مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر مصرف رزوراترول بر پروفایل متابولیکی سرمی بیماران دیابتی نوع ۱ با استفاده از روش طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته (1HNMR)

سید حمید رضا هدایی[۱]، صمد اکبرزاده[۲]، محمد ارجمند[۳]، زیبا اکبری[۳]، نجمه حاجیان[۱]، اعظم امینی[۴]، علی موحد[۲*]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، بوشهر، ایران
۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، بوشهر، ایران
۳- گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع ۱ موجب آسیب به سلول‌های بتای لوزالمعده و کاهش انسولین و هیپرگلیسمی می‌شود. هدف از این مطالعه کاربرد روش طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته جهت بررسی تأثیر مصرف رزوراترول بر مسیرهای متابولیکی درون‌سلولی بیماران دیابتی نوع ۱ است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه کارآزمایی بالینی باهدف طراحی قبل و بعد جستجوگر، بر روی ۱۳ بیمار دیابتی نوع ۱ انجام شد. تمامی شرکت‌کننده‌ها طی مدت دو ماه، روزانه دو نوبت کپسول رزوراترول ۵۰۰ میلی‌گرمی دریافت نمودند. خون‌گیری از بیماران در سه نوبت، قبل از مصرف رزوراترول، بعد از ۳۰ روز و نهایتاً ۶۰ روز پس از مصرف دارو انجام شد. طیف‌سنجی تشدید مغناطیس هسته (HNMR) بر روی تمامی نمونه‌ها صورت گرفت و داده‌های خام حاصل از HNMR، به کمک روش حداقل مربعات جزئی چند متغیره (PLSDA) مورد آنالیز، مقایسه و تغییرات متابولیت‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی موردبررسی قرار گرفتند.

نتایج: عمده‌ترین تغییرات در مسیر متابولیسم اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و بلند، مسیر متابولیسم تری گلیسیرید، ۱-پروپانول، بوتانوئیک اسید می‌باشند که با افزایش متابولیت‌های بوتیرآلدهید و ۱- بوتانول همراه است.

نتیجه‌گیری: نتایج کاهش بیوسنتز پالمیتات را نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رزوراترول ممکن است به‌واسطه‌ی اثرات مستقیم بر روی مسیرهای متابولیکی گوناگون درون سلول به‌ویژه آدیپوژنز، القای آپوپتوز در آدیپوسیت‌ها، تغییرات مهمی روی توده‌های چربی داشته باشد و همچنین در بهبود تولید و اثر انسولین و کاهش قند خون نقش ایفا نماید.

کلمات کلیدی: رزوراترول، دیابت نوع ۱، متابولومیکس، HNMR، PLSDA

مقدمه

دیابت نوع یک، نوعی بیماری خود ایمنی است که در آن آسیب رسیدن به سلول‌های بتای لانگرهانس سبب کمبود انسولین و هیپرگلیسمی شده است، این عارضه عموماً به دلایل ژنتیکی نظیر اختلال در واسطه‌های ایمنی رخ می‌دهد (۱، ۲). شروع علائم کلینیکی در این بیماران درست زمانی اتفاق می‌افتد که کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در عملکرد سلول‌های بتای لانگرهانس به دلیل آسیب و یا تخریب سیستماتیک این سلول‌ها به وجود می‌آید. این بیماری اغلب در کودکان و نوجوانان بروز می‌کند و علائمی همچون پرخوری، پرنوشی، پر ادراری و نیز قند خون بسیار بالا را در بر دارد. این بیماران جهت تنظیم قند خون و متابولیسم گلوکز نیازمند به انسولین تزریقی مادام‌العمر می‌باشند (۳). بر اساس شواهد متعدد، بیماری دیابت در قرن جدید یکی از اساسی‌ترین چالش‌های بهداشت در منطقه‌ی مدیترانه‌ی شرقی است. بیماری‌زایی این عارضه چه ازنظر هزینه‌های درمانی و چه ازکارافتادگی بسیار بالا بوده که البته بار مالی آن بر دوش دولت‌ها و نظام بهداشتی در کشورهای مختلف خواهد بود و یکی از عمده‌ترین مسائل بهداشتی و درمانی انسانی در حوزه‌ی کلان

***نویسنده مسئول: علی موحد**، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، بوشهر، ایران
Email: amovahed58@gmail.com
https:///orcid.org/0000-0002-1988-4091

است. شایان‌ذکر است در ایالات‌متحده رتینوپاتی دیابتی علت اصلی کوری و نفروپاتی دیابتی شایع‌ترین علت نارسایی مزمن کلیه در سن ۲۰ تا ۷۴ سالگی و نیز علت اصلی تقریباً ۶۰ درصد از موارد قطع عضو بدون تروما گزارش‌شده است (۴). یکی از راهکارها در جهت پیشگیری و بهبود درمان بیماران دیابتی، تشویق بیماران به مصرف مکمل‌های طبیعی و خصوصاً موادی است که حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند. ازجمله این محصولات، پلی فنل‌های فلاوونوییدی در چای سبز، کورستین در سیب و پلی فنل‌های غیرفلاوونوییدی از قبیل کورکومین در زردچوبه و رزوراترول در انگور است (۵، ۶). رزوراترول (۳، ۵، ۴، تری هیدروکسی- ترانس- استیل بین) از عصاره‌ی انگور قرمز استخراج می‌شود. این ترکیب به دلیل اثرات مفیدی که در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها ازجمله سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و سندرم متابولیکی همچون دیابت، اختلالات مغزی و درمان آلزایمر دارد اخیراً موردتوجه پژوهشگران قرارگرفته است (۷). متابولومیکس علم نوینی است که ارتباط قوی با علم پزشکی برقرار نموده و دارای کاربردهای متفاوتی است. روش تشخیصی متابولومیکس، کاملاً غیرتهاجمی بوده و نسبت به روش‌های تشخیصی تهاجمی ارجحیت دارد. متابولومیکس نمایی شفاف و روشن به اثرات رژیم غذایی، داروها و بیماری ارائه می‌دهد و به‌منظور سنجش پاسخ ارگانیسم به یک تحریک فیزیولوژیکی در مایعات زیستی بکار برده می‌شود (۱۰-۸). رزونانس مغناطیسی هسته روشی مفید برای شناسایی، تجزیه‌وتحلیل ترکیبات آلی است. این روش فوق‌العاده مهم، بر اساس اسپین مغناطیسی هسته‌های H۱، C۱۳، N۱۵، F۱۹، P۳۱ و اتم‌های مشابه پایه‌گذاری شده است. تحقیقات سیستماتیک بافت‌ها و مایعات زیستی با استفاده از رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) برای آشکارسازی و تشخیص بیماری‌ها، در اواسط دهه ۱۹۸۰ موازی با توسعه MRI برای تشخیص مشکلات درون بدن شروع شد (۱۱، ۱۲). امروزه روش رزونانس مغناطیسی هسته روش نسبتاً قدرتمندی است که می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در رابطه با ساختمان ماکرومولکول‌های زیستی، برهمکنش بین مولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها، حرکت و دینامیسم‌های مولکولی ارائه کند. با این روش می‌توان پیش‌بینی نمود که چند نوع هسته با موقعیت محیطی مختلف در یک مولکول یافت می‌شود و همچنین دریافت که چه اتم‌هایی در روی گروه‌های مجاور وجود دارند (۱۳، ۱۴).

