ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of Anti-diabetic and Anti-neuropathy Properties of Resveratrol and its Effect on Sirt-1 Expression in Mice

Amin Saed[1],
Somayyeh Mojtabavi[1],
Mojtaba Najafi[2],
Ali Ziar[1],
Hamed Haghi[3],
Ramin Ataee[4,5]

[1] Pharrmacy Student, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[2] PhD Student in Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

[3] PhD Student in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4] Assitant Professor, Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari Iran

[5] Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari Iran

(Received June 10, 2017 Accepted December 31, 2017)

Abstract

Background and purpose: Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, impaired insulin secretion or peripheral insulin resistance. Today, many herbal medicines are used in treatment of diabetes. Recently anti-diabetic properties of resveratrol are reported in some studies, but none have evaluated its anti-neuropathy properties and its' effect on Sirt1 gene expression. The aim of this research was to investigate the anti-diabetic and anti-neuropathy properties of resveratrol in mice.

Materials and methods: BALB/c mice were divided into 6 groups (n=6 per group). A single dose of 200mg/kg subcutaneous injection of STZ was used to induce diabetes in all groups, except in negative controls which received normal saline. Treatment groups received metformin 300mg/kg and resveratrol 200mg/kg orally by gavage for 21 days. Then, their weight and blood sugar levels were determined and neuropathy test was conducted by hot plate apparatus. After killing and removing their livers and RNA extraction, Sirt1 gene expression was assayed by Real-time PCR.

Results: According to the findings, resveratrol significantly reduced blood sugar level and improved peripheral neuropathy which were comparable with metformin ($P<0.01$). Moreover, Sirt1 expression was increased by resveratrol.

Conclusion: Based on these results, resveratrol could be used alongside other treatments of diabetes to decrease the degree of insulin resistance and neuropathy.

Keywords: resveratrol, anti-inflammatory, Sirt1 expression, diabetes, neuropathy

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (157): 59 - 69 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۷ بهمن سال ۱۳۹۶ (۶۹ - ۵۹)

بررسی اثر ضد دیابتی و ضد نوروپاتی رزوراترول و تاثیر آن در بیان ژن Sirt-1 در موش سوری

امین ساعد[۱]
سمیه مجتبوی[۱]
مجتبی نجفی[۲]
علی زیار[۱]
حامد حقی[۳]
رامین عطایی[۴و۵]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت، یک اختلال متابولیک توازن سوخت و ساز است که به صورت هیپرگلیسمی و تغییر متابولیسم چربی در اثر عدم توانایی سلول‌های بتای جزایر پانکراس در تولید انسولین و یا عدم پاسخ به انسولین مشخص می‌گردد. اخیراً شواهدی از خواص ضد دیابتی رزوراترول مشاهده شد، اما مطالعه دقیقی در خصوص خواص ضد نوروپاتی آن و تاثیر آن در بیان ژن Sirt-1 صورت نگرفته است؛ بنابراین این مطالعه جهت بررسی بیش‌تر خواص ضد دیابتی و ضد نوروپاتی این ترکیب دارویی طرح ریزی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌های سوری نژاد BALB/c به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل منفی، نرمال سالین را به صورت صفاقی دریافت داشتند؛ سایر موش‌ها با تزریق تک دوز داخل صفاقی 200 mg/kg استرپتوزوسین، دیابتی شدند و گروه‌های درمانی رزوراترول (mg/kg۲۰۰) و متفورمین (mmg/kg۳۰۰) را به مدت ۲۱ روز به صورت گاواژ خوراکی دریافت داشتند. پس از پایان درمان دارویی، وزن و قند خون موش‌ها به وسیله دستگاه گلوکومتر و نوروپاتی به وسیله دستگاه صفحه داغ (هات پلیت) بررسی شد. پس از کشتن موش‌ها و استخراج RNA کبدی، بررسی بیان ژن Sirt1 با استفاده از روش Real time-PCR انجام گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل، رزوراترول اثرات معنی‌داری در کاهش قند خون و نوروپاتی محیطی داشت که قابل مقایسه با متفورمین بود. هم‌چنین باعث افزایش بیان Sirt-1 گردیده است ($P<0.01$).

