

تاثیر رزوراترول بر روی حافظه موش های صحرایی مبتلا به مقاومت انسولینی

1- سیامک ریحانی راد، 2- جواد محمودی

1- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند، ایران

2- مرکز تحقیقات علوم اعصاب NSRC، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

rad.pharma@gmail.com

mahmoudi2044@yahoo.com

چکیده

مصرف غذاهای پرچرب (High Fat Diet) یک فاکتور خطر برای ابتلا به بیماری هایی مانند دیابت شیرین و بیماری های نورودژنراتیو مثل آلزایمر محسوب می شود. رزوراترول از مواد طبیعی پلی فنلی مشتق شده از گیاهان است و در پوست انگور قرمز و سیاه، کشمش، سیاه، توت و بادام زمینی یافت می شود و خاصیت ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر رزوراترول بر روی عملکرد مغز در موش های صحرایی دیابتی (دارای مقاومت انسولینی) بود. بدین منظور 36 سر موش صحرایی نر ویستار با وزن اولیه 180-200 گرم بطور تصادفی در سه گروه جای داده شدند.

گروه یک (گروه کنترل): دریافت کننده رژیم غذایی نرمال

گروه دو: دریافت کننده HFD (10 هفته) به همراه استرپتوزوسین (35 mg/kg, S.C)

گروه سه: دریافت کننده HFD (10 هفته) به همراه استرپتوزوسین و رزوراترول (20 mg/kg, S.C) (4 هفته)

یادگیری و حافظه توسط تست رفتاری بارنز (Barnes Test) با ثبت زمان صرف شده در ربع صفحه (target quadrant) و زمان لازم برای پیدا کردن محفظه (latency time) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) و فاکتورهای آنتی اکسیدانی (Superoxide dismutase و Total Antioxidant Capacity) مغز پس از کشتن موش ها و جداسازی مغز و هیپوکامپ آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از یک طرف دیابت زمان صرف شده در ربع صفحه را کاهش داده ($P < 0.01$) در حالیکه زمان لازم برای پیدا کردن محفظه را افزایش می دهد ($P < 0.01$). از طرف دیگر موش های دیابتی دریافت کننده رزوراترول زمان صرف شده بیشتری در ربع صفحه داشتند ($P < 0.05$) در حالیکه زمان لازم برای پیدا کردن محفظه کاهش یافته بود ($P < 0.01$). علاوه بر آن در موش های گروه دوم میزان BDNF ($P < 0.001$)، SOD ($P < 0.001$) و TAC ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل بطور قابل توجهی کاهش یافته بود در حالیکه

افزایش معنی داری در میزان BDNF ($P < 0.001$), SOD ($P < 0.001$) و TAC ($P < 0.01$) در موش های دیابتی دریافت کننده رزوراترول در مقایسه با موش های دیابتی مشاهده گردید. ما نشان دادیم که رزوراترول ضمن کاهش قند خون عملکرد شناختی را بهبود می بخشد و این می تواند ناشی از افزایش BDNF و عوامل آنتی اکسیدانی باشد. با این وجود بررسی های بیشتری لازم است تا مکانیسم دقیق تاثیر رزوراترول بر روی اختلالات شناختی روشن شود.

کلمات کلیدی: رزوراترول، حافظه، مقاومت انسولینی، موش صحرایی

1. مقدمه

دیابت شیرین نوع 2 (مقاومت انسولینی) بیماری مزمن متابولیکی است که میزان بروز آن در سراسر جهان با سرعت هشدار دهنده رو به افزایش است (1). در چند دهه گذشته مصرف HFD (رژیم غذایی با چربی بالا) بطور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. این نوع رژیم غذایی منجر به سندرم متابولیک و چاقی اپیدمیک شده است. چاقی نیز منجر به افزایش فشار خون، افزایش کلسترول، دیابت نوع 2 و سایر اختلالات متابولیکی می تواند بشود (2). مطالعات اخیر بر اهمیت اجزاء رژیم غذایی و تاثیر آن بر روی تنظیم عملکرد سیستمهای مولکولی دخیل در حفظ سلامت و عملکرد نوروها تاکید دارند. تغذیه بعنوان جزئی از زندگی روزانه ما می تواند سلامت و عملکرد مغز از جمله فعالیت های شناختی آن را تنظیم کند. پی بردن به مکانیسم هایی که توسط آن رژیم غذایی می تواند بر شکل پذیری عصبی و شناخت تاثیر بگذارد از چالشهای مهم می باشد (3). مطالعات زیادی برای فهم مکانیسمهای تاثیر HFD بر روی حافظه، شناخت و یادگیری انجام گرفته است. در این میان اکسیداتیو استرس و کاهش BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) از عوامل مهم مطرح شده می باشد (4).