علاوه بر این، شواهدی دال بر نقش اسیدهای آمینه شاخه‌دار، آسیل کارنیتین و اسیدهای آمینه عطری در ایجاد مقاومت انسولینی وجود دارد که منجر به آشکار شدن نقایص متابولیسم اسیدهای آمینه، بتا-اکسیداسیون چربی‌ها و چرخه کربس می‌شود که می‌توان این مکانیسم‌ها را از طریق مطالعات متابولومیکسی با کمترین زمان و به‌طور دقیق شناسایی نمود؛ بنابراین، مطالعات متابولومیکسی یک رویکرد امیدوارکننده‌ای است برای شناسایی ترکیبات شیمیایی که در روند ردیابی زودهنگام، تشخیص، پیش‌بینی پاسخ‌های درمانی و به‌طورکلی پیش‌بینی بیماری نقش ایفا می‌کنند (۱۵).

همچنین ادرار، پلاسما و سرم خون متداول‌ترین مایعات زیستی در مطالعات متابولومیکس می‌باشند (۱۴). قبلاً مطالعات متابولومیکس در مورد بیماری دیابت نوع ۲ انجام پذیرفته و نشان‌دهنده‌ی افزایش آستانه تشخیص و پیش‌بینی این بیماری بوده است (۱۵). درنهایت، جهت بهبودی دوره بالینی بیماری‌ها، روش‌های تشخیصی و ارزیابی‌های دقیق‌تری هر چه زودتر موردنیاز است؛ بنابراین، به‌منظور دستیابی به این مهم علم متابولومیکس فرصت‌های جدیدی ایجاد نموده است برای کشف بیومارکرها در بیماری‌های پیچیده و مزمن و ممکن است در آینده کمک کند به فهم بیشتر از آسیب‌زایی بیماری‌ها در مقایسه با روش‌های سنتی (۱۶) بر همین اساس، هدف این مطالعه بر این بوده است که به کمک طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی، تغییرات متابولیتی ناشی از مصرف رزوراترول را در خون بیماران دیابتی نوع یک، در سه بازه‌ی زمانی قبل از مصرف، حین و بعد از مصرف گزارش گردد تا به کمک اطلاعات کلیدی حاصله، بتوانیم راه‌حل‌های بهینه و کاربردی‌تری را در راستای پیشگیری و درمان این بیماران ارائه نماییم.

مواد و روش‌ها

گروه تحت درمان با رزوراترول

جامعه موردمطالعه در این بررسی، ۱۳ بیمار از هر دو جنس زن و مرد دیابت نوع یک در محدوده‌ی سنی ۱۲ تا ۴۰ سال از بیمارستان تأمین اجتماعی بوشهر بوده است.

پروتکل این مطالعه با کد اخلاق IRCT201710108129N11 در مرکز ثبت کار آزمایی بالینی ایران به ثبت رسیده است و کلیه مراحل این تحقیق با رعایت این کد اخلاق صورت پذیرفته است.

در طی مدت مطالعه، بیماران تحت مراقبت‌های پزشکی و مشاوره رایگان خصوصاً در برابر هرگونه عوارض و واکنش نامطلوب ناشی از مصرف رزوراترول قرار گرفتند و بر اساس نحوه اثر مداخله‌گر درمانی یا همان مکمل رزوراترول، به سه گروه قبل از تجویز (نوبت یک)، یک ماه بعد از تجویز (نوبت ۲) و دو ماه بعد از تجویز (نوبت ۳) تقسیم‌بندی شدند.

جهت بررسی اطلاعات بیماران اقدام به طراحی پرسشنامه‌ای جهت ایجاد فایلی مشخص از اطلاعات فردی و بالینی بیماران شد. بعد از بررسی پرسشنامه و نیز انجام آزمایش‌های اولیه مربوط به احراز نوع بیماری و نیز تائیدیه پزشک و نیز توجه به معیارهای ورود و خروج از این طرح، بیماران موردنظر انتخاب شدند.

محدودیت‌های مطالعه و پذیرش بیماران

معیارهای ورود به مطالعه؛ بیماران دیابتی نوع یک مراجعه‌کننده به بیمارستان تأمین اجتماعی شهر بوشهر در بازه سنی ۴۰-۱۲ و معیارهای خروج از مطالعه، BMI بیشتر از ۳۰(۱۷) و افراد دیابتی نوع یک دارای هیپو یا هیپرتیروئیدی و نیز دیابت نوع یک بدون شروع درمان دارویی مناسب توسط پزشک بوده است.

