

Утицај резвератрола на понашање пацова на тесту форсираног пливања

Јанко Самарџић¹, Драгана Јаџић¹, Милан Радовановић¹, Јасна Јанчић², Драган И. Обрадовић¹, Љиљана Гојковић-Букарица¹, Радисав Шћепановић³

¹Институт за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Клиника за неурологију и психијатрију за децу и омладину, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

³Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић“ – Дедиње, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Транс-изомер резвератрола је активна супстанца биљке *Polygonum cuspidatum* (јапански троскот), познате по лековитим својствима и традиционално коришћене у лечењу неуропсихијатријских поремећаја. Налази се у знатној количини у кори црног грожђа и у црном вину. Претходна истраживања су показала да транс-резвератрол има различита фармаколошка дејства, као што су антиоксидативни и антиинфламаторни ефекат, те неуропротективно и прокогнитивно дејство.

Циљ рада Циљ истраживања био је да се испитају утицај транс-резвератрола на понашање пацова и његова антидепресивна својства.

Методе рада Мужјаци пацова соја *Wistar* добијали су интраперитонеално (*i.p.*) растуће дозе транс-резвератрола (5, 10 и 20 *mg/kg*) или растварач (диметилсулфоксид – *DMSO*) 30 минута пре испитивања спонтане локомоторне активности и форсираног пливања. Током експеримената понашање пацова посматрано је дигиталном камером. За статистичку обраду података коришћени су једно-степенана анализа варијансе (*ANOVA*) и Тукијев (*Tukey*) *post-hoc* тест.

Резултати Испитивањем спонтане локомоторне активности животиња након примене растварача и растућих доза транс-резвератрола није уочена статистички значајна разлика између група ($p > 0,05$). У тесту форсираног пливања *ANOVA* је показала статистички значајне ефекте транс-резвератрола ($p < 0,001$). Тукијевом *post-hoc* анализом утврђено је значајно смањење времена имобилности пацова приликом примене доза од 10 и 20 *mg/kg*, које на тај начин показују акутне антидепресивне ефекте. Није утврђена статистички значајна разлика између дејства растварача и дозе од 5 *mg/kg* ($p > 0,05$).

Закључак Резултати нашег истраживања су показали да транс-резвератрол делује на централни нервни систем пацова. После једнократне примене он испољава акутно антидепресивно дејство, али не утиче на локомоторну активност животиња.

Кључне речи: транс-резвератрол; локомоторна активност; депресија

УВОД

Клиничка депресија је општи здравствени проблем с високом стопом морталитета. У сваком тренутку 2–3% људи пати од ове болести [1], а предвиђа се да ће депресија постати други водећи узрок инвалидитета до 2020. године [2]. Тренутне смернице у фармакотерапији депресије су углавном усмерене на модулацији моноаминских неуротрансмитерских система. Међутим, подаци из епидемиолошких студија о томе да 20–40% особа лечених класичним антидепресивима остаје резистентно на терапију [3], а да 50–80% болесника доживи релапс [4], указују на потребу за интензивним биолошким и бихејвиоралним испитивањима и евентуалним ревидирањем постојећих хипотеза.

Екстракти многих биљака се последњих година све више предлажу као саставни део клиничке терапије особа с неуропсихијатријским обољењима због бољег придржавања терапије и мањег броја нежељених дејстава код болесника [5]. Тако је *Polygonum cuspidatum* (јапански троскот), биљка

коришћена још у древној Азији, позната по лековитим својствима у лечењу неуропсихијатријских поремећаја, као што су депресија, Паркинсонова болест и др. [6, 7]. Утврђено је да је фармаколошки активни састојак ове биљке транс-изомер резвератрола, који је по хемијском саставу полифенол и који се у знатној количини налази у кори црног грожђа и у црном вину [8]. Изучавање резвератрола и других састојака вина посебно је занимљиво због постојања тзв. француског парадокса, где постоји корелација између умерене конзумације црног вина и смањене инциденције обољења срца [9, 10]. Истраживања су показала да резвератрол има снажна фармаколошка дејства, као што су антиоксидативни и антиинфламаторни ефекат, а уочено је и неуропротективно и прокогнитивно дејство [6, 7, 11, 12].