رزوراترول از مواد طبیعی پلی فنلی مشتق شده از گیاهان است و در پوست انگور قرمز و سیاه، کشمش سیاه، توت و بادام زمینی یافت می شود و اثرات مفیدی بر روی سلامتی دارد که می توان به مواردی مانند خاصیت ضد پیری، ضد دیابتی، ضد التهابی، محافظت از سیستم عصبی، محافظت از قلب و عروق و خاصیت آنتی اکسیدانی آن اشاره کرد (5). هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر رزوراترول بر روی عملکرد مغز موش های صحرایی دیابتی (دارای مقاومت انسولینی) بود و برای نیل به این هدف از تست رفتاری بارنز (Barnes Test) و همچنین آزمایشات مولکولی مانند سنجش میزان آنتی اکسیدان های مغز (superoxide dismutase و Total Antioxidant Capacity) و BDNF (فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز) کمک گرفته شد.

2. مواد و روش کار

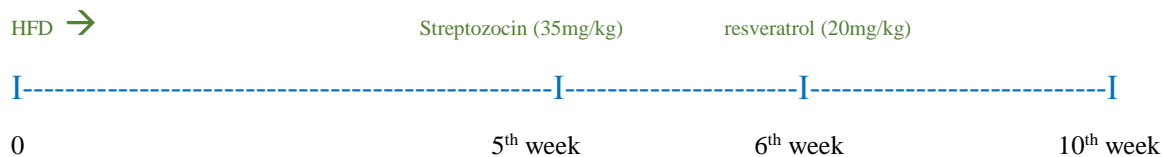
این تحقیق یک مطالعه تجربی بود که در آن از رتهای نر بالغ با نژاد Wistar در محدوده وزنی 180-200 گرم و به تعداد 36 سر استفاده شد. رت ها ابتدا به صورت تصادفی در گروههای زیر قرار گرفتند:

(1) گروه غیر دیابتی سالم (گروه کنترل سالم): رتها بمدت 10 هفته به همراه رتهای دیابتی نگهداری شدند و رژیم غذایی نرمال دریافت کردند.

(2) گروه دیابتی (گروه کنترل دیابتی): رتها توسط استرپتوزوسین مبتلا به دیابت نوع دو شدند و بمدت 10 هفته رژیم غذایی پرچرب (HFD) دریافت کردند.

(3) گروه دیابتی - resveratrol: رتهای دیابتیک بمدت 10 هفته رژیم HFD دریافت کردند، و در 4 هفته آخر این دوره و قبل از کشتن آنها، تحت درمان با رزوراترول (20 mg/kg S.C/ daily) قرار گرفتند.

درهمه گروه های دیابتی، رت ها رژیم غذایی پر چرب اشباع شده (58% کالری از چربی اشباع) دریافت کردند. در هفته پنجم، 35mg/kg استرپتوزوتوسین به روش داخل صفاقی (S.C) تزریق شد و رژیم غذایی پرچرب تا روز کشتن حیوان ادامه یافت. مدت دوره دیابتی 10 هفته بوده و به صورت هفتگی وزن بدن و غذای دریافتی ثبت گردید. در گروه سوم، جهت پیش درمانی رتها به مدت 28 روز قبل از کشتن تحت درمان با رزوراترول (20 mg/kg S.C/ daily) قرار گرفتند.



جهت تعیین تاثیر رزوراترول بر روی حافظه موش ها، از آزمون رفتاری Barnes Maze استفاده شد. این تست برای ارزیابی حافظه فضایی جوندگان (موش) کاربرد داشته و از یک صفحه مدور شامل یک صفحه مسطح گرد با تعدادی چاله در محیط آن تشکیل شده است. در زیر فقط یکی از این چاله ها جعبه ای (escape box) قرار داده شده و هدف پیدا کردن این چاله توسط موش (البته پس از آموزشهای لازم می باشد). (چون در بقیه چاله ها جعبه ای در زیرشان وجود ندارد، بنابراین موشها نمی توانند داخل آنها بیفتند). در این مطالعه دو پارامتر ارزیابی شده است:

1- زمان لازم جهت پیدا کردن چاله حاوی جعبه (latency time)

2- زمان صرف شده در ربع صفحه ای که چاله جعبه دار در آن قسمت قرار دارد. (target quadrant)

قدرت یادگیری، حافظه و قابلیت انعطاف پذیری در شناخت موشها با اندازه گیری مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن چاله مورد نظر (latency time) و همچنین زمانی که موش در ربع صفحه حاوی چاله جعبه دار سپری می کند (target quadrant)، مورد سنجش قرار می گیرد.

