنترل بوده و برابر با $1/2 \pm 10/6$ میکرومول در لیتر بود.

نکته قابل توجه اختلاف قابل توجه و کاملاً معنی دار در سطح هموسیستئین سرم قبل و پس از جراحی و دریافت سم 6-OHDA بود. پس از جراحی سطح هموسیستئین سرم در گروه کنترل به میزان قابل ملاحظه ای کاهش یافته و از ۱۳ به حدود ۶ میکرومول در لیتر رسید. این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.012$, paired t-test). در گروه های FA2X و FA5X نیز سطح هموسیستئین سرم به میزان قابل توجه و معنی داری (به ترتیب $P < 0.05$ و $P < 0.002$) کمتر از آن در قبل از جراحی بود. لکن در گروه FA10X سطح هموسیستئین سرم پس از جراحی نسبت به آن در قبل از جراحی تفاوت قابل ملاحظه ای نشان نمی داد (شکل ۶).

بحث

در این مطالعه اثر تغذیه با افزودنی های اسیدفولیک به میزان چند برابر نیاز طبیعی بدن بر ایجاد و شدت پارکینسونیسم ایجاد شده بر اثر تجویز درون مغزی سم 6-OHDA مورد بررسی قرار گرفت. گزارشات مختلفی نشان می دهند که سطوح بالای هموسیستئین پلاسما با بیماری پارکینسون در ارتباط بوده و سبب تسریع مرگ نورون های دوپامینرژیک می گردد [۱، ۱۲، ۱۳، ۲۰، ۲۷، ۳۷، ۴۶]. از طرف دیگر فولات برای متابولیسم طبیعی هموسیستئین ضروری بوده و کمبود آن در ارتباط با افزایش سطح هموسیستئین پلاسما و نورودژنراسیون می باشد [۲، ۵، ۶، ۳۸]. از این رو ما فرض کردیم تغذیه با مقادیر بالای اسیدفولیک می تواند از ایجاد پارکینسونیسم جلوگیری کرده و یا حداقل از شدت آن بکاهد.

نتایج ما نشان می دهند که مصرف بالای اسیدفولیک به صورت وابسته به دوز سبب کاهش شدت پارکینسونیسم و نه جلوگیری از ایجاد آن می گردد به گونه ای که تغذیه با اسیدفولیک ۱۰ برابر طبیعی بیشترین اثر را داشت، اسیدفولیک ۵ برابر طبیعی اثرات خفیفی داشت و اسیدفولیک ۲ برابر طبیعی

مطالعه موش های سالم و غیر پارکینسونی به زودی و در جریان ۳ تا ۴ جلسه تمرین با دستگاه روتارد یاد گرفتند که چگونه بر روی میله چرخان این دستگاه قدم زده و تعادل خود را حفظ نمایند. این موش ها در جلسه سوم و یا چهارم آزمون به حداکثر زمان آزمون رسیده و یا به آن نزدیک شدند. از طرف دیگر موش های دریافت کننده سم 6-OHDA متعلق به گروه کنترل یادگیری ضعیفی را نشان دادند و هیچ گاه به زمان حداکثر آزمون نرسیدند (شکل ۴). در میان موش های دریافت کننده اسیدفولیک اضافی، گروه های FA5X و FA10X یادگیری خوبی نشان دادند و در جلسه ششم زمان ماندن آن ها بر میله چرخان دستگاه مشابه آن در گروه موش های سالم بود. از طرف دیگر موش های متعلق به گروه FA2X اجرای حرکتی ضعیفی را نشان داده و الگوی یادگیری آن ها مشابه با الگوی یادگیری در گروه کنترل بود.

سطح هموسیستئین سرم: میزان هموسیستئین کل

سرم در ۲ مرحله اندازه گیری شد: ۱- قبل از جراحی یعنی ۱ ماه پس از شروع تغذیه با افزودنی اسیدفولیک، ۲- در پایان آزمون های رفتاری

• سطح هموسیستئین سرم قبل از جراحی:

شکل ۵ پانل بالا سطح هموسیستئین سرم را در خون گروه های مختلف آزمایشی قبل از جراحی را نشان می دهد. میزان هموسیستئین سرم قبل از جراحی در گروه کنترل برابر بود با $1/2 \pm 13/1$ میکرومول در لیتر. سطح هموسیستئین کلی سرم در گروه های FA2X، FA5X و FA10X به ترتیب برابر با $0/8 \pm 11/4$ ، $0/9 \pm 11/8$ و $0/8 \pm 11/4$ میکرومول در لیتر بود. از نقطه نظر آماری تفاوت معنی داری در میزان هموسیستئین بین گروه های دریافت کننده فولات با گروه کنترل وجود نداشت.

