

Thesis Title Effects of High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance on Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) Expression and Oxidative Stress in Hippocampus of Wistar Rats

Author Mr. Punnawitch Lertteerawat

Degree Master of Science (Physiology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn Advisor

Prof. Dr. Nipon Chattipakorn, M.D. Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Orawan Wongmekiat Co-advisor

ABSTRACT

Insulin and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) are major regulatory substances in the central nervous system. It has been shown that both insulin and nNOS can regulate multiple brain function such as neuronal development, neuronal survival, as well as learning and memory. The previous studies suggest that nNOS function in the brain can be regulated by insulin through PI3K/Akt signaling pathway. In contrast, the impairment of insulin signaling, insulin resistance, can diminish the activity and the function of nNOS in several organs and tissues. Several studies

have reported that high-fat diet consumption is the major cause of obesity, leading to the development of insulin resistance and oxidative stress. However, effects of insulin resistance following chronic high-fat diet consumption on nNOS expression and oxidative stress in the hippocampus have not yet been investigated. Therefore, the aims of the present study are to investigate the correlation among peripheral insulin resistance, nNOS expression in the hippocampus, and brain oxidative stress of high-fat diet-induced insulin-resistant rats.

The experiments were performed in male Wistar rats (n=20). The animals were randomly divided into two groups as the normal diet-fed groups (ND, n=10) and the high-fat diet (HFD, n=10) fed-groups. The animals in the ND group received a standard chow diet containing fat at 19.77% of the total energy (%E) while those in HFD group received a fat-enriched diet containing fat at 59.28 %E. After 12 weeks of the dietary period, blood and brain samples were collected for the analysis of the peripheral insulin resistance, nNOS expression in hippocampus, and oxidative stress in the brain.

We found that 12 weeks of high-fat diet feeding led to significantly elevated in body weight accompanied by an increased visceral fat. Compared with the 12 weeks of ND groups, fasting plasma insulin levels and HOMA index were significantly elevated in the 12 weeks of HFD groups. However, food intake, fasting plasma glucose levels, fasting plasma free fatty acid levels, fasting plasma triglyceride levels were not significantly different between both dietary groups. These results suggest that the rats fed with the high-fat diet for 12 weeks exhibited obesity and peripheral insulin resistance. In addition, the nNOS expression in hippocampal CA1 regions of 12-week HFD rats was significantly attenuated without any changes in the

structure and the number of hippocampal CA1 neurons, while oxidative stress in the brain was significantly elevated. Our results indicate that the elevation of brain oxidative stress was correlated with various parameters of peripheral insulin resistance. Furthermore, the reduction of nNOS expression in hippocampal CA1 regions was also correlated with brain oxidative stress. In conclusion, the abolished nNOS expression in the hippocampal CA1 regions may be caused by the elevation of brain oxidative stress and the impairment of neuronal insulin signaling following 12-weeks HFD consumption.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของสภาวะคืออินซูลินที่ถูกชักนำโดยอาหารไขมันสูงต่อการแสดงออกของนิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสและสภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูวิสตาร์

ผู้เขียน

นายปณณวิช เลิศธีรวัฒน์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.ทพญ. สิริพร ฉัตรทิพากร

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ.ดร.นพ. นิพนธ์ ฉัตรทิพากร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ.ดร. อรรวรรณ วงศ์มีเกียรติ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

อินซูลินและเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทส เป็นสารควบคุมที่มีความสำคัญในระบบประสาทส่วนกลาง สามารถควบคุมการทำงานของสมองในหลายๆ ด้านด้วยกัน เช่น ควบคุมพัฒนาการของเซลล์ประสาท ควบคุมความอยู่รอดของเซลล์ประสาท รวมถึง ควบคุมกระบวนการเรียนรู้และความจำของสมอง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การทำงานของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสในสมอง สามารถถูกควบคุมด้วยอินซูลินผ่านทางวิถีการส่งสัญญาณของ PI3K/Akt ในทางตรงกันข้าม การส่งสัญญาณที่ลดลงของอินซูลินหรือที่รู้จักกันดีในชื่อของ “สภาวะคืออินซูลิน” สามารถลดกิจกรรมและการทำงานของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ได้ หลายๆ การศึกษารายงานว่า การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดสภาวะอ้วน ซึ่งนำไปสู่พัฒนาการของสภาวะคืออินซูลิน

และสภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลของสภาวะคืออินซูลินหลังจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลายาวนาน ต่อการแสดงออกของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสและสภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ยังไม่เคยมีการตรวจสอบมาก่อน ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ จึงทำการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะคืออินซูลินของเนื้อเยื่อส่วนปลาย การแสดงออกของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และสภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองของหนู ที่ถูกชักนำให้เกิดสภาวะคืออินซูลินด้วยอาหารที่มีไขมันสูง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในหนูขาวเพศผู้พันธุ์วิสตาร์ (จำนวน 20 ตัว) โดยแบ่งสัตว์ทดลองแบบสุ่มออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ (จำนวน 10 ตัว) และกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารไขมันสูง (จำนวน 10 ตัว) โดยสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ จะได้รับอาหารที่มีพลังงานจากไขมันคิดเป็นร้อยละ 19.77 ของพลังงานทั้งหมด ในขณะที่สัตว์ทดลองในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารไขมันสูง จะได้รับอาหารที่มีพลังงานจากไขมันคิดเป็นร้อยละ 59.28 ของพลังงานทั้งหมด หลังจาก 12 สัปดาห์ของการให้อาหาร หนูทดลองจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดและสมอง เพื่อทำการวิเคราะห์การเกิดสภาวะคืออินซูลินของเนื้อเยื่อส่วนปลาย การแสดงออกของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทส และสภาวะเครียดออกซิเดชันภายในสมอง

ผลการศึกษา พบว่า การได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญ ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของไขมันในอวัยวะภายในบริเวณช่องท้อง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าระดับของอินซูลินในพลาสมาในช่วงอดอาหารและค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงภาวะคืออินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณอาหารที่รับประทาน ระดับของกลูโคส กรดไขมันอิสระ และไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาในช่วงอดอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มอาหาร จากการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีสภาวะอ้วนและสภาวะคืออินซูลินของเนื้อเยื่อส่วนปลายเกิดขึ้น การแสดงออกของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซิน

เทศในบริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยปราศจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างและจำนวนของเซลล์ประสาท ขณะที่ สภาวะเครียดออกซิเดชันภายในสมองของกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการเพิ่มขึ้นของสภาวะเครียดออกซิเดชันภายในสมองมีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ต่างๆ ของการเกิดสภาวะคืออินซูลินของเนื้อเยื่อส่วนปลาย นอกจากนี้ การแสดงออกที่ลดลงของเอนไซม์นิวโรโนลในตริกออกไซด์ซินเทศในบริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ยังมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสภาวะเครียดออกซิเดชันภายในสมองด้วยเช่นกัน โดยสรุป การแสดงออกที่ลดลงของเอนไซม์นิวโรโนลในตริกออกไซด์ซินเทศในบริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส อาจมีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของสภาวะเครียดออกซิเดชันภายในสมองและความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินภายในระบบประสาท หลังจากรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์