استنتاج: با توجه به تاثیر رزوراترول در کاهش اثر قند خون و تاثیر آن در افزایش بیان Sirt1 می‌توان آن را به عنوان یک درمان کمکی در کاهش مقاومت به انسولین و نوروپاتی در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: رزوراترول، ضد التهابی، بیان ژن Sirt1، دیابت، نوروپاتی

مقدمه

دیابت، یک اختلال متابولیک توازن سوخت است که به صورت هیپرگلیسمی و تغییر متابولیسم چربی در اثر عدم توانایی سلول‌های بتای جزایر پانکراس در تولید انسولین کافی در پاسخ به درجات متغیر بیش تغذیه، عدم تحرک، افزایش وزن یا چاقی ثانوی و مقاومت به انسولین مشخص می‌گردد. این بیماری به دلیل افزایش سریع و شیوع کلی آن، آسیب مخربی را در بسیاری از اعضا ایجاد کرده و هزینه‌های مستقیم و

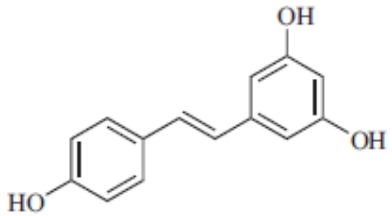
مولف مسئول: رامین عطایی- کیلومتر ۱۸ بلوار خزر آباد، جنع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی و داروشناسی Email: raminataee1349@gmail.com
۱. دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری علوم کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات تالاسمی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی و داروشناسی ،دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۳/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۵/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۰/۱۰

غیرمستقیم آن، بسیار زیاد است(۱).

افزایش قند خون به مرور زمان باعث بروز عوارض حاد و مزمن می‌شود که می‌توان به اختلال کربوهیدرات و لیپید اشاره کرد. نشانه‌ی بارز آن‌هایپرگلایسمی و عوارض عصبی بوده که اعصاب حسی و اتونوم را درگیر می‌کند(۲).

امروزه با وجود فراوانی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی در درمان دیابت در حال افزایش است؛ در حالی‌که مصرف طولانی داروهای شیمیایی، عوارض جانبی زیادی بر جا می‌گذارد. گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی و فرآورده‌های آن‌ها رو به افزایش است(۳).

رزوراترول یک ترکیب طبیعی بوده که از گونه‌های مختلف گیاهی قابل استخراج می‌باشد. از نظر ساختاری، فرم استیلبنی داشته و در گروه ترکیبات موجود، در اسانس طبقه بندی می‌شود (شکل شماره ۱).



Resveratrol

شکل شماره ۱: ساختار شیمیایی رزوراترول

این ترکیب طبیعی در گیاهان خانواده کاج (Pinaceae) و انگور به وفور یافت شده که نقش‌های متعددی دارد، از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به خاصیت فیتوالکسینی (Phytoalexin)آن اشاره کرد.

مطالعات نشان می‌دهد رزوراترول موجود در برخی گیاهان مانند انگور، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد دیابتی است. بر اساس برخی مطالعات، رزوراترول قند خون را در موش‌های آزمایشگاهی کاهش می‌دهد(۴).

فاکتور Sirt1 یکی از هفت sirtuin بدن است. طبق آن‌چه مطالعات نشان داده است، بیان این پروتئین با فعالیت آنتی دیابتیک، تنظیم ترشح انسولین، بهبود در مسیر سیگنالینگ انسولین و عملکرد میتوکندری، مقاومت به استرس و التهاب و سیکل سیرکادین ارتباط دارد. بنابراین Sirt1 به عنوان یک هدف درمانی شگفت انگیز در درمان دیابت شیرین شناخته می‌شود.

Sirt1نقش مهمی در هموستاز (Homeostasis) گلوکوز و حساسیت به انسولین در کبد، ماهیچه‌ها و بافت آدیپوز (Adiposis Tissue)دارد. بیان آن باعث کاهش سطح التهاب از طریق مهار فاکتورهای التهابی، ماکروفاژها و آدیپوسیت‌ها می‌شود. از طرف دیگر، مسیر سیگنالینگ NFkB وJNK را مهار می‌کند. در اثر کمبود Sirt1 ، بیان ژن‌های التهابی افزایش می‌یابد(۵،۶).

سایتوکاین‌ها که تنظیم کننده‌ی پاسخ‌های التهابی و ایمنی هستند، از طریق یک سری اقدامات داخل سلولی عمل می‌کنند. آن‌ها در طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله دیابت باعث ایجاد سیگنال‌های پاتوفیزیولوژیک مهم می‌شوند. طبق اکثر مطالعات، در اثر ابتلا به دیابت نوع دو، الگوی سایتوکاین‌های التهابی در داخل بدن تغییر یافته و یکسری واکنش های التهابی در پاتوژنز دیابت می‌توانند نقش داشته باشند.