نحوه‌ی درمان بیماران در گروه تحت درمان

کلیه بیماران (زن و مرد) به مدت دو ماه صبح و شب، روزانه با دو عدد کپسول ۵۰۰ میلی‌گرمی رزوراترول ۹۹ درصد خلوص ساخته‌شده در شرکت Bolivia, Bioceuticals (International SrI, Italy دریافت نمودند. همچنین مشخصات فردی و سلامت عمومی شامل قد، عادات اجتماعی (سیگار کشیدن، بی‌تحرکی و غیره)، فشارخون و شاخص توده بدنی و اطلاعات کلینیکال برای هر فرد ثبت گردید. در این پژوهش بیماران به مراکز درمانی از پیش تعیین‌شده مراجعه نمودند. نحوه‌ی نمونه‌گیری خون مجموعاً در سه مرحله قبل از مصرف دارو، یک ماه بعد از مصرف دارو، دو ماه بعد از مصرف دارو صورت گرفته است و سرم خون تهیه‌شده و در ویال‌های استریل، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام طیف‌سنجی نگه‌داری شدند.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته با دستگاه بروکر ۴۰۰ مگاهرتز و به کمک پروتکل CPMG[1] در دانشگاه اصفهان انجام گرفت. درروش CPMG، کلیه‌ی طیف‌های ماکرومولکول‌ها مانند پروتئین و غیره حذف گردیده و متابولیت‌هایی با حداکثر وزن مولکولی ۱۵۰۰ دالتون مورد آنالیز قرار گرفتند. لذا جهت انجام طیف‌سنجی، مقدار مشخصی از نمونه سرم به همراه دوتریم داخل پروب قرار گرفت و فرکانس اسپکترومتر روی رزونانس دوتریم که ناشی از حلال NMR است قرار گرفت. TSP[2] به‌عنوان ماده شاهد در طیف‌سنجی مورداستفاده قرار گرفت و از ایمیدازول به‌عنوان ماده شاهد pH در نمونه‌ها استفاده گردید. نمونه‌ها به میزان ۵۱۲ بار اسکن شده و تأخیر اولیه روی ۱/۵ ثانیه و تأخیر دوم روی ۰/۰۳ ثانیه تنظیم شد. پیک آب سرکوب شد و طیف حاصله به کمک نرم‌افزار دست‌نویس پرومتب (ProMetab) در محیط متلب (MATLAB) جهت انجام آنالیز آماری پردازش و آماده گردید. در این راستا داده‌ها اول نرمال‌سازی شده و پیک آب در جابجایی شیمیایی ۴/۷ حذف گردید. طیف‌ها به باکت‌های ۰/۰۰۵ تقسیم و درنهایت به ماتریس عددی تبدیل شدند.

آنالیز داده‌های حاصله از طیف‌سنجی

جهت انجام آنالیز داده‌ها از روش طبقه‌بندی آنالیز مربعات جزئیPLS-DA در محیط نرم‌افزاری متلب استفاده گردید. پلات‌های اسکور و لودینگ پلات‌ها تهیه شدند و بر اساس متغیرهای متمایز شده، جابجایی‌های شیمیایی آن‌ها در سه گروه موردمطالعه به دست آمد. جابجایی‌های شیمیایی به کمک بانک متابولیتی، با یکدیگر مقایسه و مسیرهای متابولیسمی و تغییرات متابولیتی صورت گرفته در این بررسی مشخص گردید.

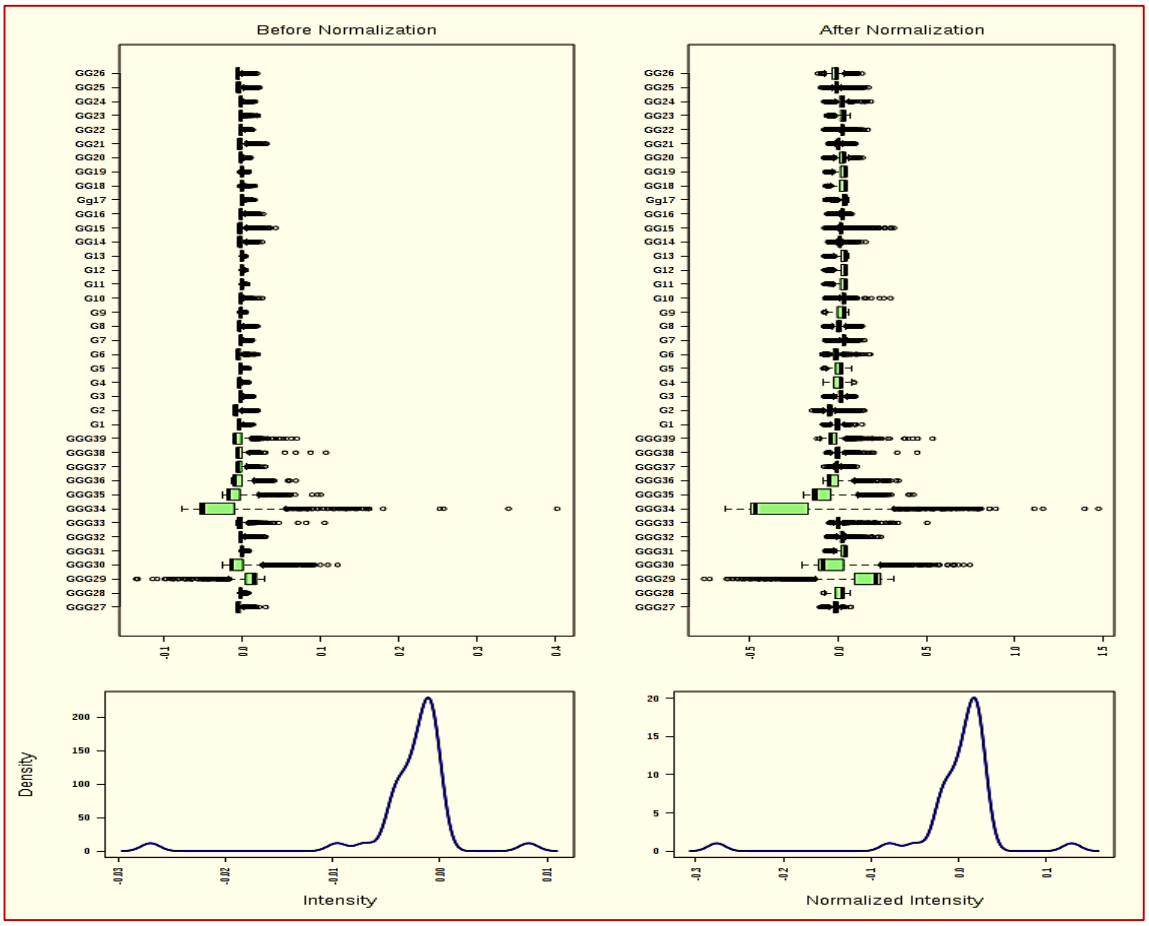
نتایج

یافته‌های تحقیق حاکی از جداسازی مسیرهای بیوسنتز اسیدهای چرب به همراه مسیر متابولیسمی گلیسرولیپید و مسیرهای متابولیسم بوتانوئیک اسید است. در این راستا داده‌ها قبل و بعد از نرمال‌سازی در شکل ۱ نشان داده‌شده‌اند. همچنین اسکورپلات داده‌ها در شکل ۲ قابل‌مشاهده است که در این پلات به‌خوبی نمایانگر تفاوت میان گروه اول بیماران با گروه ۲ و ۳ است.

