



اثر فلاونوئیدهای عصاره برگ گیاه حرا بر نوروتروفین‌های هیپوکامپی و فاکتورهای آلزایمری در موش‌های دیابتی

راهله رهباریان^{۱*}، جلال شگفته^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی اصیل

مقدمه: تحقیقات نشان داده‌اند که فلاونوئیدهای موجود در برگ گیاه حرا قادر به بهبود آسیب‌های نورونی ناشی از دیابت می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر فلاونوئیدهای عصاره برگ گیاه حرا بر نوروتروفین‌های هیپوکامپی و فاکتورهای آلزایمری در موش‌های دیابتی است.

روش: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش، به ۴ گروه: گروه شاهد، شاهد دیابتی و دو گروه تحت تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید گیاه حرا تقسیم شدند. دیابت در گروه‌های دیابتی با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوسان (۱۲۰ mg/kg) القاء شد. گروه‌های تحت تیمار به مدت ۳۰ روز فلاونوئیدها را دریافت کردند. پس از دوره درمان، مغزها جدا شده و سطوح NGF، BDNF، Pt و Aβ 40 با استفاده از روش ELISA سنجیده شدند.

یافته‌ها: باتوجه به نتایج به دست آمده، سطوح NGF و BDNF در موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به صورت وابسته به دوز تزریقی به طور معنی‌داری افزایش و سطوح Pt و Aβ 40 به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<0/05).

نتیجه‌گیری: فلاونوئید برگ گیاه حرا با کاهش استرس اکسیداتیو از طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی، با تعدیل رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن، منجر به افزایش ترشح NGF و BDNF و به دنبال آن کاهش سطوح Pt و Aβ 40 شد.

کلیدواژه‌ها: فلاونوئید، حرا، نوروتروفین، دیابت، آلزایمر، فسفو_تائو، آمیلوئید_بتا، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، فاکتور رشد عصبی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۲۹

*نویسنده مسئول: راهله رهباریان،

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۳۵۱۸۱۵۷

پست الکترونیک:

a_rahbarian@pnu.ac.ir



مقدمه

دیابت ملیتوس، از دسته بیماری‌های متابولیک با ویژگی بارز هیپرگلیسمی که به چهار گروه نوع ۱، ۲، بارداری و انواع خاص طبقه‌بندی می‌شود (۱، ۲). از طریق مکانیسم استرس اکسیداتیو و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی را در توسعه نوروپاتی دیابتی بازی می‌کند که همراه آن دژنراسیون، تحلیل و آتروفی سلول‌های عصبی افزایش می‌یابد (۳). در موش‌های دیابتی، هیپوگلیسمیک پاسخ آنتی‌اکسیدانی وابسته به فاکتور هسته‌ای E2 را القاء می‌کند که با آسیب اکسیداتیو در هیپوکامپ مقابله می‌کند، اما این مکانیسم محافظت عصبی برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به نورون‌ها در موش‌های دیابتی کافی نبوده و در نهایت منجر به کاهش مزمن در حافظه کاری و حافظه بلندمدت می‌شود (۴). از این رو، می‌توان به وجود دیابت به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در ریسک ایجاد بیماری آلزایمر اشاره کرد (۵-۷).

نوروتروفین‌ها که گروهی از فاکتورهای رشد عصبی و شامل $BDNF^1$ ، NGF^2 و دیگر مولکول‌ها می‌باشند، نقش‌های حیاتی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، به ویژه در فرآیندهای یادگیری و حافظه در ناحیه هیپوکامپ مغز ایفا می‌کنند (۸). نورون‌های این ناحیه به هیپرگلیسمی حساس بوده و این حساسیت ممکن است به تغییر در بیان گیرنده‌های فاکتور رشد شبه انسولینی و کاهش انتقال‌دهنده‌های انسولین مربوط شوند (۹-۱۲). در دیابت، اختلال در $BDNF$ و NGF ممکن است منجر به دژنراسیون نورون‌ها و اختلال در حافظه گردد، که در مراحل اولیه آلزایمر، این تغییرات مورد توجه قرار می‌گیرند (۱۳).

بیماری آلزایمر، شایع‌ترین نوع دمانس، یک اختلال عصبی تحلیل‌برنده است که به کاهش حافظه و کارکردهای شناختی می‌انجامد (۱۴). در فرضیه آبشاری آلزایمر، آغاز آن را به تشکیل بیش‌ازحد آمیلوئید بتا در نتیجه هیپرفسفریلاسیون پروتئین تائو نسبت می‌دهند (۱۵). براساس تحقیقات جدید، اختلال در عملکرد میتوکندری و تولید رادیکال‌های آزاد و در نهایت با ایجاد شرایط استرس

اکسیداتیو در بدن، هیپرفسفریلاسیون را به پروتئین تائو القای کند (۱۶). کشور ایران، خاستگاه بسیاری از گونه‌های گیاهی با خواص درمانی فراوان می‌باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به گیاه حرا اشاره کرد (۱۷).