ЦИЉ РАДА

У литератури постоји много више података и студија о утицају резвератрола на кардио-

Correspondence to:

Radisav ŠĆEPANOVIĆ
KBC „Dr Dragiša Mišović“, Dedinje
Heroja Milana Tepića 1
11000 Beograd
Srbija
radisavscepanovic@gmail.com

васкуларни систем и периферна ткива, док су његова дејства на психичке функције и понашање ређе испитивани. Ипак, централни нервни систем (ЦНС) је изузетно значајно циљно место за дејство резвератрола, јер полифеноли лако пролазе крвно-моздану баријеру [13, 14, 15]. Зато је циљ овога рада био да се испитају бихејвиорални ефекти резвератрола: утицај на спонтану локомоторну активност пацова и на понашање пацова на тесту форсираног пливања [16].

МЕТОДЕ РАДА

У истраживању су коришћени мужјаци пацова соја *Wistar albino*, телесне масе 180–200 грама (Војна фарма, Београд, Србија). Животиње су чуване у провидним, пластичним кавезима (шест животиња по кавезу), а храна и вода били су им доступни *ad libitum*. Температура просторије била је $22 \pm 1^\circ\text{C}$, релативна влажност ваздуха 40–70% уз дванаесточасовни дневни циклус светло–тама, с почетком светлог периода у шест часова ујутро. При експерименталном раду поштован је кодекс Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду за рад с експерименталним животињама. Експерименти су вршени током тамног периода дневног циклуса.

Истраживање је обухватило укупно 48 животиња насумично сврстаних у две групе од по 24, а затим у оквиру сваке групе на још по четири подгрупе. Ефекти резвератрола праћени су помоћу активне супстанце транс-изомера резвератрола, који се, према подацима из литературе, најчешће користи у оваквим испитивањима [17]. Прва подгрупа сваке групе примала је растварач (диметилсулфоксид – *DMSO*), а остале три подгрупе раствор транс-резвератрола у дозама од по 5, 10 и 20 *mg/kg*. Супстанце су примењене интраперитонеално (*i.p.*) у доњи десни квадрант абдомена, 30 минута пре тестирања спонтане локомоторне активности и понашања на тесту форсираног пливања.

Мерење спонтане локомоторне активности

Спонтану локомоторну активност праћена је на тесту отвореног поља пречника од 70 *cm* под индиректним црвеним осветљењем од 20 *lx* [18]. Мерени су параметри локомоторне активности (број кретања с једног краја на други и пропињање) током пет минута, без претходне хабитуације.

Тест форсираног пливања

Тест форсираног пливања је стандардни тест за процену антидепресивних својстава супстанци. Тест ручне израде састоји се од стакленог цилиндра висине од 45 *cm* и пречника од 20 *cm*. Напуњен је водом до висине од 30 *cm*, температуре $21\text{--}23^\circ\text{C}$. Тестирање обухвата два блока пливања (тренинг и тест) са размаком од 24

часова. Први дан (тренинг) траје 15 минута и представља хабитуацију животиње у воденој средини. Наредно дана је тест током којег се пет минута мери време имобилности, односно време које пацов проводи беспомоћно плутајући по води, тако да му најмање три или четири шапице мирују. Овакво стање имобилности сматра се реакцијом очаја и депресивности. Супстанце са антидепресивним потенцијалом продужавају време које животиња проводи у борби за проналажење излаза из цилиндра, а смањују време имобилности у односу на контролну групу.