التهاب مزمن در فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی و بروز عوارض میکروواسکولار نقش مهمی دارند. نقش سلول‌های التهابی گوناگون از جمله لوکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و ترکیباتی مانندCOX2 ، آنزیم NO سنتتاز، NFkBو سایتوکاین‌های التهابی مانند IL1, IL18, IL6, TNFα و غیره به اثبات رسیده است. در نهایت این مولکول‌ها به عنوان یک عامل التهابی در نوروپاتی دیابتی به رسمیت شناخته شده‌اند و امکان بهره‌مندی از آن در اهداف درمانی مورد توجه قرار گرفته است(۷،۸).

در ۵۰ درصد از بیماران دیابتی بالای ۵۰ سال، شواهدی مبنی بر نوروپاتی دیابتی وجود دارد. مشخصه‌ی

نوروپاتی، تخریب پیش رونده‌ی عصب می‌باشد. در این عارضه، عملکرد عصب از محیط به سمت نواحی بالاتر مختل می‌شود. نوروپاتی دیابتی ناهمگن بوده و قسمت‌های مختلفی از سیتم عصبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد که بسته به محل و نوع الیاف عصبی درگیر، تظاهرات بالینی مختلفی بروز می‌نماید. این عارضه در دیابت نوع یک عارضه‌ی دیررس و در دیابت نوع دو یک عارضه زودرس می‌باشد(۱۰،۹).

حدود نیمی از نوروپاتی‌ها بدون علامت هستند و بیمار در خطر آسیب به پا قرار دارد(۱۱). ۸۰ درصد از موارد قطع پا به دلیل زخم پا و صدمات وارد بر آن می‌باشد. تشخیص زود هنگام و آموزش به افراد و توجه به مراقبت مناسب از پا می‌تواند خطر بروز زخم و به دنبال آن آمپوتاسیون را کاهش دهد. چند دارو در درمان نوروپاتی دیابتی استفاده می‌شوند مانند ضد افسرگی‌های سه حلقوی (نورتریپتیلین)، اپوئیدهای ضعیف (ترامادول)، داروهای ضد تشنج (گاباپنتین، پرگابالین) و داروهای SNRI (دلوکستین)(۱۱).

از آن‌جائی که مطالعات در خصوص اثرات ضد التهابی و ضد دیابتی نوروپاتی رزوراترول محدود بوده و به خصوص تاثیر آن در بیان Sirt1 و نوروپاتی دیابتی انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی ضد یابتی و ضد نوروپاتی رزوراترول و مقایسه آن با داروی متفورمین در یک مطالعه درون تنی (in vivo) در موش سوری انجام یافته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، موش‌های سوری نر نژاد BALB/ c در محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم از مجتمع پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شدند. موش‌ها در درجه حرارت ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد با سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و خاموشی نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد موش (پارس، ایران) همیشه به جز در هنگام آزمایشات در اختیار حیوانات قرار گرفت. از هر حیوان نیز فقط یکبار استفاده شد. تمام روش‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل های مصوب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

حیوانات در ۵ گروه ۸ تایی مورد مطالعه قرار گرفتند که یک گروه به عنوان شاهد منفی و یک گروه به عنوان شاهد مثبت بودند.

متفورمین از شرکت مهبان شیمی، استرپتوزوسین، آگار، اسید بوریک از شرکت سیگمای آلمان، پرایمر از شرکت تکاپو زیست-ایران، EDTA، Mgcl2و الکل مطلق از شرکتMerk ، RNA Later، کیت استخراج RNA، RNAase free water از شرکت Qiagene آلمان، Tag DNA polymerase از شرکت فضا پژوه - ایران، سایبر گرین و کیت استخراج DNA از شرکت تاکارا - ژاپن خریداری شد.

مراحل آزمایشات حیوانی

بعد از تقسیم بندی موش‌ها به گروه‌های مورد نظر، قند خون تمام گروه‌ها و میزان پاسخ‌دهی آن‌ها به تست صفحه داغ(Hot plate test)اندازگیری و ثبت شد.

به ۵ گروه تست و گروه کنترل مثبت از موش‌ها که به مدت ۸ ساعت ناشتا بودند، تک دوز ۲۰۰ mg/kg استرپتوزوسین به طور داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۵ روز تغذیه و نگهداری موش‌ها در شرایط کاملاً یکسان، قند خون ناشتای هر کدام از آن‌ها اندازه‌گیری شد.