• سطح هموسیستئین سرم در پایان

آزمون های رفتاری: شکل ۵ پانل پایین سطح هموسیستئین سرم را در گروه های مختلف آزمایشی در پایان آزمون های رفتاری نشان می دهد. میزان هموسیستئین سرم در این زمان در گروه کنترل برابر با $1 \pm 5/7$ میکرومول در لیتر بود. نتایج به دست آمده از گروه FA10X بسیار جالب می باشد. درحالی که

سطح هموسیستئین می‌شود که به افراد یا حیوانات با رژیم غذایی حاوی مقادیر کم فولات تجویز گردد.

سطح هموسیستئین پلاسما در اندازه گیری پس از جراحی در گروه های کنترل، فولات ۲ برابر و ۵ برابر به میزان معنی دار و قابل ملاحظه ای کمتر از آن در قبل از جراحی بود. 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 واکنش های متیلاسیون دارد و کاتکول آمین ها از جمله دوپامین به عنوان پذیرنده گروه های متیل در این واکنش درگیر می‌باشند [۴۰]. ممکن است به دلیل کاهش نورون های کاتکول آمینرژیک بر اثر تجویز سم تولید کاتکول آمین ها کاهش یافته و به دنبال آن واکنش های متیلاسیون و تولید هموسیستئین کاهش یافته باشد. این موضوع توجیه می‌کند که چرا سطح هموسیستئین در گروه فولات ۱۰ برابر پس از جراحی نسبت به قبل از جراحی تغییر نکرد زیرا سطوح بالای فولات با حفظ نورون های دوپامینرژیک تولید کاتکول آمین ها را در سطح طبیعی نگه داشته و از این رو تولید هموسیستئین همانند قبل از جراحی وجود داشته است. البته این توضیح مشخص نمی‌کند که چرا هموسیستئین در گروه فولات ۵ برابر که بهبود پارکینسونیسم را نشان می‌دادند پس از جراحی کاهش قابل ملاحظه ای یافته است.

۲- می‌تواند ناشی از اثر سن بر سطح هموسیستئین پلاسما باشد. در مطالعه ای که توسط مارتینز و همکاران (۲۰۰۵) [۲۴] انجام شد نشان داده شد که سطح هموسیستئین پلاسما در موش های صحرایی پس از تولد تا حدود سه ماهگی افزایش یافته و از 0.47 ± 0.094 به 0.67 ± 0.029 میکرومول در لیتر می‌رسد. از سه ماهگی به بعد هموسیستئین کاهش یافته و در شش ماهگی به 0.65 ± 0.042 و در بیست و هشت ماهگی به 0.81 ± 0.047 میکرومول در لیتر می‌رسد. در این مطالعه در هنگام جراحی و تزریق سم موش ها در حدود سه تا چهار ماه سن داشتند و اندازه گیری هموسیستئین پس از جراحی در پایان آزمون های رفتاری یعنی شش هفته پس از جراحی صورت گرفت. به عبارت دیگر در مرحله اندازه گیری دوم موش ها نزدیک به ۵ یا شش ماه سن داشتند. میزان هموسیستئین پلاسما در گروه کنترل پس از جراحی در حد این میزان در

بدون اثر بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که تغذیه یک ماهه با مقادیر بالای اسیدفولیک اثر معنی داری بر میزان هموسیستئین سرم ندارد. همچنین دو ماه تغذیه با اسیدفولیک به میزان ۱۰ برابر مصرف طبیعی آن همراه با تجویز سم 6-OHDA سبب گردید سطح هموسیستئین سرم به صورت معنی داری بالاتر از آن در گروه کنترل گردد که نشان می‌دهد اثر موثر اسیدفولیک بر کاهش شدت پارکینسونیسم از طریق کاهش سطح هموسیستئین سرم میانجی نمی‌شود.