Статистичка обрада података

Резултати су приказани у виду просечних измерених вредности и стандардне девијације ($\bar{X} \pm SD$). Спонтану локомоторну активност и понашање пацова на тесту форсираног пливања посматрани су помоћу дигиталне камере. За статистичку обраду података коришћен је компјутерски програм *SPSS 15.0*, једностепена анализа варијансе (*ANOVA*) и Тукијев (*Tukey*) *post-hoc* тест.

РЕЗУЛТАТИ

Испитивањем спонтане локомоторне активности животиња након примене растварача *DMSO* и растућих доза резвератрола није уочена статистички значајна разлика између група у погледу кретања животиње с једног краја на други ($F_{(3,20)} = 1,685; p > 0,05$) и пропињања ($F_{(3,20)} = 0,699; p > 0,05$) (Табела 1).

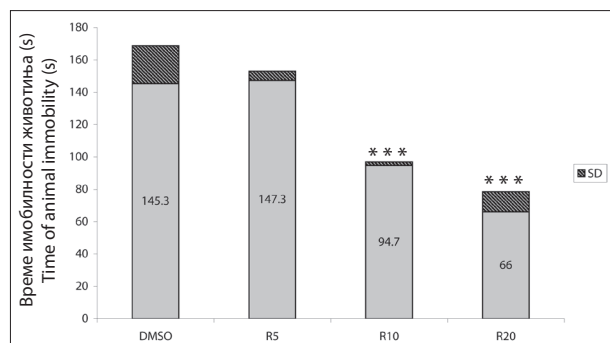
На тесту форсираног пливања, током другог дана, просечно време имобилности животиња којима су дати растварач и растуће дозе резвератрола (5, 10 и 20 *mg/kg*) било је: $145,3 \pm 23,5$ s, $147,3 \pm 5,75$ s, $94,7 \pm 2,25$ s и $66 \pm 12,5$ s. *ANOVA* је открила статистички значајне ефекте резвератрола ($F_{(3,20)} = 50,95; p < 0,001$). Тукијевом *post-hoc* анализом показано је значајно смањење времена имобилности пацова након примене резвератрола у дози од 10 и 20 *mg/kg*, које на тај начин показују акутне антидепресивне ефекте. Није утврђена статистички значајна разлика између дејства растварача и дозе резвератрола од 5 *mg/kg* ($p > 0,05$) (Графикон 1).

ДИСКУСИЈА

Бихејвиорална испитивања имају веома значајну улогу у процени антидепресивног дејства супстанци. У нашем раду антидепресивни ефекти транс-резвератрола посматрани су током теста форсираног пливања, који је вредан и поуздан модел за истраживање понашања пацова и важан тест за проучавање неуробиолошких механизма укључених у испољавање антидепресивних ефеката супстанци [19]. Ради диференцијације антидепресивних и локомоторних утицаја, посматрано је и деловање резвератрола на спонтану локомоторну активност животиња. Наши резултати показују да ова

Табела 1. Спонтана локомоторна активност на тесту отвореног поља**Table 1.** Spontaneous locomotor activity in the open field test

Третман Treatment	Број покушаја Number of attempts	
	Кретање Locomotion	Пропињање Rearing
DMSO	83±7	13±5
Resveratrol 5 mg/kg	84±14	14±5
Resveratrol 10 mg/kg	84±2	16±3
Resveratrol 20 mg/kg	92±8	14±3

**Графикон 1.** Време имобилности животиња на тесту форсираног пливања након примене растварача (DMSO) и резвератрола (R) у дози од 5 mg/kg (R5), 10 mg/kg (R10) и 20 mg/kg (R20)**Graph 1.** Time of animal immobility in the forced swim test, after the application of the vehicle (DMSO) and the resveratrol (R) in doses of 5 mg/kg (R5), 10 mg/kg (R10) and 20 mg/kg (R20)

*** $p < 0,001$ према DMSO

SD – стандардна девијација

*** $p < 0,001$ vs. DMSO

SD – standard deviation

супстанца у дозама од 10 и 20 mg/kg значајно смањује имобилност животиња на тесту форсираног пливања, али без ексцитаторних или инхибиторних утицаја на локомоторну активност. Ови налази говоре у прилог јасним антидепресивним својствима резвератрола, а да при томе нема помешаних локомоторних утицаја.