گروه اول (کنترل منفی) به مدت ۲۱، هر روز ۰/۳ میلی لیتر نرمال سالین داخل صفاقی دریافت کرد. گروه دوم، اتانول ۱۰درصد را به عنوان حامل دارویی به اندازه‌ی ۰/۳ میلی‌لیتر روزانه به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه جهت بررسی اثر حلال رزوراترول انتخاب شد. به گروه سوم، رزوراترول محلول در اتانول ۱۰ درصد با دوز ۲۰۰ mg/kg به صورت گاواژ روزانه تجویز شد. گروه چهارم، متفورمین را با دوز mg/kg

۳۰۰ به صورت محلول در نرمال سالین به اندازه‌ی ۰/۳ میلی‌لیتر روزانه به صورت گاواژ دریافت کردند. این گروه به عنوان کنترل مثبت آنتی دیابتی در این مطالعه انتخاب شداند. در کنار این گروه‌ها یک گروه ۶ تایی، به عنوان کنترل مثبت دیابتی، تنها استرپتوزوسین به آن‌ها تزریق شد و در طول این ۲۱ روز روزانه ۰/۵ میلی لیتر از طریق گاواژ نرمال سالین دریافت می‌کردند.

بعد از ۲۱ روز، تست صفحه داغ(Hot Plate) برای همه گروه‌ها انجام شد. سپس قند خون ناشتا مورد ارزیابی قرار گرفت و میانگین قند خون و وزن و نوروپاتی بین گروه های آزمایشی تحت بررسی آماری ANOVAیک طرفه و post tukey test قرار گرفت و با گروه کنترل دیابتی با $P<0.01$ مقایسه شد.

جهت بررسی بیان ژن Sirt1 و ارتباط آن با درمان دارویی، پس از کشتن موش‌ها با گیوتین و بعد از باز کردن شکم موش‌ها در شرایط استریل، نمونه از بافت کبدی تهیه شد و این نمونه‌ها پس از تکه شدن در محلول RNA later (ماده نگهدارنده‌ی RNA) نگهداری شده و به فریزر ۲۰- انتقال یافتند. در این تحقیق بعد از یک شبانه روز نگهداری بافت‌های معلق در RNA Later در ۴ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت نگهداری منتقل شدند.

برای استخراج RNA از بافت از کیت استخراج RNA شرکت کیاژن-آلمان استفاده شد(۱۲). سنجش RNAتخلیص شده به صورت کیفی و کمی انجام شد. جهت سنجش کیفی RNA از روش ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید(۱۲). در این روش ابتدا ۰/۵ گرم از پودر آگاروز در ۵۰ میلی‌لیتر از بافر TBE(1x) حل شد. بعد از سرد شدن ژل، به میزان ۵ میکرولیتر سایبرگرین به آن اضافه شده و به آرامی به کاست حاوی شانه ریخته شد. بعد از سفت شدن، ۵ میکرولیتر از بافر RNA با یک میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و به داخل چاهک‌ها انتقال داده شد. سپس با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت، الکتروفورز ژل به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. در پایان کار با کمک دستگاه آشکار ساز و با استفاده از سیستم ژل داک از آن عکس برداری به عمل آمد. سنجش کمی با استفاده از دستگاه پیکودراپ انجام شده و جذب نوری نمونه در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گشت.

سپس برای تهیه cDNA از کیت TAKARA(Japan) استفاده شد. آنزیم مورد استفاده در ساخت cDNA ترنسکریپتاز معکوس بود. برای تهیه cDNA ابتدا محلول استوک ساخته شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تهیه استوک جهت ساخت cDNA

Component	Volume/reaction µL
5×primescript buffer	٤
Primescript RT Enzyme mix1	١
Oligo dT Primer	١
Random Hexamer Primer	١
RNAase free water	٣
Final concentration	١٠

برای این منظور از هر نمونه از RNA تیمار شده با DNAaseبه میزان ۱۰ میکرولیتر در داخل میکروتیوب ریخته و ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک بالا به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد تا فرایند Reverse Transcriptation صورت گیرد. سپس با استفاده از پرایمر مورد نظر، محصول cDNA حاصل با PCRمورد تکثیر قرار گرفت.

طراحی پرایمر رفت و برگشت توالی ژن‌های Sirt1، توسط انیستو پاستور آمل و ساخت پرایمر توسط شرکت تکاپوزیست تهران انجام شد. پرایمرها با نرم افزار Beacon designer طراحی شدند و دمای annealing آن‌ها بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل شماره ۲). به عنوان ژن رفرانس از ژن GAPDH استفاده شد (شکل شماره ۳).

Sirt1 forward	AGC TCC TTG GAG ACT GCG AT
Sirt1 Reverse	ATG AAG AGG TGT TGG TGG CA

شکل شماره ۲: مشخصات پرایمر Sirt1

GAPDH forward	CGT CCC GTA GAC AAA ATG GT
GAPDH Reverse	TTG ATG GCA ACA ATC TCC AC

شکل شماره ۳: مشخصات پرایمر GAPDH.