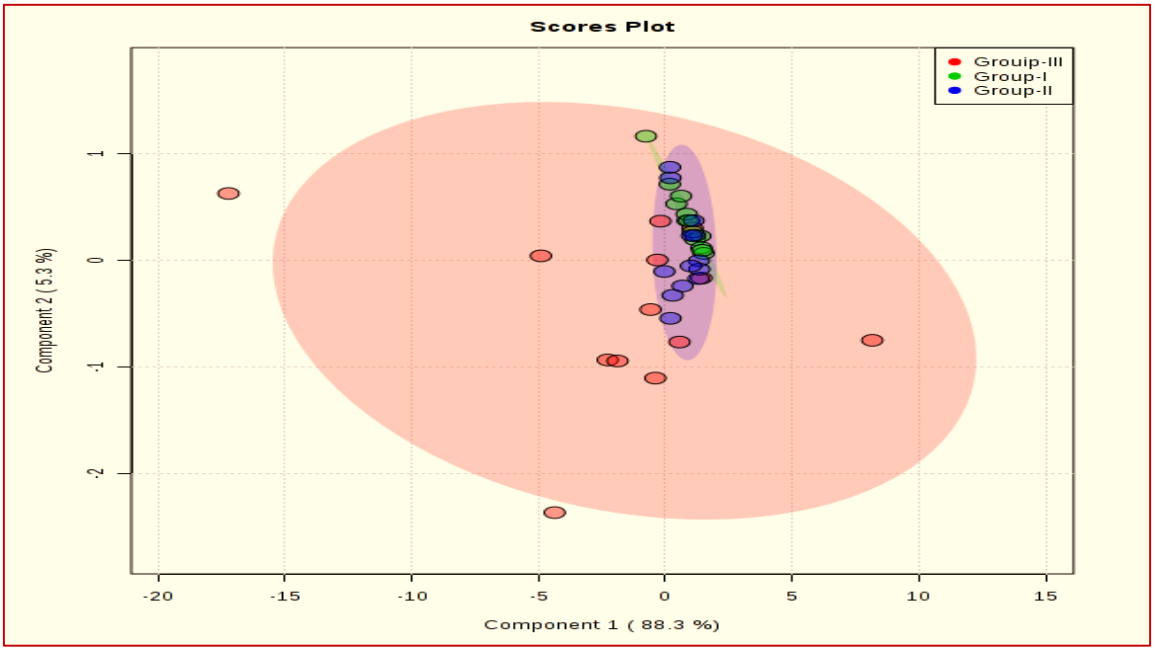
شکل ۲ اسکورپلات که نمودار یک جزء از نمودار بالا را به نمایش می‌گذارد. تفکیک گروه‌ها بر اساس رنگ صورت پذیرفته و بیانگر این است که جابه‌جایی‌های شیمیایی در گروه‌های یک و دو بسیار به یکدیگر مشابه و نزدیک بوده است همچنین نشان می‌دهد که حداقل تغییرات در جابه‌جایی‌های شیمیایی بوده

[1] The Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence

[2] Trimethylsilylpropanoic acid

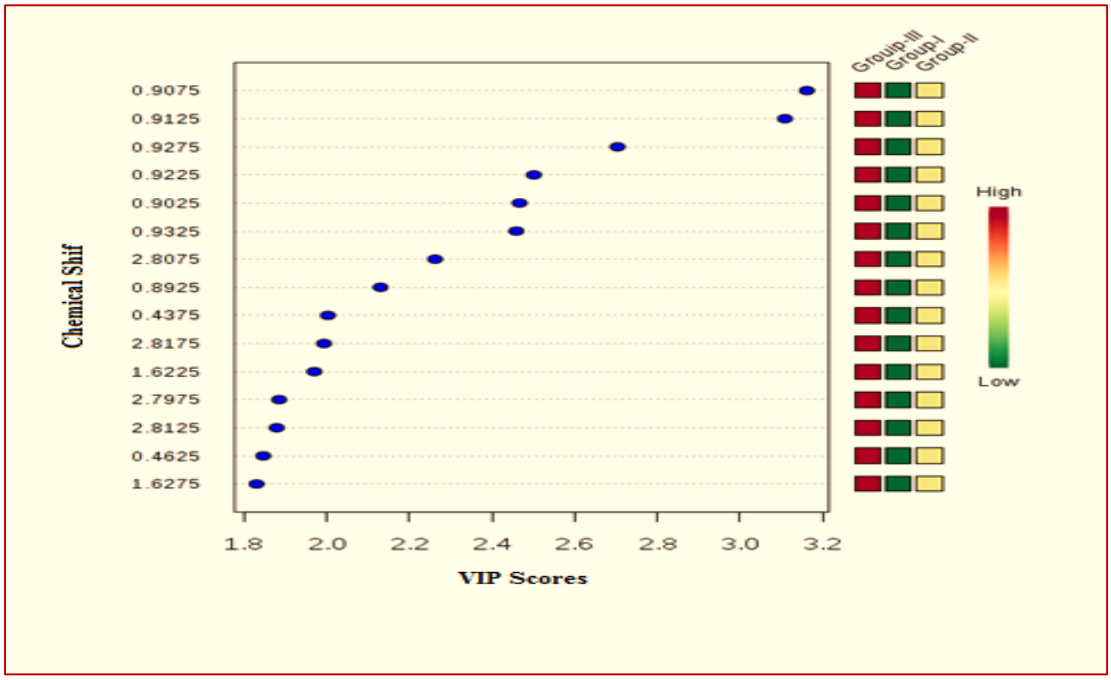


شکل ۱- داده‌های قبل از نرمال‌سازی در پلات سمت چپ و بعد نرمال‌سازی در پلات سمت راست