گیاه حرا به عنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو، با نام علمی *Avicennia marina* از خانواده *Avicenniaceae* گیاهی با صفت هالوفیتی و منبعی غنی از انواع تری‌ترپن‌ها، ایریدوئیدها، تانن‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استروئیدها، فیتوالکسین‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (۱۹، ۲۰). فلاونوئیدها بزرگ‌ترین گروه تشکیل‌دهنده پلی‌فنول‌ها^۳ و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، و تعدیل رویدادهای سلولی در نورون‌ها می‌باشد. اثر محافظتی فلاونوئیدها بر سلول‌های عصبی از طریق کاهش سطح رادیکال‌های آزاد سلولی می‌باشد که مانع از تخریب نورونی می‌شود. در این خصوص پیشنهادات حاصل از بررسی‌های مشاهده‌ای و تجربی مبتنی بر این است که دارا بودن رژیم غنی از فلاونوئید منجر به بهبود عملکرد شناختی و مانع از تحلیل رفتن نورون‌ها می‌گردد (۳). از طرفی، منطبق بر یافته‌های اخیر، القاء آلوکسان مونوهیدرات از طریق دو مکانیسم ایجاد رادیکال‌های آزاد و دپلاریزه کردن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ منجر به کاهش معناداری در سطح سرمی انسولین در موش‌های صحرایی گردیده است (۲۱). از این رو با استفاده از آلوکسان در کاهش سطح سرمی انسولین و ایجاد رادیکال‌های آزاد در اثر تخریب سلول‌های β پانکراس، می‌توان به اثرات فلاونوئیدها بر پتانسیل نوروتروفیک در شرایط دیابتی پی‌برد؛ این موضوع بینش‌های ارزشمندی برای رویکردهای درمانی نوآورانه در جهت نقص‌های شناختی ناشی از آلزایمر در ارتباط با دیابت را فراهم می‌کند. از این رو، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر فلاونوئیدهای عصاره برگ گیاه حرا بر نوروتروفین‌های هیپوکامپی و فاکتورهای آلزایمری در موش‌های دیابتی می‌باشد.

روش

³ Polyphenols¹ Brain-Derived Neurotrophic Factor² Nerve growth factor

این پژوهش به صورت تجربی در آزمایشگاه تحقیقات جانوری دانشگاه پیام نور مرکز مشهد انجام شد.

روش جمع‌آوری و تهیه عصاره

برگ درخت گیاه حرا از سواحل شمالی جزیره قشم جمع‌آوری و توسط کارشناس مربوطه تایید شد. گیاه حرا پس از طی مراحل خشک‌شدن در سایه در دمای $36 \pm 3^\circ\text{C}$ ، توسط آسیاب خرد شد. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰g از پودر خشک‌شده برگ گیاه حرا داخل بالن دستگاه سوکسله ریخته‌شد و به آن ۸۰۰ cc الکل اتیلیک ۸۰٪ اضافه گردید. عصاره به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در دمای 45°C قرار داده شد تا خشک شود. پس از حذف حلال، عصاره با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg و وزن بدن تهیه و به موش‌های صحرایی دیابتی تزریق شد.

روش القاء دیابت تجربی

مدل تجربی القاء دیابت در گروه‌های شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید تام برگ گیاه حرا با یکبار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma Aldrich, Germany) به میزان ۱۲۰ mg/kg با استفاده از بافر سیترات (PH=۵/۴) به عنوان حلال آلوکسان القاء شد. به دلیل اطمینان از مطالعه ثمربخش بروی دیابت مزمن، حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و القاء دیابت تجربی، جهت تأیید آن از ورید دمی، خون‌گیری صورت گرفت و قندخون توسط دستگاه گلوکومتر مدل IGM-0002A (EasyGluco, Korea) اندازه‌گیری شد. قندخون بالای ۳۰۰ mg/dl به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۲۲).

لازم به ذکر است که قبل از شروع پژوهش LD50 (متوسط دوز کشنده) و ED50 (متوسط دوز مؤثر) عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا بررسی شد و مشخص شد دوز LD50، ۸۰۰ mg/kg و محدوده بین ۵۰۰-۳۰۰ mg/kg ED50 می‌باشد. باتوجه به نتایج مناسبی که در اثربخشی دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg بروی شاخص‌های مرتبط با

دیابت در مقالات دیگر دیده شد، به این دلیل این دو دوز به عنوان دوزهای درمانی انتخاب شده است (۱۹).

معیارهای ورود و خروج

نمونه‌های مورد آزمایش باگذشت حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان، جهت دیابتی شدن، برای معیارهای ورود و خروج در آزمایش ارزیابی شدند. نمونه‌های دیابتی که قندخون معیار را داشته باشند به آزمایش وارد و نمونه‌هایی که ۱- قندخون آن‌ها به حد دیابتی شدن نرسیده باشد، ۲- نمونه‌های دارای قند خون بالای ۳۲۰-۳۵۰ mg/dl، به دلیل پرخاشگری و کوری و ۳- مرگ خودبه‌خودی نمونه‌ها، منجر به خروج آن‌ها از آزمایش گردید.

حیوانات مورد استفاده و شرایط نگهداری

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ با محدوده سنی ۱۵-۱۴ هفته و محدوده وزنی 16 ± 14 گرم نژاد ویستار^۱ استفاده شد. حیوانات مدنظر در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) با دمای محیطی $23-25^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی ۴۰-۳۵٪ و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش حیوانات با آب به مقدار کافی توسط بطری‌های پلاستیکی ۵۰۰ ml و غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه می‌شدند. به منظور جلوگیری از خطاهای احتمالی ناشی از استرس و اضطراب حاصل از عدم سازش با محیط جدید، آزمایش پیش‌رو با گذشت حداقل ۱۰ روز بعد از استقرار حیوانات در محیط جدید آغاز گردید. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۸ سر موش صحرایی) (۲۳)، شامل گروه شاهد، گروه شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید تام برگ گیاه حرا ($\text{HPLC} \geq 85\%$) تقسیم شدند. گروه‌های شاهد و شاهد دیابتی به مدت ۳۰ روز و به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ ml نرمال سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند. دو گروه دیابتی تحت تیمار، به مدت ۳۰ روز و به صورت داخل صفاقی با ۰/۵ ml فلاونوئید با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg تیمار شدند.