نتایج ما در تایید نتایج چن و همکاران (۲۰۱۱) [۸] می‌باشد که گزارش نمودند ساپلمنت فولات نواحی مختلف مغز را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و ژنوتوکسیسیته میتوکندریایی محافظت نموده به میزان قابل ملاحظه ای مرگ نورونی ناشی از کمبود فولات را در موش های صحرایی که تحت تأثیر پیتید بتا آمیلوئید، یک شاخص مشخص در مغز بیماران آلزایمری، قرار گرفته اند را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، نتایج ما در توافق و همچنین عدم توافق با نتایج چندین مطالعه انسانی می‌باشد که ارتباط بین مصرف سطح بالای اسیدفولیک را با ریسک بیماری پارکینسون مورد بررسی قرار داده اند. یک مطالعه شاهد موردی در آلمان نشان می‌دهد که مصرف بالای فولات، ویتامین ب ۶ و ب ۱۲ و نه ریبوفلاوین سبب کاهش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون می‌گردد [۱۶]. از طرف دیگر یک مطالعه کوهورت پروسپکتیو در هلند نشان داد که مصرف بالای ب ۶ و نه فولات یا ب ۱۲ سبب کاهش خطر ابتلا به بیماری پارکینسون می‌گردد [۲۱]. در تضاد با این ۲ مطالعه، در یک مطالعه جامع که در آمریکا انجام شده است هیچ گونه ارتباطی بین میزان مصرف فولات، ب ۶ یا ب ۱۲ و خطر ابتلا به بیماری پارکینسون به دست نیامده است [۷، ۲۴].

نتایج ما نشان می‌دهد تغذیه با مقادیر بالای فولات نمی‌تواند سطح هموسیستئین سرم را کاهش دهد. این نتیجه بر خلاف گزارشی است که بیان می‌کند سطح هموسیستئین پلاسما در رابطه عکس با میزان مصرف فولات می‌باشد [۱۲]. البته لازم به ذکر است که بیشتر مطالعاتی که ارتباط بین مصرف فولات با هموسیستئین را بررسی نموده اند اثر کمبود فولات را بر هموسیستئین مطالعه نموده اند [۶، ۱۰، ۱۲، ۱۷، ۴۰]. به عبارت دیگر افزودنی فولات هنگامی سبب کاهش

عملکرد ناقص میتوکندری ها ناشی از اکسیداسیون DNA و RNA، پروتئین و لیپیدهای غشایی می باشد. اکسیداسیون ساختار بسیاری از آنزیم ها را تغییر داده و سبب کاهش تمایل آنها به سوبستراها یا کوانزیم هاشان شده و از این طریق فعالیت آنها را کاهش می دهد. از این رو تغذیه میزان بالایی از کوفاکتورهای میتوکندریایی و سوبستراهای آنزیم های میتوکندریایی می تواند برخی اثرات ناشی از کهولت سن را معکوس نماید زیرا سطوح بالای سوبستراها و کوفاکتورها می تواند به آنزیم ها متصل شده و محل فعال آنها را از آسیب اکسیداتیو محافظت نموده و فعالیت آنزیم هایی که به دلیل استرس اکسیداتیو تا حدودی آسیب دیده اند را افزایش دهد. پیشنهاد شده است که درمان با دوزهای بالای ویتامین B می تواند آنزیم های مختلف را که بر اثر عوامل مختلف مانند پیری و یا بیماری های ژنتیکی تمایل اتصال با کوانزیم کاهش یافته دارند را تحریک نماید. ویتامین های B پیش ساز کوفاکتورهای آنزیم های میتوکندریایی می باشند. تیمار با ویتامین های B بیش از ۲ هفته منجر به کاهش اکسیدانت ها، افزایش مصرف اکسیژن و افزایش فعالیت کمپلکس I و افزایش بیان PGC-1 α می گردد [۱۸].

در این مطالعه ما نشان دادیم که مصرف مقادیر بالای اسید فولیک اثرات ضد پارکینسونی داشته که احتمالاً از طریق حفاظت نورو ن های دوپامینرژیک هسته جسم سیاه در برابر نورو توکسین 6-OHDA میانجی می شود. اثر ضد پارکینسونی افزودنی فولات وابسته به دوز بوده و مصرف فولات ۱۰ برابر میزان طبیعی بیشترین اثر حفاظت نورو ن را دارد در حالی که فولات ۲ برابر حد طبیعی اثر مشخصی نداشت. اندازه گیری سطح هموسیستئین سرم نشان داد که افزودن فولات به آب آشامیدنی سبب کاهش سطح هموسیستئین سرم نمی شود و اثرات ضد پارکینسونی افزودنی های فولات از طریق کاهش سطح این ماده میانجی نمی شود. اثر ضد پارکینسونی فولات احتمالاً از طریق حفاظت آنزیم های میتوکندریایی از آسیب توسط استرس اکسیداتیو و همچنین فعال نمودن آنزیم های آسیب دیده از اختلالات میتوکندریایی سبب حفاظت نورو ن ها و کاهش شدت بیماری پارکینسون گردیده است. همچنین نتایج ما نشان می دهد که دریافت میزان بالای فولات در موش های دریافت کننده سم 6-OHDA می تواند سبب