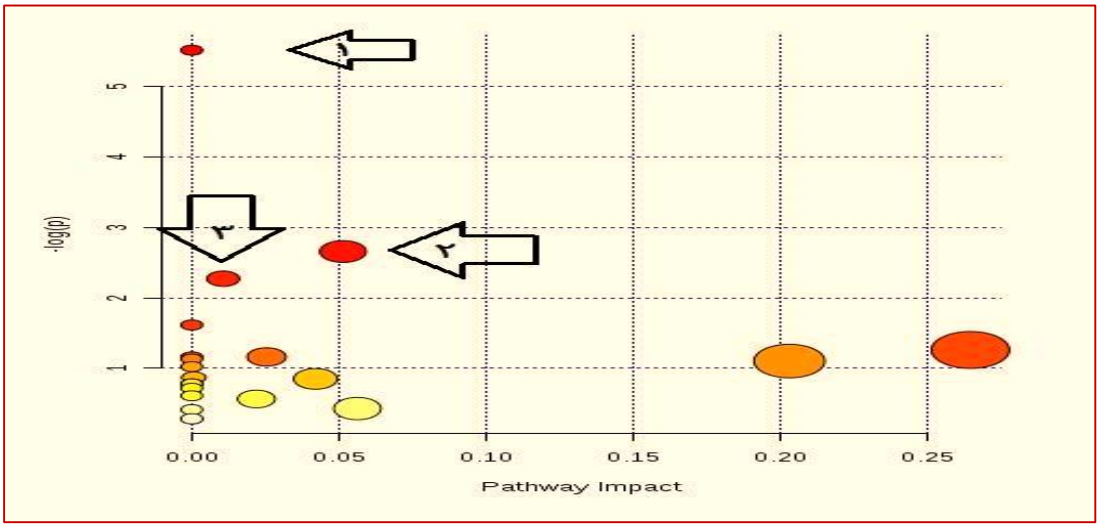


شکل ۲- اسکورپلات متابولیت‌ها

است؛ اما در گروه ۳ این جابه‌جایی‌ها متمایز شده و تغییرات متابولیت‌ها بر اساس میزان فاصله از مرکز، قابل‌بررسی می‌باشند. VIP شکل ۳ بیانگر ارتباط میان متابولیت‌ها است. نقاطی که از صفر فاصله‌دارند درواقع، متابولیت‌هایی هستند که تغییر داشته‌اند و از آن‌ها می‌توان شیفت‌های شیمیایی موردنظر را به دست آورد. در این نمودار هر سه گروه به‌خوبی تفکیک‌شده‌اند و میزان تغییرات در هر سه گروه، کاملاً مشخص‌شده است. بیشترین تغییرات معنادار، در گروه سوم (بیمارانی که دو ماه رزوراترول را مصرف کردند) دیده‌شده است. مهم‌ترین جابجایی‌های شیمیایی مربوط به داده‌ها در شکل ۴ نشان داده‌شده است. مهم‌ترین جابجایی‌های شیمیایی این پژوهش شامل طیف‌های محدوده سرم خون بوده است که منحصراً در ناحیه متابولیت‌های سرم خون قرار دارند. در این شکل افزایش غلظت متابولیت‌ها و رنگ زرد ابتدای شروع افزایشی غلظت متابولیت‌ها و رنگ سبز عدم‌تغییر در غلظت متابولیت‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۳- VIP Scores نشانگر میزان اهمیت جابجایی‌های شیمیایی و متابولیت‌ها



شکل ۴- توپوگرافی مسیرهای بیوشیمیایی تغییریافته

در جدول ۱ میزان نرخ کشف خطای مثبت به همراه میزان خطای انطباق مسیر و مشخصات مسیرهای تغییریافته ارائه گردیده است.

مسیرهایی جدول ۲ که دارای مقدار P Value کمتر از ۰/۰۰۵ و مقدار FDR (میزان خطای مثبت) کوچک‌تر باشند، بیانگر نتایج معنادار می‌باشند.

جدول ۱- نتایج حاصل از استخراج مسیر و چرخه‌ی متابولیت‌های تغییریافته

مسیرهای متابولیسمی	تعداد کل ترکیبات مسیر	نسبت متابولیت‌های تغییریافته مورد انتظار	تعداد متابولیت‌های تغییریافته	میزان خطای انطباق مسیر	نرخ کشف خطای مثبت
Fatty acid biosynthesis	۴۹	۰/۶۷۱۷۹	۴	۰/۰۰۴۰۱۹	۳/۲۲E-۰۱
Glycerolipid metabolism	۳۲	۰/۴۳۸۷۲	۲	۰/۰۷۰۰۲۴	۱/۰۰E+۰۰
Butanoate metabolism	۴۰	۰/۵۴۸۴	۲	۰/۱۰۲۹۷	۱/۰۰E+۰۰
Cyanoamino acid metabolism	۱۶	۰/۲۱۹۳۶	۱	۰/۱۹۸۷۴	۱/۰۰E+۰۰
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	۲۴	۰/۳۲۹۰۴	۱	۰/۲۸۳۱۷	۱/۰۰E+۰۰
Pantothenate and CoA biosynthesis	۲۷	۰/۳۷۰۱۷	۱	۰/۳۱۲۵۵	۱/۰۰E+۰۰
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	۲۷	۰/۳۷۰۱۷	۱	۰/۳۱۲۵۵	۱/۰۰E+۰۰
beta-Alanine metabolism	۲۸	۰/۳۸۳۸۸	۱	۰/۳۲۲۰۹	۱/۰۰E+۰۰
alpha-Linolenic acid metabolism	۲۹	۰/۳۹۷۵۹	۱	۰/۳۳۱۴۹	۱/۰۰E+۰۰
Lysine biosynthesis	۳۲	۰/۴۳۸۷۲	۱	۰/۳۵۸۹۵	۱/۰۰E+۰۰
Nitrogen metabolism	۳۹	۰/۵۳۴۶۹	۱	۰/۴۱۸۸۳	۱/۰۰E+۰۰
Valine, leucine and isoleucine degradation	۴۰	۰/۵۴۸۴	۱	۰/۴۲۶۹۳	۱/۰۰E+۰۰
Histidine metabolism	۴۴	۰/۶۰۳۲۴	۱	۰/۴۵۸۲۵	۱/۰۰E+۰۰
Nicotinate and nicotinamide metabolism	۴۴	۰/۶۰۳۲۴	۱	۰/۴۵۸۲۵	۱/۰۰E+۰۰
Glycine, serine and threonine metabolism	۴۸	۰/۶۵۸۰۸	۱	۰/۴۸۷۹	۱/۰۰E+۰۰
Cysteine and methionine metabolism	۵۶	۰/۷۶۷۷۶	۱	۰/۵۴۲۵۶	۱/۰۰E+۰۰
Pyrimidine metabolism	۶۰	۰/۸۲۲۶	۱	۰/۵۶۷۷۲	۱/۰۰E+۰۰
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	۷۵	۱/۰۲۸۳	۱	۰/۶۵۰۶۷	۱/۰۰E+۰۰
Arginine and proline metabolism	۷۷	۱/۰۵۵۷	۱	۰/۶۶۰۴۹	۱/۰۰E+۰۰
Steroid hormone biosynthesis	۹۹	۱/۳۵۷۳	۱	۰/۷۵۲۲۹	۱/۰۰E+۰۰00