¹ Wistar



سنجش‌های بیوشیمیایی

در پایان دوره درمان و باگذشت ۴۸ ساعت از آخرین تزریق به‌منظور استخراج مغز از جمجمه، ابتدا موش‌ها با تزریق درون‌صفافی ۵۰ mg/kg ۱ کتامین هیدروکلراید (Rotexmedica, Germany) و ۵ mg/kg ۲ زایلازین (Serva, Germany) بی‌هوش‌شدند (۸). در ادامه پس از جداسازی سر حیوان، مغز به‌طور کامل از جمجمه خارج و پس از شست‌وشو با محلول نرمال‌سالین بر روی یخ قرارداده‌شد. هیپوکامپ در زیر استروسکوپ ۳ از مابقی قسمت‌های مغز جداشد و به همراه بافرتریس ۴ به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایز مدل Ultra turrax T25 digital (IKA, Germany) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد و محلول هموژنیزه شده با سانتریفیوژ مدل Z366 (Hermle, Germany) سانتریفیوژشد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴°C (سانتریفیوژ یخچال‌دار) انجام‌شد و از محلول ۰/۵ مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۵ (Sigma-Aldrich, Germany) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده‌شد. پس از انجام سانتریفیوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جداشد و بخش زیرین که رسوب‌کرده‌بود، دورریخته‌شد و از محلول شفاف رویی جهت سنجش استفاده‌شد (۲۴). پارامترهای پژوهش حاضر توسط روش ELISA، دستگاه الایزا (Stat Fax-2100, USA) و کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (Finetest, China) سنجش‌شد. کیت BDNF دارای حساسیت ۳۱/۲۵-۲۰۰۰ pg/ml، کیت NGF ۱۸/۷۵۱-۲۵۰۰ pg/ml، حساسیت ۲۳/۴۳۸-۲۵۰۰ pg/ml، کیت Pt ۳۹/۰۶۳-۹/۳۷۵ pg/ml، حساسیت ۴۶/۸۷۵-۵۰۰۰ pg/ml، کیت Aβ ۱۵/۶۲۵-۱۰۰۰ pg/ml و کیت Aβ ۴۰ دارای حساسیت ۷۸/۱۲۵ می‌باشد.

آنالیز آماری

اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ تحلیل‌شد. با توجه به اینکه نتایج به‌دست‌آمده کمی است، توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها برقرارشد ($p > 0.05$). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی ۶ تحلیل‌شد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین $\pm$ میانگین ۷ گزارش‌شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته‌شد ($p < 0.05$).

یافته‌ها

تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه نشان‌داد که میزان قندخون ناشتا در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (جدول-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ فلاونوئید حرا، میزان قندخون ناشتا نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافت ($p < 0.05$) (جدول-۱). سطح هیپوکامپی BDNF در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ فلاونوئید حرا، میزان BDNF نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). سطح هیپوکامپی NGF در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ فلاونوئید حرا، میزان NGF نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). سطح هیپوکامپی Pt در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ فلاونوئید حرا، میزان Pt نسبت به گروه

⁵ Phenylmethylsulfonyl fluoride

⁶ Tukey

⁷ Mean $\pm$ SEM

¹ Ketamine hydrochloride

² Xylazine

³ Stereoscope

⁴ Tris buffer



($p < 0.05$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید حرا، میزان $A\beta 40$ نسبت به گروه شاهد دیابتی به صورت وابسته به دوز تزریقی، به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱).

شاهد دیابتی به صورت وابسته به دوز تزریقی، به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$) (نمودار-۱). سطح هیپوکامپی $A\beta 40$ در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به طور معنی داری افزایش یافت

جدول ۱- میانگین قند خون ناشتا (FBS) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد بررسی	قند خون ناشتا
شاهد سالم	۸۱±۶
شاهد دیابتی	۲۶۹/۶۶±۱۳/۴
دیابتی تحت تیمار با ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم فلاونوئید عصاره حرا	۱۸۸/۳۳±۱۲/۰۵
دیابتی تحت تیمار با ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم فلاونوئید عصاره حرا	۱۴۹±۱۱/۰۸
سطح معنی داری	۰/۰۰۹