موش های ۶ ماهه در گزارش مارتینز و همکاران می باشد. این مطلب نشان می دهد که تزریق سم 6-OHDA و تخریب نورو ن های کاتکول آمینرژیک بر سطح هموسیستئین سرم اثری ندارد. البته سطح بالای هموسیستئین در سرم موش های متعلق به گروه فولات ۱۰ برابر همچنان مورد سؤال می باشد. ما هیچ گونه منبعی که این نتیجه را توجیه نماید در دست نداریم. ممکن است بر هم کنش فولات و 6-OHDA که هر دو می توانند بالقوه واکنش های متیلاسیون در گیر در متابولیسم هموسیستئین را تحت تأثیر قرار دهند دخالت داشته باشد. تولید هموسیستئین به واکنش های متیلاسیون وابسته است و فولات در انجام این واکنش ها دخالت دارد. همچنین افزایش میزان هموسیستئین می تواند از پلی مورفیسم ها متعدد ژن های درگیر در متابولیسم این ماده، ناشی شود [۳۹].

در مجموع نتایج ما نشان می دهند که اثر افزودنی فولات در کاهش شدت پارکینسونیسم نقش دارد که از طریق کاهش سطح هموسیستئین سرم میانجی نمی شود. این یافته در تضاد با مطالعات حیوانی است که نشان می دهد اینفوژیون هموسیستئین به درون هسته جسم سیاه و یا استریاتوم در موش هایی که توسط سموم پارکینسون 6-OHDA و MPTP درمان شده اند، سبب تشدید پارکینسونیسم در این حیوانات می گردد [۴۵، ۱۳]. از طرف دیگر نتایج ما هم راستا با برخی مطالعات انسانی است که نشان می دهند هیچ گونه ارتباطی بین بیماری پارکینسون و هموسیستئین وجود ندارد [۴۳، ۲۱]. با این وجود برخی مطالعات نشان داده اند که سطح هموسیستئین در خون بیماران پارکینسونی بیش از افراد سالم می باشد [۴، ۱۴، ۲۳، ۳۱]. البته دیگر نویسندگان این افزایش را ناشی از درمان با ال-دوپا در نظر گرفته اند [۳۶، ۳۵، ۳۱، ۲۶].

از این رو چنانچه اثر افزودنی فولات در کاهش شدت پارکینسونیسم القاء شده با 6-OHDA از طریق کاهش سطح هموسیستئین پلازما میانجی نمی شود، پس مکانیسم یا مکانیسم های درگیر در این اثر چه می باشند؟ استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری ها از مهم ترین مکانیسم های درگیر در پاتوفیزیولوژی بیماری پارکینسون عنوان شده اند. سمومی که در حیوانات ایجاد پارکینسون می نمایند مانند 6-OHDA، MPTP و روتنون از طریق مهار کمپلکس I میتوکندریایی و آسیب اکسیداتیو عمل می نمایند [۴۴، ۳۲، ۹].

افزایش سطح هموسیستتین سرم گردد.

سپاسگزاری

منابع مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین تأمین شده است. نویسندگان مقاله از آقای دکتر جهانی هاشمی

دانشیار گروه آمار حیاتی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت محاسبات آماری این مقاله و همچنین خانم‌ها الهام هادی بیگی و فاطمه واعظی، دانشجویان پزشکی این دانشگاه جهت همکاری‌شان در انجام آزمون‌های رفتاری و خون‌گیری از موش‌ها سپاسگزاری می‌نمایند.