جدول ۲- مسیرهای متابولیسمی و متابولیت‌های تغییریافته در آن‌ها

مسیرهای متابولیسمی	متابولیت‌های تغییریافته
مسیر متابولیسم فتی اسید بیوسینتاز	اسیدهای چرب
مسیر متابولیسم گلیسرولیپید	تری گلیسیرید و ۱- پروپانول
مسیر متابولیسم بوتانوئیک اسید	بوتیرآلدهید و ۱-Butanol

بحث

با اثر رزوراترول در مدت کوتاه سی دقیقه روی بیوسنتز اسید چرب تا چهارده کربنه در هپاتوسیت‌های موش، محققین دریافتند که رزوراترول باعث کاهش بیوسنتز اسیدهای چرب که مهم‌ترین آن بیوسنتز پالمیتات بود، گردیده و محققین بر این باور بودند که این مهم احتمالاً از طریق تأثیر رزوراترول روی آنزیم‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب دی نووو حاصل می‌گردد. همچنین رزوراترول باعث کاهش تجمع اسیدهای چرب نیز شده بود (۱۸). نتایج این تحقیق حاکی از کاهش بیوسنتز پالمیتات بوده و با احراز افزایش غلظت اسیدهای چرب زنجیره متوسط ما از قبیل اسید کاپریک، لوریک اسید و مریستیک اسید در نتایج NMR با مصرف رزوراترول می‌توان اظهار داشت؛ پالمیتات به‌عنوان محصول اسید چرب بیوسینتاز با کاهش معناداری روبه‌رو شده است. فعالیت آدیپوژنیک رزوراترول منجر به کاهش تجمع چربی‌ها خواهد شد.

رزوراترول باعث فرو تنظیمی ژن‌هایی همچون PPARγ, FAS, HSL, LPL1, C/EBPα, SREBP-1c و فراتنظیمی ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی فعالیت میتوکندریایی همچون SRIT-3 UCP-2, Mfn-1, می‌گردد. این نتایج نشان می‌دهد که رزوراترول ممکن است به‌واسطه‌ی اثرات مستقیم در توانایی سلولی و آدیپوژنز در بلوغ پره آدیپوسیت‌ها و القای آپوپتوز در آدیپوسیت‌ها، تغییرات مهمی روی توده‌های چربی داشته باشد و به‌عنوان یک روش درمانی کاربردی در چاقی مورداستفاده قرار گیرد (۱۹). متابولیت‌های تغییریافته در اسید چرب بیو سینتاز دکانوئیک اسید: N–کاپریک اسید (10c)، دودکانوئیک اسید: لوریک اسید (12c)، تترادکانوئیک اسید: مریستیک اسید (14c) بودند. با توجه به تغییرات در افزایش غلظت اسیدهای چرب ۱۰ تا ۱۴ کربن که به سنتز پالمیتات منجر نمی‌شوند و از ACP آزاد می‌شوند می‌توان اذعان داشت سنتز زنجیره‌ی اسید چرب کوتاه‌تر توسط همان کمپلکس اسید چرب سنتازی صورت می‌پذیرد که مسئول سنتز پالمیتات است (۱۹). این اعتقاد وجود دارد که وجود تیواسترازهای محلولی سیتوزولی، سبب آزادسازی زنجیره‌های آسیل چرب با طول کوتاه‌تر از ACP می‌شوند.

در یک مطالعه توسط مارک گارفینکل و همکاران اثرات انواع مختلف اسید چرب زنجیره متوسط بر انتشار انسولین در خون بررسی شد. دوزهای مختلف اسیدهای چرب متوسط و اسید چرب ضروری اسید لینولئیک مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفتند. امکان اثر انسولینوتروپیک اسید چرب زنجیره متوسط و لینولئات زمانی که هر دو باهم استفاده می‌شوند نیز موردبررسی قرار گرفتند. مشخص شد که توانایی یک اسید چرب زنجیره متوسط اختصاصی برای تحریک ترشح انسولین به طول زنجیره آن بستگی دارد. کاپریک اسید و لوریک اسید (۱۰C) دارای اثرات بسیار قوی و به‌اندازه اثر لینولئات بر ترشح انسولین بودند این در حالی بود که اسیدهای چرب ۶ کربنه بی‌اثر بودند و اسید چرب ۸ کربنه کاپریلیک اسید اثر ناچیزی داشت که ازنظر آماری بی‌معنی بود (۲۰).