به منظور ارزیابی میزان BDNF از کیت تجاری (Elabsciences-China) استفاده شد و میزان این فاکتور در مغز گروههای مورد مطالعه بروش ELISA و طبق پروتکل توصیه شده توسط شرکت سازنده کیت مورد سنجش قرار گرفت و همچنین به منظور ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو، میزان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) در مغز (بخش هیپوکامپ) گروههای مورد مطالعه اندازه گیری شد. برای مقایسه تفاوت آماری بین گروه های مورد بررسی از آنالیز واریانس و پس آزمون Tukey و برای مقایسه بین دو گروه از Student t-test استفاده شده است. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

3. نتایج

در گروهی از حیوانات دیابتی (دریافت استرپتوزوسین در هفته پنجم) که بمدت 10 هفته تحت رژیم غذایی پرچرب بودند، در پایان هفته دهم تحت آزمون ماز بارنز قرار گرفتند و زمان صرف شده در ربع صفحه ناحیه دارای محفظه اندازه گیری شد. نتایج نشان می دهد این زمان (ثانیه) در گروه دیابتی بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($P < 0.01$). شکل 1.

همچنین در همین گروه زمان لازم جهت پیدا کردن محفظه هدف اندازه گیری شد. نتایج نشان می دهد این زمان (ثانیه) در گروه دیابتی در روزهای دوم، سوم و چهارم بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($P < 0.05$ و $P < 0.01$). شکل 2.

در گروهی از حیوانات دیابتی که تحت درمان با رزوراترول ($20 \text{ mg/kg/daily, S.C}$) بمدت 4 هفته قرار گرفته بودند، در پایان هفته چهارم آزمون ماز بارنز انجام گرفت و زمان صرف شده در ربع صفحه ناحیه دارای محفظه اندازه گیری شد. نتایج نشان می دهد این زمان (ثانیه) در گروه تحت درمان با رزوراترول بطور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافته است ($P < 0.05$).

شکل 1. همچنین در همین گروه زمان لازم جهت پیدا کردن محفظه هدف اندازه گیری شد و نتایج نشان داد این زمان (ثانیه) در گروه تحت درمان با رزوراترول بطور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی در روزهای دوم، سوم و چهارم کاهش یافته است ($P < 0.05$) و

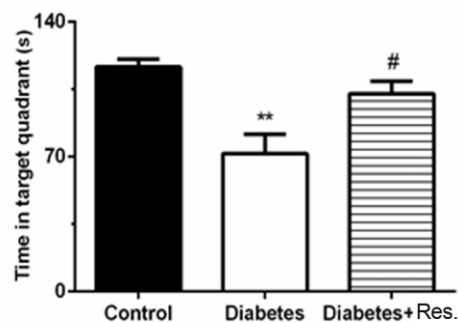
شکل 2. ($P < 0.01$).

نتایج حاصل از بررسی میزان BDNF مغز در گروه های سه گانه نشان می دهد که دیابت بطور معنی داری میزان BDNF را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد ($P < 0.001$). شکل 3 و در گروهی از حیوانات دیابتی که تحت درمان با رزوراترول (20 mg/kg/daily, S.C) بمدت 4 هفته قرار گرفته بودند، میزان BDNF بطور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافت. ($P < 0.001$). شکل 3

در گروه دیابتی یا مبتلا به مقاومت انسولینی نتایج نشان می دهد دیابت بطور معنی داری میزان SOD (سوپراکسید دسموتاز) را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد ($P < 0.001$). در حالیکه گروهی از حیوانات دیابتی که تحت درمان با رزوراترول (20 mg/kg/daily, P.O) بمدت 4 هفته قرار گرفته بودند، میزان SOD بطور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافته بود ($P < 0.001$). شکل 4

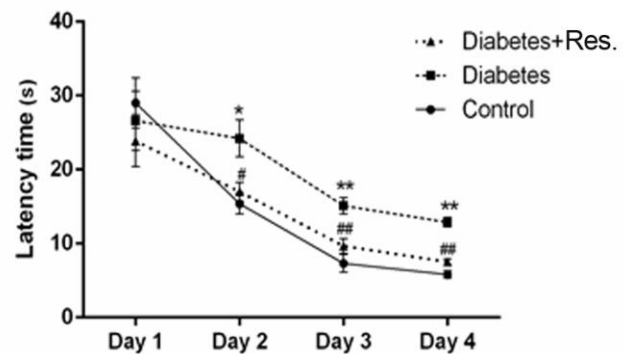
در گروه دیابتی بررسی میزان TAC (ظرفیت تام آنتی اکسیدانی) مغز نشان می دهد که این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود ($P < 0.01$). در حالیکه در گروهی از حیوانات دیابتی که تحت درمان با رزوراترول بودند، میزان TAC مغز بطور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی افزایش نشان داد ($P < 0.01$). شکل 5