Међутим, када је реч о механизму дејства, и даље није познато да ли резвератрол остварује антидепресивни ефекат преко модулације неуротрансмисије и инхибиције моноаминоксидазе (MAO) или је у питању неки други механизам. Молекуларне студије су показале да резвератрол инхибира активност MAO у астроглијалним ћелијама [20], које врше значајну улогу

у заштити неурона од оксидативног стреса [21, 22]. Недавне студије су показале да слободни радикали могу бити укључени у развој поремећаја расположења, посебно депресије, због својих прооксидативних ефеката на релативно високо осетљиве ћелије ЦНС [23, 24]. Позитивна корелација између повећаних параметара оксидативног стреса и депресије указује на могућу примену супстанци са антиоксидативним потенцијалом у лечењу стабилизације расположења. На тај начин, резвератрол, као моћни антиоксиданс [6], представља атрактивни циљни молекул, који последњих година постаје значајан не само због својих заштитних дејстава на кардиоваскуларни систем, већ и због својих централних неуропротективних ефеката [25].

С друге стране, последњих година посебно су интензивирани претклиничке и клиничке студије на пољу неуроинфламације и утицаја проинфламаторних цитокина на развој депресије [26, 27]. Показано је да неуроинфламација утиче на развој депресије, а да потенцијална примена антиинфламаторних агенаса може повољно деловати на симптоме депресије [28]. С обзиром на то да је показано да резвератрол има и снажан антиинфламаторни потенцијал [14], ова својства би могла бити кључна у испољавању главних ефеката резвератрола.

ЗАКЉУЧАК

Резултати истраживања су показали да транс-резвератрол испољава значајно дејство на централни нервни систем пацова. Након једнократне примене показује акутне антидепресивне ефекте, али не утиче на локомоторну активност животиње. Утврђивање молекуларног и биохемијског супстрата ових ефеката предмет је наших наредних испитивања, која се врше ради бољег разумевања механизма дејства и могуће клиничке примене у неуропсихофармакологији.

НАПОМЕНА

Рад је настао у оквиру пројеката бр. ТР31020 и 175076, које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*. 2007; 370(9590):851-8.
- Bakish D. New standard of depression treatment: remission and full recovery. *J Clin Psychiatry*. 2001; 62(26):5-9.
- Souery D, Papakostas GI, Trivedi MH. Treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*. 2006; 67(6):16-22.
- Williams JM, Russell IT, Crane C, Russell D, Whitaker CJ, Duggan DS, et al. Staying well after depression: trial design and protocol. *BMC Psychiatry*. 2010; 10:23.
- Thachil AF, Mohan R, Bhugra D. The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. *J Affect Disord*. 2007; 97(1-3):23-35.
- Tredici G, Miloso M, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A. Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp Clin Res*. 1999; 25(2-3):99-103.
- Chen, LW, Wang YQ, Wei LC, Shi M, Chan YS. Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007; 6(4):273-81.
- Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, et al. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci*. 2010; 101(2):488-93.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339(8808):1523-6.