بنابراین با توجه به این موضوع می‌توان به تحلیل بهتر افزایش غلظت اسیدهای چرب ۱۰ کربنه در نتایج NMR پی برد (۲۰). اثرات انسولینوتروپیک این ترکیبات نشان از اثر مطلوب آن‌ها بر ترشح انسولین و بهبود نوسانات قند در بیماران دیابتیک را نشان می‌دهد که آنچه ما در علائم بیماران در حال دریافت انسولین و مصرف رزوراترول، از بیان خود شرکت‌کننده در حین مطالعه می‌شنیدیم بر این مستند صحه می‌گذارد. زمانی که سلول‌های کبدی با اسید Oleic و اسید Palmitic تحت درمان قرار گرفتند هم‌زمان با فعال شدن ژن‌های PPARγ و *SREBP-1*، میزان استئاتوز در استفاده از پالمیتیک اسید بزرگ‌تر بود. اسید چرب دوم یعنی پالمیتیک با افزایش بیان PPARα همراه بود. آپوپتوز سلول به‌طور معکوس متناسب با رسوب استاتوز است. علاوه بر این، اسید palmitic، اما نه oleic اسید، موجب کاهش سیگنالینگ انسولین می‌شود. علیرغم مقدار بالای چربی ناشی از انکوباسیون دو ترکیب اسیدهای چرب، میزان آپوپتوز و ضعف سیگنالینگ انسولین در سلول‌های درمان شده با اسید پالمتیک به‌تنهایی بود، کمتر بود که نشان‌دهنده اثر محافظتی اسید اولئیک است (۲۱). می‌توان استنتاج کرد زمانی که میزان اولیئک اسید در نتایج NMR با افزایش غلظت موردتوجه واقع شد درواقع نشان از اثر مثبت اولئیک اسید در آپوپتوز سلول‌های چربی و جلوگیری از تجمع آن‌ها و کمک به بهبود سیگنالینگ انسولین بوده که می‌توان گفت اثرات مثبت مکمل رزوراترول را در بهبود کاهش قند خون در افراد دیابتی تائید کرد. حال رزوراترول بیان ژن ATGL و بیان پروتئین آن را افزایش می‌دهد ولی اثر آن روی HSL مشاهده نشد. شواهد جدید رزوراترول مبنی بر تنظیم فعالیت لیپولیتیک در انسان، مورین آدیپوسیت‌ها و همچنین در بافت چربی سفید در موش، تأثیر اصلی آن روی ATGL در سطح ترنس کریپشن و پست ترنس کریپشن است. فعالیت آنزیمی

القاشده به نظر می‌رسد به‌واسطه‌ی القای آنزیم AMP فعال‌شده با پروتئین کیناز است (۲۲). الکل‌های آلیفاتیک مانند پروپانول و ایزوپروپانول باعث تجمع تری آسیل گلیسرول TAG در کبد می‌شوند. در یک مطالعه پس از تجویز ان- پروپانول یا ایزوپروپانول، جذب کبدی پالمیتات افزایش پیدا کرد، درحالی‌که اکسیداسیون پالمیتات کبدی کاهش یافت و استری شدن پالمیتات در TAG افزایش یافت. اتانول و N-پروپانول در دوز مشخصی، پیش سازهای TAG را در خون افزایش می‌دهد، ایزوپروپانول این پیش سازها را مهار می‌کند (۲۳). درواقع از این مطالعه می‌توان استنتاج کرد که در افزایش غلظت پروپانول در نتایج NMR که در اثر مصرف رزوراترول و در متابولیسم ناشی از تری گلیسیرید مشاهده می‌شود، احتمالاً پروپانول به‌صورت یک فیدبک مثبت برای تولید تری آسیل گلیسرول عمل می‌کند. ارتباط سطوح لیپوپلی ساکاریدها و توکسین‌های اورمیک در بیماری‌های مزمن کلیه در یک مطالعه روی موش‌ها می‌توانند منجر به اختلالاتی در فلور میکروبی روده شوند (۲۲). اختلال در انتقال‌دهنده‌های روده‌ای در بیماری‌های کلیوی مزمن منجر به کمبود لیپوپلی ساکاریدهای روده‌ای و متعاقباً کاهش حساسیت به انسولین می‌شود. درمان با بوتیرات منجر به بهبودی در عملکرد انتقال‌دهنده‌های روده‌ای با افزایش میوسین در کولون روده‌ای و نیز افزایش پروتئین‌های بااتصال محکم گردید. این مدل منجر به بهبود عملکرد متابولیک در حساسیت به انسولین و نیز بهبود اختلال کلیوی گردیده است (۲۴).

در مطالعه‌ای دیگر نقش اسید بوتیریک، اسید چرب با زنجیره کوتاه ایجادشده توسط تخمیر در روده بزرگ، در تنظیم حساسیت به انسولین در موش‌هایی که دارای رژیم غذایی با چربی بالابودند موردبررسی قرارگرفته است (۲۳). در رژیم غذایی با چربی زیاد مکمل بوتیرات مانع از مقاومت به انسولین و چاقی در موش‌های C57BL/6 گردید. افزایش عملکرد و فعالیت بیولوژیکی میتوکندری در عضلات اسکلتی و چربی قهوه‌ای مشاهده شد. در موش‌های چاق، مکمل butyrate منجر به افزایش حساسیت به انسولین و کاهش چربی می‌شود (۲۵). از نقاط قوت این مطالعه تأثیر رزوراترول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بر مسیرهای متابولیکی است که می‌تواند منجر به بهبود وضعیت افزایش قند خون و کاهش عوارض صدمات ناشی از بیماری دیابت نوع ۱ به لوزالمعده و دیگر اعضاء حساس باشد. همچنین، استفاده از روش متابولومیکس در افزایش آستانه تشخیص و پیش‌بینی زودهنگام و دقیق‌تر بیماری با توجه به شناسایی اختلالات در متابولیسم سه‌گانه در درون سلول در مقایسه با روش‌های سنتی مفید باشد.

از محدودیت‌های این طرح می‌توان از تعداد کم بیماران شرکت‌کننده در مطالعه نام برد، همچنین عدم پیگیری وضعیت بیماران پس از اتمام مطالعه است.

در پایان، به‌طورکلی شناسایی متابولیت‌های ناشناخته در درون سلول‌ها، چالش‌های عمده در علوم پزشکی بوده است. گرچه پیشرفت‌های زیادی در دهه‌ی اخیر انجام‌گرفته است (۲۶)، اما اطلاعات و داده‌های عمومی و تجاری متابولیت‌ها هنوز محدود و ناکافی مانده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف رزوراترول یکی از پلی فنل‌های مهم در انگور به مدت دو ماه در بیماران دیابتی نوع ۱ می‌تواند به مسیرهای متابولیسمی من‌جمله اسید چرب بیوسینتاز، گلیسرولیپیدها و بوتانوییک اسید، از طریق ایجاد تغییرات به ترتیب در متابولیت‌های اسیدهای چرب، تری گلیسیرید، ۱- پروپانول، بوتیرالدهید و ۱- بوتانول اثر بگذارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر و همچنین خانم رحیمه رحیمی که در اجرای این طرح همکاری لازم داشته‌اند کمال تشکر دارند.