بـرای انجـام مطالعـه روی هـر ژن، از روش Real-time PCR و از کیت کیاژن استفاده شـد. بـرای کـار بـا کیـت مـورد نظـر ابتـدا محلول‌هـای اسـتوک تهیـه شـد (جدول شماره ۲ و ۳).

جدول شماره ۲: محلول Stok شماره ۱ جهت انجام Real time PCR

component	Volume/reaction Lµ
RNAase free water	٤/٥
Forward Primer	١
Reverse Primer	١
SYBR Green	٧/٥
Final concentration	١٤

جدول شماره ۳: محلول Stok شماره ۲جهت انجام Real time PCR

Component	Volume/(reaction+standard)µL
RNAase free water	٤/٥
Forward Primer Refrense gene	١
Reverse Primer Refrense gene	١
SYBR Green	٧/٥
Final concentration	١٤

هدف از انتخاب ژن رفرانس در انجام مطالعه، پی بردن به خطاهای احتمالی فرد در طی پروسه بود.

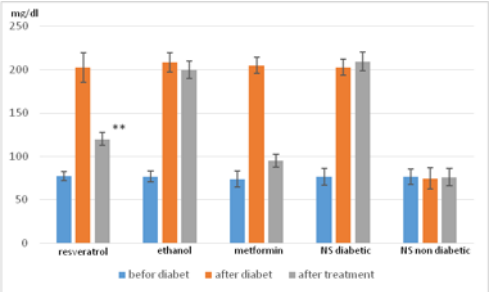
پـس از انجـام تکثیـر بـه روشReal-time PCR ، داده‌های خام به صورت اندکس Ct از دستگاه استخراج شد. تجزیه و تحلیل Ct ها با کمـک نـرم افـزار Excel و مقایسه میانگین‌ها با تست آماری Tukey و برنامه SAS انجام شد.

در تمام رقت‌ها، منحنی PCR ترسیم شـد و از روی نمودار تکثیر، Ct نمونه‌ها مشخص گردید. سپس منحنـی استاندارد بر اساس Ct در محور Y وLog تعداد کپـی در محـور Xهـا رسـم شـد. حـال بـا دانسـتن Ct نمونـه‌های مجهول، که بـرای آن‌هـا همـراه بـا نمونـه‌های اسـتاندارد PCR انجام شد و قرار دادن آن‌ها در منحنـی اسـتاندارد، تعداد کپی نمونه‌ها مشخص گردید(۱۳).

یافته ها

نتایج قند خون موش‌ها

در شکل شماره ۴، تاثیر درمان‌های مختلف دارویی در میزان قند خون در گروه‌های مختلـف حیـوانی نشـان داده شده است.



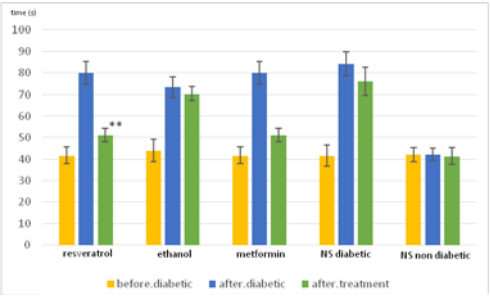
P<0.05: significant compared with diabetic control(NS)**

شـکل شـماره ٤: مقایسـه میـانگین قنـد خـون گـروه رزوراترول با گروه‌های نرمال سالین دیابتی و غیر دیابتی و گروه اتانول

همـان‌طـور کـه مشـخص شـد، رزوراتـرول در دوز ۲۰۰ mg/kgبـرای ۲۱ روز بـه طـور معنـی‌داری باعـث کاهش قند خون در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید که حتی قابـل مقایسـه بـا متفـورمین بـا دوز ۳۰۰ mg/kg بوده است.

نتایج نوروپاتی

همزمان با اندازه‌گیری مداوم قند خـون مـوش‌هـای تیمار شده با رزوراترول، میزان نوروپاتی آن‌هـا از طریـق زمان پاسخ به حرارت با دستگاه‌هات پلیت انـدازه‌گیـری شد و نتایج در شکل شماره ۵ مشخص است.