4. اشکال

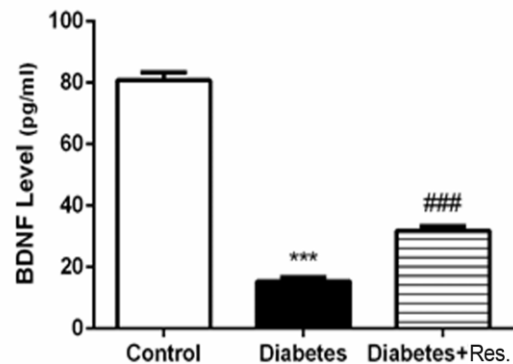


شکل 1- اثرات دیابت و رزوراترول (20 mg/kg/day) بر زمان صرف شده در ربع صفحه (ناحیه دارای محفظه هدف) در تست بارنز. داده ها بشکل mean \pm SEM نشان داده شده اند. $N=12$ حیوان در هر گروه. * $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل و # $P < 0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی.

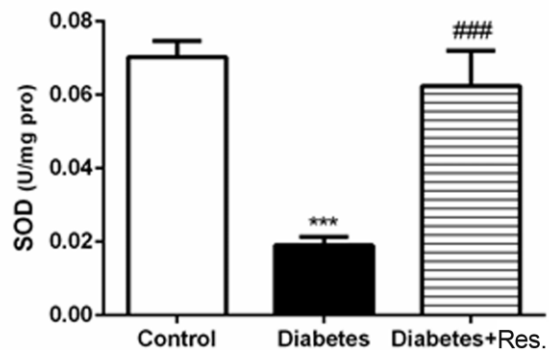
Res=Resveratrol



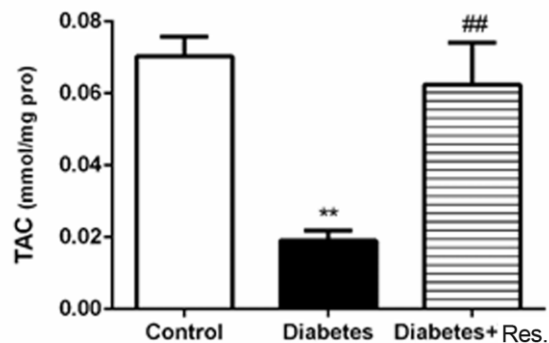
شکل 2- اثرات دیابت و رزوراترول (20mg/kg/day) بر زمان لازم جهت پیدا کردن محفظه هدف در تست بارنز. داده ها ب شکل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند. $N=12$ حیوان در هر گروه. * $P<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل و # $P<0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی در روز دوم. ** $P<0.01$ در مقایسه با گروه کنترل و ## $P<0.01$ در مقایسه با گروه دیابتی در روز سوم و چهارم. Res=Resveratrol.



شکل 3- اثرات دیابت و رزوراترول (20 mg/kg/day) بر میزان BDNF هیپوکامپ. داده ها ب شکل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند. $N=12$ حیوان در هر گروه. *** $P<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و ### $P<0.001$ در مقایسه با گروه دیابتی. Res=Resveratrol.



شکل 4- اثرات دیابت و رزوراترول (20mg/kg/day) بر میزان BDNF هیپوکامپ. داده ها ب شکل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند. $N=12$ حیوان در هر گروه. $P<0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل و $P<0.001$ ### در مقایسه با گروه دیابتی. Res=Resveratrol.



شکل 5- اثرات دیابت و رزوراترول (20mg/kg/day) بر میزان TAC هیپوکامپ. داده ها ب شکل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند. $N=12$ حیوان در هر گروه. $P<0.01$ ** در مقایسه با گروه کنترل و $P<0.01$ ## در مقایسه با گروه دیابتی. Res=Resveratrol.