References

- [1] Allain P, Le Bouil A, Cordillet E, Le Quay L, Bagheri H, Montastruc J L, Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 16 (1995) 527-29.
- [2] Balk E, Chung M, Raman G, Tatsioni A, Chew P, Ip S, DeVine D, Lau J, B vitamins and berries and age-related neurodegenerative disorders. *Evid Rep Technol Assess* 134 (2006) 1-161.
- [3] 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* 39 (2001) 721-724.
- [4] 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* 676 (1995) 231-4.
- [5] Bottiglieri T. Folate, vitamin B12 and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev* 54 (1996) 382-390.
- [6] Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I, Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis* 29 (2006) 3-20.
- [7] 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* 160 (2004) 368-375.
- [8] Chen TF, Chiu MJ, Huang CT, Tang MC, Wang CC, Huang RF, Changes in dietary folate intake differentially affect oxidized lipid & mitochondrial DNA damage in various brain regions of rats in the absence/presence of intracerebroventricularly injected amyloid β -peptide challenge. *Br J Nutr* 105 (2011) 1294-302.
- [9] Dauer W, and Przedborski S, Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39 (2003) 889-909.
- [10] de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ, Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determinants the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54 (2002) 599-618.
- [11] Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol* 57 (2000) 1422-1427.
- [12] dos Santos EF, Busanello EN, Miglioranza A, Zanatta A, Barchak AG, Vargas CR, et al, Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis.* 24 (2009) 257-69.
- [13] 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* 80(2002) 101-110.
- [14] 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* 39 (1996) 127-136.
- [15] Giles WH, Kittner SJ, Anda RF, Croft J B, Casper ML, Serum folate and risk for ischemic stroke. First National Health and Nutrition Examination Survey epidemiologic follow-up study. *Stroke* 26 (1995) 1166-70.
- [16] 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* 47 (1996) 644-650.
- [17] Jacques PF, Bostom AG, Wilsin PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J, Determinants of plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 73 (2001) 613-621.

- [18] Jia H, Liu Z, Li X, Feng Z, Hao J, Li X, Shen W, Zhang H, Liu J, Synergistic anti-Parkinsonism activity of high doses of B vitamins in a chronic cellular model. *Neurobiol Aging* 31 (2010) 636-46.
- [19] 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* 20 (2000) 6920-6.
- [20] Kuhn W, Roebroek R, Blom H, Van Oppenraaj D, Przuntek H, Kretschmer A, et al, Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 40 (1998) 225-7.
- [21] Lau LM, Koudstaal PJ, Van Meurs JBJ, Uitterlinder AG, Hofman A, Breteler MMB, Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and PD. *Ann Neurol* 57 (2005) 927-930.
- [22] 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* 94 (1997) 5923-8.
- [23] 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* 84 (2003) 1398-410.
- [24] Martins PJF, Galdieri LC, Souza FGA, Andersena ML, Benedito-Silva AA, Tufika S, et al. Physiological variation in plasma total homocysteine concentrations in rats. *Life Sci* 76 (2005) 2621-9.
- [25] Matter F, *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* Washington, D.C.: NATIONAL ACADEMY PRESS, 1995.
- [26] 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* 60 (2003) 1125-29.
- [27] Obeid R, Herrman W, Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 580 (2006) 2994-3005.
- [28] Olaf S, Fowler B, Piertz K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, Lorenz S, Linnebank M, Homocysteine, folate & vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review & treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 9 (2009) 1393-1412.
- [29] Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto JM, Schroeder H, Daval JL, Martinez-Fong D, Gueant JL, Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PLoS One* 21 (2009) 4-12.
- [30] O' Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB J, Bottiglieri T, et al, Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 61 (2004) 865-868.
- [31] Paxinos G, Watson C, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press, 2007.
- [32] Przedborski S., Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord Suppl* 1 (2005) S3-7. Review
- [33] Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, et al, Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam Scan Study. *Neurology* 59 (2002) 1375-1380.
- [34] Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Tettamanti M, Lucca U, Homocysteine and B vitamins in mild cognitive impairment and dementia. *Clin Chem Lab Med* 43 (2005) 1096-1100.
- [35] Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Peplonska B, Lolk J, Chodakowska-Zebrowska M, et al, Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 404 (2006) 56-60.
- [36] Rogers JD, Sanchez-Saffon A, Frol AB, Diaz-Arrastia R, Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease. *Arch Neurol* 60 (2003) 59-64.
- [37] Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, Looi JC, Brodaty H, Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. *Neurology* 58 (2002) 1539-1541.
- [38] Scott JM, Dinn JJ, Wilson P, Weir DGP, Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methylgroup deficiency. *Lancet* 2 (1981) 334-7.
- [39] Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 19 (1999) 217-246.
- [40] Selhub J, The many facets if hiperhomocysteinemia: studies from the Framingham Cohorts. *J Nutr* 136

- (2006) 1726-30.
- [41] 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* 346 (2002) 476-483.
- [42] 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* 159 (2002) 2099-2101.
- [43] Todorovic Z, Dzoljic E, Novakovic I, Mirkovic D, Stojanovic R, Nesic Z, et al, Homocysteine serum levels and MTHFR C677T genotype in patients with Parkinson's disease, with and without levopoda therapy. *J Neurol Sci* 248 (2006) 56-61.
- [44] Tsang A.H.K and Chung K.K.K, Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792 (2009) 643-650.
- [45] 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* 22 (2008) 12-17.
- [46] Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, and Nakashima K, Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa treated patients with PD. *Neurology* 55 (2000) 437-440.