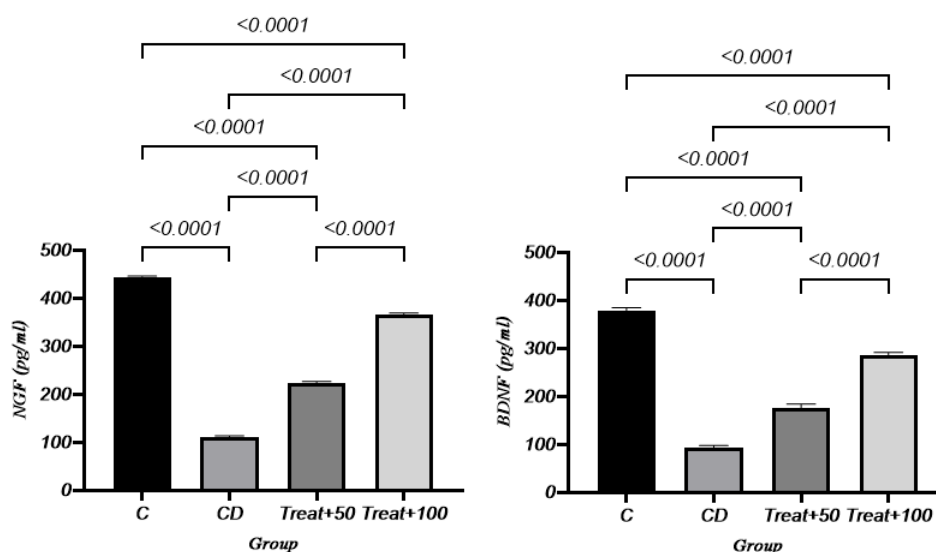
نمودار ۱- میانگین سطح FBS، BDNF، NGF، Pt، $A\beta 40$ در گروه‌های تحت تیمار با فلاونوئید تام موجود در عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا بر اساس تفکیک گروه در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان.

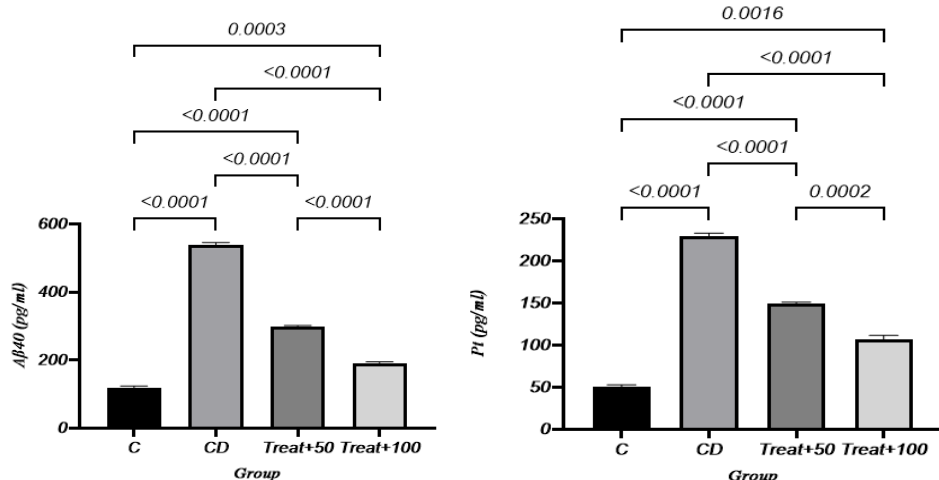
C: گروه شاهد سالم

CD: گروه شاهد دیابتی

Treat+50: گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ mg/kg فلاونوئید عصاره حرا

Treat+100: گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kg فلاونوئید عصاره حرا





بحث

اختلالات شناختی و متابولیکی مشاهده شده در دیابت کمک‌کند (۲۶). تداخل در این مسیر ترانسسانی علامت متعاقباً ممکن است به اثرات مستقیم ناشی از دیابت بر روی آلزایمر و افزایش فاکتورهای وابسته به آن داشته باشد (۷). به دنبال کاهش سطح سرمی انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان، ابتدا، سطح سرمی نوروتروفین‌های BDNF و NGF دچار افزایش شده که منعکس‌کننده یک مکانیسم جبرانی می‌باشد، اما با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافته است. از این رو، می‌توان دریافت که کاهش در سطح انسولین می‌تواند بیان ژن‌های BDNF را از طریق گیرنده‌های تیروزین کیناز B و به موازات آن سطح NGF را نیز از طریق کاهش قابل توجه در سنتز ماده PSP^۲ و پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین^۳ (CGRP) در مغز به ویژه در ناحیه هیپوکامپ با کاهش روبه‌رو کند. این دو نوروتروفین به علت داشتن ژن اجدادی مشترک، دارای نقش‌های تنظیمی از جمله تمایز نورونی، شکل‌پذیری سیناپسی و روندهای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، تنظیم انتقال‌دهنده‌های عصبی و سنتز نوروپپتیدهای سلول‌های عصبی سمپاتیک و حسی می‌باشند و از این طریق می‌توان به صورت نظری به رابطه بین سطوح پایین BDNF و NGF در بیماری آلزایمر به صورت رابطه مستقیم اشاره کرد (۲۷، ۲۸).

مطالعات گذشته نشان داده است که BDNF و NGF از عوامل تعدیل‌کننده بیماری آلزایمر از طریق کاهش تجمع

مطالعه حاضر اثر فلاونوئیدهای عصاره برگ گیاه حرا بر نوروتروفین‌های هیپوکامپی و فاکتورهای آلزایمری در موش‌های دیابتی را مورد بررسی قرار داد. باتوجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، مدل تجربی القاء دیابت توسط آلوکسان توانست میزان قندخون ناشتا در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم را به طور معنی‌داری افزایش دهد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که آلوکسان، دیابت را از طریق دو مکانیسم ایجاد می‌کند: اول، تحریک واکنش‌های اکسیداسیون در سلول‌های β پانکراس که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و دوم، دیپلاریزه کردن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ که به افزایش ورود کلسیم و در نتیجه افزایش رهاسازی انسولین منجر می‌شود. هر دو فرآیند نهایتاً منجر به مرگ سلول‌های β پانکراس می‌شود (۲۵). این موضوع، گویای هیپرگلیسمی به وجود آمده در اثر دیابت است که از طریق مکانیسم استرس اکسیداتیو و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و با ایجاد تداخل در مسیرهای ترانسسانی علامت مرتبط، نقش مهمی را در توسعه و پیشرفت نوروپاتی دیابتی بازی می‌کند که همراه آن دژنراسیون، تحلیل و آتروفی سلول‌های عصبی افزایش می‌یابند (۳).