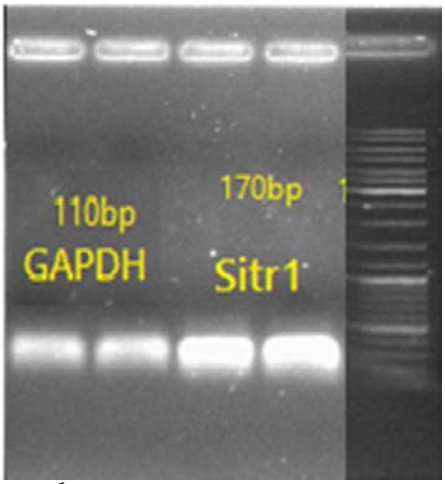
:Significant P<0.05 compared with diabetic control(NS)**

شکل شماره ۵: نتایج بررسی نوروپاتی گروه‌های مختلف آزمایشی

همان‌طور که در شکل شماره ۵ مشاهده می‌شود، رزوراترول با دوز ۲۰۰ mg/kgبه مدت ۲۱ روز باعث کاهش معنی‌دار نوروپاتی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد که این اثر حتی در حد متفورمین با دوز ۳۰۰ mg/kgبوده است($P<0.01$).

نتایج استخراج RNA

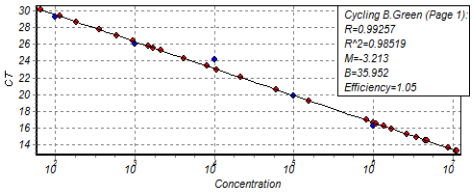
مرحله‌ی استخراج RNA شامل دو مرحله‌ی استخراج ژن (DNAوRNA)و ساخت RNA ی تیمار شده با کمک DNAase نمونه‌ها بود. جهت اطمینان از درستی کار قبل از مرحله‌ی دوم و پس از استخراج ژن‌های موجود در نمونه‌ها به صورت رندوم چند نمونه به روی ژل آگاروز برده شد و پس از تصویربرداری با آشکارساز وجود ژن در نمونه‌ها به اثبات رسید (شکل شماره ۶).



شکل شماره ٦: محصول Real-time بر روی ژل آگاروز ۲ درصد.

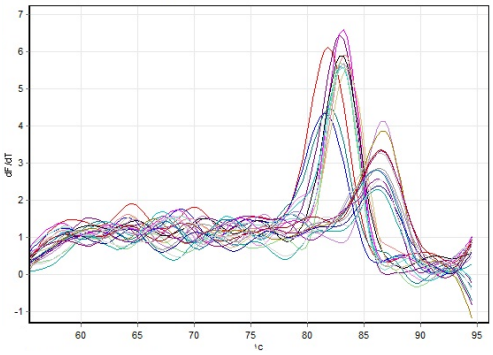
نتایج Real-time PCR

cDNA افراد سالم و بیمار با دستگاه Rotor-gene 6000 (corrbet –QIAGEN) تکثیر شدند. با تهیه‌های متوالی (۱/۱۰-۱/۱۰۰۰۰۰۰) از pooled cDNA، حساسیت تکنیک Real time PCR – SYBER GREEN مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی نمونه‌های رقت متوالی با افزایش سیگنال‌های فلوئورسانس روش Real time PCR تکثیر گردیدند. منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و چرخه آستانه، محور عمودی ترسیم شد (شکل شماره ۷).



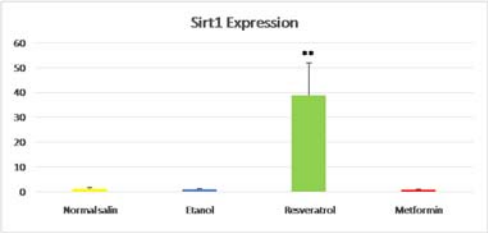
شکل شماره ۷: منحنی استاندارد رقت های مختلف تکثیر

برای اطمینان از تولید قطعات اختصاصی، عدم وجود باندهای غیر اختصاصی، ساختارهای ثانویه و دوتایی پرایمر در محصولات Real-Time PCR منحنی ذوب رسم شد(۸). نتایج منحنی ذوب برای پرایمرهای طراحی شده نشان داد که پرایمرها به صورت اختصاصی عمل نموده و فاقد هرگونه قطعه‌ی غیر اختصاصی و ساختار ثانویه بودند.



شکل شماره ۸: منحنی ذوب پرایمرها و قطعات

با استفاده از نرم افزار SAS، داده‌های حاصل از بیان ژن با دو آزمون Tukey و Dankan مورد ارزیابی قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری از بیان ژن Sirt1 در گروه رزوراترول مشاهده شد ($P<0.05$)(شکل ۹) .در حالی‌که این افزایش بیان حتی برای گروه دریافت کننده متفورمین مشاهده نشد.



:**Significant compared with control<0.05

شکل شماره ۹: نتایج بیان ژن Sirt 1 در گروه دریافت کننده رزوراترول با دیگر گروه ها

بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی تاثیر ترکیب گیاهی رزوراترول بر روی کاهش قند خون و عوارض نوروپاتی در موش‌ها و هم‌چنین میزان بیان ژن sirt1در نمونه‌ی بافت کبد موش‌های سوری دیابتی شده با استرپتوزوسین انجام شده است. با توجه به اهمیت این ژن در بیماری دیابت و این که امروزه به عنوان یکی از اهداف درمانی مهم شناخته می‌شود، این مطالعه تنظیم شد.

تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر ترکیبات خالص گیاهی بر روی کاهش قند خون صورت گرفته است از جمله در مطالعه‌ای نشان داده شد که در افراد دیابتی نوع ۲، رزوراترول به عنوان یک درمان موثر شناخته شده است، به گونه‌ای که باعث بهبود فعالیت‌های انسولین می‌شود(۱۴). اگرچه مکانیسم فعالیت ضد دیابتی رزوراترول به طور کامل شناخته شده نیست، ولی این ترکیب باعث کاهش وزن شده و بر روی متابولیت لیپید در داخل عضلات تاثیر گذاشته و از واکنش‌های استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند، به طوری‌که باعث افزایش فعالیت‌های زیستی میتوکندری می‌شود(۱۵). SIRT1 یک آنزیم وابسته به NAD بوده و یک کنترل کننده عمده مسیرهای پائین رونده محدودیت انرژی است که آثار مفیدی بر هموستاز گلوکز و حساسیت به انسولین دارد(۱۶). SIRT1 به عنوان یک فعال کننده برای PPARγ (Peroxisme proliferation receptor γ) مطرح بوده و از طریق افزایش بیان تنظیمی (Upregulation) ترکیب اندوژن مرتبط با التهاب PPARγ coactivator 1α (PGC-1α) این عمل را انجام می‌دهد که منجر به اکسیداسیون اسید چرب و گلوکونئوژنزیس و کاهش گلیکولیز می‌گردد(۱۶،۱۵).

داستیلیشن PGC-1α به وسیله‌ی SIRT1 نیازمند فعالیت آنزیم کیناز فعال کننده آدنوزین مونوفسفات (Adenosine monophosphate-activated protein kinase -AMPK)است. اخیراً مشخص شده که AMPK نقش مهمی در نفروپاتی دیابتی داشته و کاهش فسفریلاسیون آن با افزایش قند خون و افزایش حجم کلیوی همراه است و می‌تواند متابولیسم گلوکز را در مسیرهای غیر وابسته به انسولین بهبود ببخشد(۱۷). این ترکیب به عنوان تنظیم کننده‌ای بحرانی برای متابولیسم لیپید اهمیت دارد. هم‌چنین مشخص شده است که فسفریلاسیون AMPK توسط رزوراترول تنظیم می‌شود(۱۸،۱۷).

درمورد پاسخ موش‌های دیابتی به درد، تحقیقاتی صورت گرفته است از جمله تحقیقی که در هندوستان بر روی رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین انجام شد. در این آزمایش علاوه بر میزان پاسخ به هات پلیت و انجام تحقیقات هیستوپاتولوزی، میزان آنزیم التهابی Cyclooxygenase Prostaglandin peroxidase و فعالیت Na-K ATPase نیز اندازه‌گیری شد. در این مطالعات، رزوراترول اثرات مطلوبی نشان داد(۲۰،۱۹).

نقش فاکتورهای التهابی در بیماری دیابت در بعضی از تحقیقات به اثبات رسیده است از جمله در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Gökhan S. Hotamisligil انجام گرفت، حضور فاکتورهای التهابی، به عنوان یک عامل در بروز بیماری‌های متابولیکی مانند دیابت شناخته شد(۲۱).

هم‌چنین در مطالعات دیگری که Thirunavukkaresu و همکارانش بر روی رزوراترول در موش انجام دادند، این ترکیب اثر مناسبی در بهبود علائم آسیب قلبی ناشی از دیابت مانند ایسکمی میوکارد داشت و باعث متعادل شدن ترکیبات نیتریک اکسید، تیوردوکسین و اکسیژناز شده است(۲۲). هم‌چنین بر اساس تحقیقات مرتبط با چاقی (Obesity) و دیابت، این ماده موثره گیاهی اثرات قابل قبولی در روند درمان چاقی داشته است. اثرات ضد چاقی این ترکیب را بعضاً به واسطه ساختار فیتواستروژنی آن می‌دانند(۲۳).

بر اساس مطالعه‌ای که توسط Ding و همکارانش بر روی رزوراترول انجام گردید، این ترکیب در درمان هایپرتروفی کلیوی ناشی از دیابت موثر بود(۲۴).