پروتکل این مطالعه با کد اخلاق IRCT201710108129N11 در مرکز ثبت کار آزمایی بالینی ایران به ثبت رسیده است و کلیه مراحل این تحقیق با رعایت این کد اخلاق صورت پذیرفته است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان‌نشده است.

References

1. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. Nutrition research. 2012;32(7):537-41.
2. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics. 2010;39(3):625-40.
3. Group DPTTDS. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 2002;346(22):1685-91.
4. Kent D, Campochiaro P. Diabetic retinopathy ophthalmopathy. Sperling MA Type I diabetes; etiology and treatment 1st ed New Jersey: Humana press. 2003;1:393-404.
5. Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. PloS one. 2011;6(6):e19881.
6. Chan V, Fenning A, Iyer A, Hoey A, Brown L. Resveratrol improves cardiovascular function in DOCA-salt hypertensive rats. Current pharmaceutical biotechnology. 2011;12(3):429-36.
7. Bastin J, Lopes-Costa A, Djouadi F. Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. Human molecular genetics. 2011;20(10):2048-57.
8. Imaizumi A, Nishikata N, Yoshida H, Yoneda J, Takahena S, Takahashi M, et al. Clinical implementation of metabolomics. Metabolomics: InTech; 2012 ISBN 978-953-51-0046-1 Hard cover, 364 pages.
9. Daviss B. Growing pains for metabolomics: the newest'omic science is producing results-and more data than researchers know what to do with. The Scientist. 2005;19(8):25-9.
10. Detchokul S, Frauman AG. Recent developments in prostate cancer biomarker research: therapeutic implications. British journal of clinical pharmacology. 2011;71(2):157-74.
11. Balci M. Basic 1H-and 13C-NMR spectroscopy: Elsevier; 2005. ISBN:0-444-51811-8, 430 pages
12. DeFeo EM, Wu C-L, McDougal WS, Cheng LL. A decade in prostate cancer: from NMR to metabolomics. Nature Reviews Urology. 2011;8(6):301.
13. Macomber RS. A complete introduction to modern NMR spectroscopy: Wiley New York; 1998.
14. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and 14.metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nature protocols. 2007;2(11):2692.
15. Pallares-Mendez R, Aguilar-Salinas CA, Cruz-Bautista I ,del Bosque-Plata L. Metabolomics in diabetes, a review. Annals of medicine. 2016;48(1-2):89-102.
16. Mercier KA, Al-Jazrawe M, Poon R, Acuff Z, Alman B. A metabolomics pilot study on desmoid tumors and novel drug candidates. Scientific reports. 2018;8(1).1-12
17. Bhaskaran K, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Douglas IJ, Smeeth L. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3· 6 million adults in the UK. The Lancet Diabetes & Endocrinology. 2018;6(12):944-5.
18. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. The American journal of cardiology. 1998;82(12):67U-73U.
19. Devlin TM. Biochemistry: With Clinical Correlations: Wiley; 2010.
20. Garfinkel M, Lee S, Opara EC, Akwari OE. Insulinotropic potency of lauric acid :a metabolic rationale for medium chain fatty acids (MCF) in TPN formulation. Journal of Surgical Research. 1992;52(4):328-33.
21. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. Journal of gastroenterology and hepatology. 2009;24(5):830-40.
22. Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churruca I, Simón E, Zechner R, et al. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. The Journal of nutritional biochemistry. 2012;23(4):379-84.
23. Beauge F, Clement M, Nordmann J, Nordmann R. Comparative effects of ethanol, n-propanol and isopropanol on lipid disposal by rat liver. Chemico-biological interactions. 1979;26(2):155-166
24. Gonzalez A, Krieg R, Massey HD, Carl D, Ghosh S, Gehr TW, et al. Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression. Nephrology Dialysis Transplantation. 2018.

25. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases 25.energy expenditure in mice. Diabetes. 2009;58(7):1509-17.

26. Shao Y, Le W. Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. Molecular Neurodegeneration. 2019;14(1):3.

Original Article

Evaluation of Effects of Resveratrol Consumption on Serum Metabolic Profiles of Diabetes Type 1 Patients, by Using H Nuclear Magnetic Resonance Technique

Hodaei SH[1], Akbarzadeh S[2], Arjmand M[3], Akbari Z[3], Hajian N[1], Amini A[4], Movahed A[2*]

1. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
2. Department of Biochemistry, The Persian Gulf Infectious & Tropical Medicine Research CenterBushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
3. Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Received: 19 Sep 2020 Accepted: 26 Oct 2020

Abstract

Background & Objective: Diabetes mellitus type 1 is an autoimmune disease in which the B-cells of the pancreas are damaged, leading to insulin deficiency and finally hyperglycemia. The purpose of this study was to investigate the effect of resveratrol consumption on cellular metabolic pathways in type 1 diabetic patients using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Materials & Methods: Thirteen individuals with type 1 diabetes participated in this clinical trial designed as before and after exploratory investigation. All the participants received 500mg capsules of resveratrol twice daily for 60 days. Blood collection was done before resveratrol supplementation, after 30 days, and at the end of 60 days. The data were obtained at three different timings, compared with applying the HNMR spectroscopy. Spectra were processed, and PLS-DA analysis methods were applied to data. Outliers were taken, and the HMDB metabolites databank specified the metabolites and its pathways.

Results: The main variations identified in this investigation were as follows: short and long-chain fatty acid metabolism, the metabolic pathway of triacylglycerol, 1-propanol, and ethanoic acid, leading to an increase in butyraldehyde and 1-butanol metabolites.

Conclusion: The results of this research showed a reduction in palmitic acid biosynthesis. This finding suggests that resveratrol may cause significant changes in adipocyte metabolism by inducing adipogenesis and apoptosis in the adipocyte. It may also play a role in improving the production of insulin, leading to low blood glucose levels.

Keywords: Resveratrol, Type 1 diabetes, Metabolomics, 1H NMR, PLS-DA

***Corresponding Author: Movahed Ali,** Department of Biochemistry, Persian Gulf Infectious & Tropical Medicine Research CenterBushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
Email: amovahed58@gmail.com
https:///orcid.org/0000-0002-1988-4091

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2847-2857