کاهش سطوح BDNF و NGF در بیماران دیابتی می‌تواند منجر به اختلال در یکی از مهم‌ترین مسیرهای ترانسسانی علامت یعنی MAPK^۱ شود که ممکن است به ایجاد

^۲ Progressive supranuclear palsy^۳ Calcitonin gene-related peptide^۱ mitogen-activated protein kinase

نشان‌داده که یکی از عصاره‌های تأثیرگذار بر کاهش قندخون و بهبود عوارض ناشی از دیابت، فلاونوئیدها می‌باشند (۳۷). فلاونوئیدها با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی خود می‌تواند استرس اکسیداتیو را در بیماران دیابتی بهبود ببخشد. این به‌نوبه خود به بازیابی سطوح BDNF و ترانساری علامت در محافظت عصبی از طریق TrkB و سیناپتوفیزین‌ها کمک‌کند و در نتیجه از نورون‌ها در برابر آپوپتوز و دژنراسیون محافظت‌کند. چنین اثرات محافظت عصبی فلاونوئیدها در بیماران دیابتی با توانایی آن در مقابله با عدم تعادل ناشی از استرس اکسیداتیو در عوامل نوروتروفیک و مسیرهای ترانساری علامت آن‌ها مانند MAPK و PI3K/Akt و در جهت کاهش استرس اکسیداتیو، قادر به کمک در حفظ سطح و فعالیت BDNF و NGF و نیز اهداف پایین‌دستی آن‌ها نیز می‌شود که برای بقای نورون‌ها و عملکرد در بیماران دیابتی بسیار مهم هستند (۳۸). تحقیقات نشان‌داده است که افزایش ترشح انسولین از طریق هیپرتروفی سلول‌های بتا پانکراس، بهبود هیپرگلیسمی از طریق تنظیم متابولیسم گلوکز در سلول‌های هپاتوسیتی و کاهش مقاومت به انسولین و کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو در نتیجه مصرف فلاونوئیدها می‌باشد (۱۹). باتوجه به موارد اشاره‌شده و خصوصیات فوق‌العاده آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها می‌توان آن‌ها را در دسته‌ای از مولکول‌ها به‌عنوان مولکول‌های محافظ نورونی قرارداد.

در مطالعات اخیر نشان داده‌شده است که عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه حرا با افزایش مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسازی قندها از منابع ذخیره‌ای دارای اثرات هیپوگلیسمی در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده می‌باشند (۳۹). باتوجه به ناشناخته بودن مکانیسم مولکولی فلاونوئید عصاره حرا در اثرات هیپوگلیسمی اما منطبق بر تحقیقات اخیر دارای نظریه‌های احتمالی برای مکانیسم آن‌ها می‌باشد که عبارت‌اند از: ۱- افزایش مصرف گلوکز توسط سلول‌ها و در نتیجه کاهش گلوکز سرم. ۲- پروتئین‌ها ممکن است به مولکول‌های اضافی گلوکز در گردش خون متصل‌شوند و باعث کاهش سطح سرمی آن شوند. ۳- تحریک برخی از

اجسام لوی می‌گردد (۶، ۲۹، ۳۰). همچنین یافته‌ها حاکی از اهمیت انسولین برای بقای نورون‌ها و تحت‌تأثیر قرارگرفتن گیرنده‌های انسولین در مغز در اثر دیابت منجر به افزایش آمیلوئید بتا و هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تائو منجر شود که این عوامل به تجمع پلاک‌های آمیلوئید بتا و بروز آلزایمر کمک می‌کنند. در مطالعات بر روی موش‌های تراریخته، افزایش آمیلوئید بتا باعث تسریع فسفریلاسیون تائو و ظهور علائم بالینی آلزایمر شده است (۴، ۳۰، ۳۱)؛ به همین دلیل، آلزایمر به‌عنوان یک نوع دیابت مغزی شناخته‌شده و به‌عنوان دیابت نوع ۳ معرفی می‌شود. چراکه ویژگی‌های مولکولی و بیوشیمیایی آن با دیابت نوع ۱ و ۲ همپوشانی دارد (۳۲).