در مطالعه اخیر، رزوراترول در کاهش قند خون و نوروپاتی موش‌های دیابتی رزوراترول اثر خوبی در کاهش قند خون و کاهش نوروپاتی داشته است و باعث افزایش بیان sirt-1 شده است که با برخی مطالعات در خصوص رزوراترول و دیابت از جمله مطالعات دانشمندان هندوستانی (۲۰، ۱۹) و مطالعه Thirunavukkaresu و Dingهمسو می‌باشد(۲۴، ۲۳).

افزایش بیان Sirt1 توسط رزوراترول می تواند یک نقطه قوت در اثرات ضد دیابتی رزوراترول باشد که می‌تواند مسیرهای دیگر از جمله کاهش بیان ژن های PGC-1α و PPARβ/δ را درگیر کند که روند بهبود و یا کنترل دیابت می‌تواند دخیل باشد.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که نقش رزوراترول به عنوان کاهنده قند خون و بهبود عوارض دیابت بسیار قابل توجه است. در نوروپاتی دیابتی، رزوراترول منجر به افزایش پاسخ به درد شد. همچنین در مطالعه حاضر، رزوراترول باعث افزایش بیان ژن Sirt1 گردید. اگرچه در برخی از فاکتورهای التهابی اثرات متضاد داشته است، اما اثرات ضد نوروپاتی رزوراترول را احتمالاً بتوان به تاثیر آن بر TNF-α تفسیر کرد و از آن جائی که در این مطالعه، افزایش اثرات رزوراترول بر بیان Sirt1 یک اثر منحصر به فرد بود، به طوری‌که متفورمین حتی نتوانسته چنین اثری را نشان دهد. ترکیب درمانی رزوراترول و متفورمین احتمالاً بتواند به اثرات ضد دیابتی متفورمین کمک کند.

سپاسگزاری

این پروژه در قالب پایان نامه دانشجوی داروسازی و طرح پژوهشی مصوب در معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد ثبت و کد اخلاق ۵۳۴ انجام یافت.

References

1. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. Lancet. 2011;378(9786):169-181.
2. Mellitus D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2005;28:S37.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine. 1998;15(7):539-553.

4. Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes. European journal of pharmacology. 2010;635(1-3):1-8.
5. Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. Current opinion in lipidology. 2009;20(2):98-105.
6. Erion DM, Yonemitsu S, Nie Y, Nagai Y, Gillum MP, Hsiao JJ, et al. SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(27):11288-11293.
7. Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus the insulin and cytokine network. Diabetes care. 2007;30(Supplement 2):S120-S6.
8. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Ramirez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, et al. Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. Obes Surg. 2007;17(11):1464-1474.
9. Maser RE, Lenhard MJ. Cardiovascular autonomic neuropathy due to diabetes mellitus: clinical manifestations, consequences, and treatment. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005;90(10):5896-903.
10. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2010;33(Supplement 1):S62-S9.
11. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. Diabetes care. 2010;33(10):2285-2293.
12. Tularam LS, Himani PS, Kumar A, Nath R, Dixit R. An Experimental Study to Evaluate the Antihyperglycemic Action of Curcumin in Diabetes Rat Model and Comparison with Glibenclamide. International Journal of Health Sciences and Research (IJHSR). 2013;3(3):37-43.
13. Nair R, Shukla V, Chanda S. Assessment of Polyalthia longifolia var. pendula for hypoglycemic and antihyperglycemic activity. J Clin Diagn Res. 2007;1:1-3.
14. Chi T-C, Chen W-P, Chi T-L, Kuo T-F, Lee S-S, Cheng J-T, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci. 2007;80(18):1713-1720.
15. Mensink M, Hesselink M, Russell A, Schaart G, Sels J, Schrauwen P. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1α and PPARβ/δ gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. Int J Obes (Lond) 2007;31(8):1302-1310.
16. Liang H, Ward WF. PGC-1α: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ. 2006;30(4):145-151.
17. Ginter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. Diabetes: Springer; 2013. p. 42-50.
18. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, et al. High-density lipoprotein

modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. Circulation. 2009;119(15):2103-2111.

19. Rizvi SI, Zaid MA. Impairment of sodium pump and Na/H exchanger in erythrocytes from non-insulin dependent diabetes mellitus patients: effect of tea catechins. Clinica Chimica Acta. 2005;354(1):59-67.
20. Babu PVA, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates Ca 2+-ATPase and Na+/K+-ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. Chemico-biological interactions. 2006;162(2):157-164.
21. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest. 2005;115(5):1111-1119.
22. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. Free Radical Biology and Medicine. 2007;43(5):720-729.
23. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. Diabetes. 2012;61(6):1444-1454.
24. Ding D-F, You N, Wu X-M, Xu J-R, Hu A-P, Ye X-L, et al. Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK. American journal of nephrology. 2010;31(4):363-374.