10. Dore S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals*. 2005; 14(1-2):61-70.
11. Gojković-Bukarica L, Novaković A, Kanjuh V, Bumbaširević M, Lešić A, Heinle H. A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol. *J Pharmacol Sci*. 2008; 108(1):124-30.
12. Ranney A, Petro MS. Resveratrol protects spatial learning in middle-aged C57BL/6 mice from effects of ethanol. *Behav Pharmacol*. 2009; 20(4):330-6.
13. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJL, Wilsher N, Ruparella KC, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3, 4, 5, 4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer*. 2004; 90(3):736-44.
14. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(6):493-506.
15. Xu Y, Wang Z, You W, Zhang X, Li S, Barish PA, et al. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenergic system. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010; 20(6):405-13.
16. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalffre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978; 47(4):379-91.
17. Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem*. 2006; 13(1):87-98.
18. Weijers HG, Weyers P. Locomotor activity and defecation of rats observed alone and in pairs in repeated open-field sessions. *Percept Mot Skills*. 1998; 86(3 Pt 2):1179-84.
19. Xing B, Zhao Y, Zhang H, Dang Y, Chen T, Huang J, Luo Q. Microinjection of valproic acid into the ventrolateral orbital cortex exerts an antidepressant-like effect in the rat forced swim test. *Brain Res Bull*. 2011; 85(3-4):153-7.
20. Mazzi EA, Harris N, Soliman KF. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta Med*. 1998; 64(7):603-6.
21. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 2000; 267(16):4904-11.
22. Salmina AB. Neuron-glia interactions as therapeutic targets in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2009; 16(3):485-502.
23. Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, et al. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res*. 2007; 38(2):247-52.
24. Eren I, Naziroglu M, Demirdas A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res*. 2007; 32(7):1188-95.
25. Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(17):7217-22.
26. Hestad KA, Tonseth S, Stoen CD, Ueland T, Aukrust P. Raised plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with depression: normalization during electroconvulsive therapy. *JECT*. 2003; 19(4):183-8.
27. Lindqvist D, Janelidze S, Hagell P, Erhardt S, Samuelsson M, Minthon L, et al. Interleukin-6 is elevated in the cerebrospinal fluid of suicide attempters and related to symptom severity. *Biol Psychiatry*. 2009; 66(3):287-92.
28. Bay-Richter C, Janelidze S, Hallberg L, Brundin L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. *Behav Brain Res*. 2011; 222(1):193-9.

The Effects of Resveratrol on Rat Behaviour in the Forced Swim Test

Janko Samardžić¹, Dragana Jadžić¹, Milan Radovanović¹, Jasna Jančić², Dragan I. Obradović¹, Ljiljana Gojković-Bukarica¹, Radisav Šćepanović³

¹Institute for Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Clinic for Neurology and Psychiatry for Children and Youth, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Clinical Hospital Center "Dr Dragiša Mišović" – Dedinje, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction The trans-isomer of resveratrol is the active ingredient of *Poligonum cuspidatum*, known for its medicinal properties and traditionally used in the treatment of neuropsychiatric disorders. It is also found abundantly in the skin of red grapes and red wine. Previous studies have suggested that trans-resveratrol demonstrates a variety of pharmacological activities including antioxidant, anti-inflammatory, as well as neuroprotective properties and procognitive effects.

Objective The goal of the present study was to examine the influence of trans-resveratrol on behavior in rats and its antidepressant properties.

Methods Male Wistar rats were treated intraperitoneally (i.p.) with the increasing doses of trans-resveratrol (5, 10 and 20 mg/kg) or vehicle (dimethyl sulfoxide – DMSO), 30 minutes before testing of the spontaneous locomotor activity or forced swimming. For the experiments, the behavior of the animals was recorded

by a digital camera, and the data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc test.

Results Testing of spontaneous locomotor activity, after the application of vehicle or increasing doses of trans-resveratrol, showed no statistically significant difference between groups ($p > 0.05$). In the forced swim test, one-way ANOVA indicated statistically significant effects of trans-resveratrol ($p < 0.001$). Tukey post-hoc test showed that resveratrol significantly decreased immobility time at the doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg, manifesting the acute antidepressant-like effects. There were no statistically significant differences between the resveratrol treatment of 5 mg/kg and vehicle ($p > 0.05$).

Conclusion The results from our study suggest that trans-resveratrol produces significant effects in the central nervous system. After single application, it has acute antidepressant effects, but without influence on locomotor activity.

Keywords: trans-resveratrol; locomotor activity; depression