مطالعات اخیر بر روی مدل‌های حیوانی افزایش تجمع فیبریل‌های آمیلوئید بتا در ایجاد علائم اولیه در بیماران آلزایمری را نتیجه کاهش BDNF و NGF در سلول‌های عصبی موش‌های صحرایی دیابتی دانسته‌اند. با تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی، فرد با آبخاری از رویدادهای مرتبط با اختلال نورونی و عصبی، پاسخ‌های التهابی شدید، مرگ سلول‌های عصبی، اختلال در حافظه و زوال عقل مواجه می‌شود (۳۳). پیشنهادهای حاصل از مطالعات گذشته علاوه بر ارتباط مستقیم بین سمیت آمیلوئید بتا و آسیب‌شناسی تائو، به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در نتیجه اختلال در عملکرد میتوکندری نیز اشاره دارد (۳۰، ۳۴، ۳۵). باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش می‌توان تأیید کرد که دو فاکتور نوروتروفیک BDNF و NGF در گروه سالم دارای سطوح بالایی هستند و در مقابل دو فاکتور دخیل در آلزایمر یعنی Pt و Aβ 40 در سطوح پایین می‌باشند که با دیابتی شدن این موضوع دچار تغییر شده و عکس این قضیه صادق می‌شود.

مطالعات اخیر حاکی از خاصیت آنزیمی پپتیدهای آمیلوئید بتا است که می‌تواند با تولید پراکسید هیدروژن و احیاء آهن و یا اتصال به پروتئین‌های میتوکندریایی در تولید رادیکال‌های آزاد و القاء این رادیکال‌های آزاد توسط الیگومرهای تائو به سمت نورون‌ها، در التهاب سیستم اعصاب مرکزی نقش به‌سزایی داشته‌باشد (۳۶). تحقیقات



ژن‌های پروتئین توسط اجزاء خاصی از عصاره، باعث افزایش سنتز پروتئین می‌شود که منجر به اتصال بیشتر گلوکز در خون و بافت می‌شود. ۴- پروتئین‌های حامل گلوکز ممکن است تحت تأثیر برخی از مواد فعال موجود در عصاره قرار گیرند، بنابراین، انتقال گلوکز به سلول‌ها را افزایش می‌دهند. ۵- فلاونوئیدها ممکن است سلول‌های بتای پانکراس را تحریک کرده و ترشح انسولین را افزایش دهند. با این وجود، احتمال وجود ترکیبات ناشناخته دیگر که مستقل از فلاونوئیدها و یا با فلاونوئیدها در این اثرات هست وجود دارد که ممکن است با روش‌هایی مانند HPLC و غیره، غیر قابل تشخیص از فلاونوئیدها باشد (۴۰). و از طرفی وجود قوانین اخلاقی در استفاده از تعداد زیادی از نمونه‌ها در جهت آزمایش منجر به عدم داده‌های زیاد در بررسی پارامترها در نمونه دیابتی می‌شود (۲۳). با این وجود، با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان مشاهده کرد که با بهبود عوارض ناشی از دیابت از جمله افزایش ترشح انسولین، گروه موش‌های دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ و ۱۰۰، سطوح BDNF و NGF آن‌ها رو به افزایش بوده و در مقابل آن سطوح Pt و $A\beta$ 40 رو به کاهش است که این موضوع بیانگر اثر مثبت فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در بهبود عوارض ناشی از دیابت و پیشگیری از آلزایمر در طول دوره نقص بیماری متابولیکی دیابت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با فلاونوئید برگ گیاه حرا به صورت وابسته به دوز، می‌تواند با کاهش گلوکز خون در هیپرگلیسمی ناشی از دیابت، سطوح BDNF و NGF را افزایش دهد که در نتیجه سطوح Pt و $A\beta$ 40 از طریق مسیرهای ترانس‌سانی علامت در هیپوکامپ مغز کاهش می‌یابد. این موضوع نشان‌دهنده نقش مثبت فلاونوئید در پیشگیری از تخریب نورونی و افزایش شانس عملکرد انتقال‌دهنده‌های عصبی در دیابت است. با این حال، تحقیقات و سرنخ‌های مرتبط با این موضوع

ممکن است حتی به عوامل ناشناخته‌ای همچون ترکیباتی که عملکرد شبه انسولینی دارند مرتبط شود، ولی پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی در راستای بررسی دقیق‌تر ترکیبات موجود در این عصاره با استفاده از روش‌های نوین و دقیق‌تر و با احتمال خطای پایین‌تر و در جهت اثرات دیابت در بیماری اوتیسم صورت گیرد، چراکه اوتیسم نسبت به اختلالات تحلیل رونده عصبی تنها اختلالی است که نتایج نشان‌دهنده افزایش دو فاکتور BDNF و NGF در خون و مغز گروه شاهد دیابتی نسبت به شاهد سالم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از دانشگاه پیام نور جهت همکاری در انجام این طرح پژوهشی اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافی که ممکن است با چاپ مقاله به عنوان احتمال ایجاد تعارض منافع سایر مؤسسات تلقی و باعث سود یا زیان آنان شود، ندارند.

ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

تمامی روش‌های انجام شده در این پژوهش منطبق با قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بوده و کد اخلاقی این طرح پژوهشی IR.PNU.REC.1403.317 می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

راهله رهباریان: طراحی مطالعه، آنالیز داده‌ها، بازبینی اولیه و تایید نسخه نهایی

جلال شگفته: ارائه ایده پژوهشی، جمع‌آوری داده، نوشتن نسخه مقاله و تایید نسخه نهایی