5. نتیجه گیری

در چند دهه گذشته سبک زندگی و الگوی مصرف مواد غذایی تغییر یافته است، بطوریکه زندگی صنعتی تمایل جوامع بطرف مصرف غذاهای آماده و فست فود را افزایش داده است. مطالعات نشان می دهد مصرف رژیم غذایی پرچرب یکی از عوامل خطر و زمینه ساز برای ایجاد تغییرات فیزیولوژیک و تبدیل آن به اختلالاتی از جمله دیابت شیرین، مقاومت انسولینی، چاقی و سندرم متابولیک می باشد. ما در این مطالعه موش های رت را بمدت 10 هفته با جیره غذایی پر چرب تغذیه کردیم و در هفته پنجم تزریق استریتوزوسین (35mg/kg) را جهت القا دیابت انجام دادیم. ادامه تغذیه با غذای پرچرب پس از تزریق استریتوزوسین مدل حیوانی مقاومت انسولینی

را بوجود می آورد که همراه با افزایش قند خون و وزن همراه است. در ادامه و در هفته ششم گروهی از رتھای مبتلا به مقاومت انسولینی رزوراترول را بمدت 4 هفته با دوز 20 میلیگرم بر کیلوگرم تا قبل از خونگیری و کشته شدن دریافت کردند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات رزوراترول بر روی رفتار شناختی (یادگیری و حافظه) و فاکتورهای بیوشیمیایی (شاخص های استرس اکسیداتیو و BDNF) موش های صحرایی مبتلا به مقاومت انسولینی بود. مطالعات نشان می دهد رزوراترول اثرات محافظت کنندگی روی سلول های عصبی (نوروپروتکتیو) را دارا می باشد. اثرات نوروپروتکتیوی رزوراترول از طریق فعال کردن مسیر CREB/BDNF اعمال می شود (6). نتایج مطالعات ما نیز در همین راستا بوده و نشان می دهد رزوراترول قادر است اختلالات یادگیری و نقص در رفتارهای شناختی را بهبود ببخشد که می تواند ناشی از افزایش BDNF و در نتیجه تقویت سیناپتوتز و نوروزن باشد. همچنین رزوراترول از ایسکمی و آسیب هیپوکامپ که نقش مهمی در حافظه دارد جلوگیری می کند (7). علاوه بر مکانیسم های فوق، رزوراترول خاصیت آنتی اکسیدانی نیز دارد و نشان داده شده است که از تولید رادیکال های آزاد (در شرایط *invivo* و *invitro*) ممانعت بعمل می آورد. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد رزوراترول می تواند در موش های دیابتی میزان SOD و TAC مغز را بعنوان فاکتورهای آنتی اکسیدانی افزایش دهد. نهایتاً می توان چنین نتیجه گیری کرد که رژیم غذایی پرچرب با افزایش واکنشهای استرس اکسیداتیو موجب کاهش BDNF و در نتیجه کاهش synaptic plasticity می شود که بدنبال آن موجب اختلال در یادگیری و حافظه میگردد. رزوراترول بعنوان یک ماده طبیعی پلی فنلی (1) با افزایش تولید مواد آنتی اکسیدانی و در نتیجه ممانعت از استرس اکسیداتیو از آپوپتوز و تخریب سلول های عصبی جلوگیری می کند. (2) با افزایش میزان BDNF نقش مهمی در جلوگیری از اختلالات مربوط به حافظه بازی می کند. با این وجود بررسی های بیشتری لازم است تا مکانیسم دقیق تاثیر رزوراترول بر روی اختلالات شناختی روشن شود.

6. منابع

1. Ottmani, S. E., Murray, M. B., Jeon, C. Y., Baker, M. A., Kapur, A., Lönnroth, K., & Harries, A. D. (2010). Consultation meeting on tuberculosis and diabetes mellitus: meeting summary and recommendations [Meeting report]. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 14(12), 1513-1517.
2. Kosari, S., Badoer, E., Nguyen, J. C., Killcross, A. S., & Jenkins, T. A. (2012). Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behavioural brain research*, 235(1), 98-103.
3. Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., ... & Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421-433.

4. Cordner, Z. A., & Tamashiro, K. L. (2015). Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & behavior*, 152, 363-371.
5. Brisdelli, F., D'Andrea, G., & Bozzi, A. (2009). Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties. *Current drug metabolism*, 10(6), 530-546.
6. Tabrizian, K., Musavi, S. S., Rigi, M., Hosseindadi, F., Kordi, S., Shamshirgaran, F., ... & Hashemzaei, M. (2019). Behavioral and molecular effects of intrahippocampal infusion of auroaptene, resveratrol, and curcumin on H-89-induced deficits on spatial memory acquisition and retention in Morris water maze. *Human & Experimental Toxicology*, 38(7), 775-784.
7. Li Z, Fang F, Wang Y, et al. Resveratrol protects CA1 neurons against focal cerebral ischemic reperfusion-induced damage via the ERK-CREB signaling path-way in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2016; 146:21–27.