References

1. Harreiter J ,Roden M. Diabetes mellitus–Definition ,Klassifikation ,Diagnose ,Screening und Prävention (Update 2023). Wiener Klinische Wochenschrift. 2023؛ 135(Suppl 1): 7-17.
2. Zaharia OP ,Strassburger K ,Strom A ,Bönhof GJ ,Karusheva Y ,Antoniou S ,et al. Risk of diabetes-associated diseases in subgroups of patients with recent-onset diabetes: a 5-year follow-up study. The lancet Diabetes & endocrinology. 2019؛ 7(9): 684-94.
3. Sadoughi D ,Edalatmanesh MA ,Rahbarian R. Investigating the effect of Avicennia Marina aqueous extract on neuronal density of hippocampal CA1 ,CA2 ,CA3 and dentate gyrus in diabetic rats. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2017؛ 5(2): 28-35. [Persian]
4. McNeilly AD ,Gallagher JR ,Dinkova-Kostova AT ,Hayes JD ,Sharkey J ,Ashford ML ,et al. Nrf2-mediated neuroprotection against recurrent hypoglycemia is insufficient to prevent cognitive impairment in a rodent model of type 1 diabetes. Diabetes. 2016؛ 65(10): 3151-60.
5. Roghani M ,Khalili M ,Baluchnejadmojarad T ,Heydari A. The effect of hesperetin on short-term spatial memory and passive avoidance learning and memory in diabetic rats. J Arak Uni Med Sci. 2011؛ 14(1): 46-54. [Persian]
6. Yaghoubi A ,Fallah-Mohammadi Z. Acute treadmill exercise increases heat shock protein 72 and total antioxidant capacity level in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. 2012.
7. Verdile G ,Fuller SJ ,Martins RN. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. Neurobiology of disease. 2015؛ 84: 22-38. [Persian]
8. Sadoughi D ,Khayatzaheh J. Effect of Curcumin on Hippocampal Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Serum Levels of Inflammatory Cytokines in Rat Model for Alzheimer's Disease. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2018؛ 6(1): 1-9. [Persian]
9. Boehme F ,Gil-Mohapel J ,Cox A ,Patten A ,Giles E ,Brocardo PS ,et al. Voluntary exercise induces adult hippocampal neurogenesis and BDNF expression in a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders. European Journal of Neuroscience. 2011؛ 33(10): 1799-811.
10. Edalatmanesh MA ,Sheikholeslami M ,Rafiei S. Evaluation of brain-derived neurotrophic factor expression and spatial memory after valproic acid administration in animal model of hippocampal degeneration. Feyz Medical Sciences Journal. 2018؛ 22(3): 283-91. [Persian]
11. I Jafari A ,AR V. Effects of insulin and ascorbic acid on inhibition of the apoptosis in hippocampus of STZ-Induced diabetic rats. 2010.
12. Reagan LP. Insulin signaling effects on memory and mood. Current opinion in pharmacology. 2007؛ 7(6): 633-7.
13. Jafari Anar Kouli I ,Sankian M ,Varasteh A ,Haghir H. Effects of insulin and ascorbic acid on inhibition of the apoptosis in hippocampus of STZ-induced diabetic Rats. Anatomical Sciences Journal. 2009؛ 7(28): 133-43.
14. Narayan KV ,Gregg EW ,Fagot-Campagna A ,Engelgau MM ,Vinicor F. Diabetes—a common ,growing ,serious ,costly ,and potentially preventable public health problem. Diabetes research and clinical practice. 2000؛ 50: S77-S84.
15. J Allen S ,J Watson J ,Dawbarn D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. Current neuropharmacology. 2011؛ 9(4): 559-73.
16. O'Brien RJ ,Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci. 2011؛ 34: 185-204.



17. Kandimalla R ,Manczak M ,Fry D ,Suneetha Y ,Sesaki H ,Reddy PH. Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*. 2016؛ 25(22): 4881-97.
18. Khaledi S ,Ahmadi S. Amyloid Beta and Tau: from Physiology to Pathology in Alzheimer's Disease. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2016؛ 4(4): 67-88. [Persian]
19. Rahbarian R. The Effect of Avicennia marina Flavonoids on Bax ,Bcl-2 and Stress Oxidation Indicators of Epididymis Sperm in Type 1 Diabetic Rats. *Journal of Animal Biology*. 2024؛ 16(2): 175-87. [Persian]
20. Saenger P ,West PW. Phenotypic variation of the mangrove species Avicennia marina (Forssk.) Vierh. from seven provenances around Australia. *Aquatic botany*. 2018؛ 149: 28-32.
21. Leme JACdA ,Gomes RJ ,Mello MARd ,Luciano E. Moderate physical training increases brain insulin concentrations in experimental diabetic rats. 2008.
22. Macdonald Ighodaro O ,Mohammed Adeosun A ,Adeboye Akinloye O. Alloxan-induced diabetes ,a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 2017؛ 53(6): 365-74.
23. Ahmadi-Noorbakhsh S. Sample size calculation for animal studies -with emphasis on the ethical principles of reduction of animal use. *Pejouhesh dar Pezeshki (Research in Medicine)*. 2018؛ 42(3): 144-53. [Persian]
24. Bazyar Y ,Rafiei S ,Hosseini A ,Edalatmanesh MA. Effect of endurance exercise training and gallic acid on tumor necrosis factor- α in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurosci J Shefaye Khatam*. 2015؛ 3(3): 21-6. [Persian]
25. Ighodaro OM ,Adeosun AM ,Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes ,a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 2017؛ 53(6): 365-74.
26. Moosaie F ,Mohammadi S ,Saghazadeh A ,Dehghani Firouzabadi F ,Rezaei N. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2023؛ 18(2): e0268816.
27. Damirchi A ,Azali Alamdari K ,Babaei P. Effects of submaximal aerobic training and following detraining on serum BDNF level and memory function in midlife healthy untrained males. *Metabolism and Exercise*. 2012؛ 2(2): 135-47.
28. Sadoughi SD ,Khayatzadeh J. Effect of Curcumin on Hippocampal Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Serum Levels of Inflammatory Cytokines in Rat Model for Alzheimer's Disease. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2018؛ 6(1): 1-9. [Persian]
29. Benussi L ,Binetti G ,Ghidoni R. Loss of neuroprotective factors in neurodegenerative dementias: the end or the starting point? *Frontiers in neuroscience*. 2017؛ 11: 312759.
30. Falah Mohammadi Z ,Ebrahimzadeh M. The Effect of Allium Paradoxum Extract Combined with Voluntary Wheel Running on Brain Amyloid Beta (A β 1-42) Levels in Diabetic Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2013؛ 5(1): 21-34. [Persian]
31. Ghalavand A ,Saki H ,Nazem F ,Khademitab N ,Behzadi Nezhad H ,Behbodi M ,et al. The effect of ganoderma supplementation and selected exercise training on glycemic control in boys with type 1 diabetes. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2021؛ 20(4): 356-65.
32. KHosravi M ,Esmaeili M ,Mafi M. The Effect of Metformin on spatial learning and memory in streptozotocin Rat Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 1970؛ 21(4): 646-54. [Persian]



33. Sadoughi SD ،Chamipa M. Effects of aqueous extract of *Holothuria arenicola* and low frequency electromagnetic field on serum insulin ،glucose and beta-amyloid (A β 1-42) in diabetic rats. *Feyz Medical Sciences Journal*. 2016؛ 20(1): 1-10. [Persian]
34. Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*. 2014؛ 71(4): 505-8.
35. Lloret A ،Badia M-C ،Giraldo E ،Ermak G ،Alonso M-D ،Pallardó FV ،et al. Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011؛ 27(4): 701-9.
36. Jafari A ،Khakpour Taleghani B. The effect of flavonoids in the treatment of Alzheimer's disease: review article. *Tehran University Medical Journal*. 2021؛ 79(1): 1-9. [Persian]
37. Yeon J-Y ،Bae YJ ،Kim E-Y ،Lee E-J. Association between flavonoid intake and diabetes risk among the Koreans. *Clinica Chimica Acta*. 2015؛ 439: 225-30.
38. Al-Dosari DI ،Ahmed MM ،Al-Rejaie SS ،Alhomida AS ،Ola MS. Flavonoid naringenin attenuates oxidative stress ،apoptosis and improves neurotrophic effects in the diabetic rat retina. *Nutrients*. 2017؛ 9(10): 1161.
39. Franco R ،Sánchez-Olea R ،Reyes-Reyes EM ،Panayiotidis MI. Environmental toxicity ،oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009؛ 674(1-2): 3-22.
40. Kamaei L ،Moghadamnia D. Comparison of Antidiabetic Effects of Aqueous Extract of the Leaves and Fruits of *Avicennia Marina* in Streptozotocin-induced Diabetic Male Rats. *Iranian Journal of Toxicology*. 2019؛ 13(2): 7-12.



The Effect of Flavonoid Extract from the Mangrove (*Avicennia Marina*) Leaf Extract on Neurotrophins in the Hippocampus and Alzheimer's Factors in Diabetic Rats

Raheleh Rahbarian^{1*}, Jalal Shegoft¹

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

Type of Article Original Research	Abstract
Received: 21/07/2024 Accepted: 19/11/2024 *Corresponding Author: Raheleh Rahbarian, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran TEL: 09153518157 Email: (a_rahbarian@pnu.ac.ir)	Introduction: Research has demonstrated that the flavonoids found in the leaves of the A. Mariana can enhance neuronal damage resulting from diabetes. This study aims to explore the effect of flavonoid extract from the mangrove (<i>Avicennia marina</i>) leaf extract on neurotrophins in the hippocampus and Alzheimer's factors in diabetic rats. Methods: In this experimental study 32 rats were divided into control, diabetic control, and two treatment groups receiving 50 and 100 mg/kg doses of flavonoids from A. Mariana. Diabetes was induced in the diabetic groups with a single intraperitoneal injection of alloxan (120 mg/kg). The treated groups received flavonoids for 30 days. Post-treatment, brains were extracted, and levels of BDNF, NGF, Pt, and Aβ 40 were quantified using the ELISA method. Results: Based on the results obtained, the levels of BDNF and NGF in diabetic rats treated with doses of 50 and 100 mg/kg of flavonoids from the A. Mariana significantly increased in a dose-dependent manner compared to the diabetic control group, while the levels of Pt and Aβ 40 significantly decreased ($p < 0.05$). Conclusion: The flavonoid derived from the A. Mariana mitigates oxidative stress due to its antioxidant properties, regulating free radicals and antioxidants in the body. This process results in enhanced secretion of BDNF, NGF, and ultimately lowering levels of Pt and Aβ 40. Keywords: Flavonoid, A. Marina, Neurotrophins, Diabetes, Alzheimer, Phospho-tau, Amyloid-β, NGF, BDNF

► **Please cite this article as:** Rahbarian R, Shegoft J. The Effect of Flavonoid Extract from the Mangrove (*Avicennia Marina*) Leaf Extract on Neurotrophins in the Hippocampus and Alzheimer's Factors in Diabetic Rats. J Neyshabur Univ Med Sci 2023;11(2):75-86.