Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.1, Mar-Apr 2015
Pages: 1764-1775

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۴
صفحه: ۱۷۷۵-۱۷۶۴

تأثیر تزریق داخل بطنی متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوسین

لیلا قاسمی ابهری[۱]، محمدحسین اسماعیلی[*۲]، مریم بنانج[۳]

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر با علایمی همچون تجمع خارج سلولی آمیلوئید بتا و تجمع درون سلولی پروتئین تائوی فسفریله مشخص می‌شود. در حال حاضر کاملاً پذیرفته شده است که بیماری آلزایمر با اختلال سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز در مغز مرتبط است. بنابراین بررسی نقش عوامل دارویی که بتواند مقاومت به انسولین نورون‌ها را بهبود بخشند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات تزریق داخل بطنی متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۸ موش نر نژاد ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) به طور تصادفی به ۶ گروه (۸ موش در هر گروه) تقسیم شدند: کنترل، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین + سالین (۰/۲ میکرولیتر) و استرپتوزوتوسین + متفورمین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم، درون بطنی، به مدت ۱۰ روز). برای القای آلزایمر، استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۰ میکرولیتر در هر طرف) به صورت دو طرفه به درون بطن های جانبی تزریق شد. تمام موش‌ها به کمک ماز آبی تحت آزمون یادگیری و حافظه فضایی قرارگرفتند.

نتایج: تزریق داخل بطنی قبل از آموزش متفورمین برای مدت ۱۰ روز، یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتو سین را به صورت وابسته به دوز بهبود بخشید، به گونه‌ای که موش‌های گروه متفورمین در مقایسه با گروه سالین در زمان کمتر و با طی مسافت کمتر سکوی نجات را در ماز آبی پیدا کردند.

نتیجه‌گیری: متفورمین در درمان بیماری آلزایمر از طریق توانایی آن در افزایش حساسیت نورون‌های مقاوم به انسولین موثر می‌باشد و همچنین متفورمین برای درمان بیماری آلزایمر مفید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، متفورمین، یادگیری و حافظه فضایی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین، قزوین، ایران
۳- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۱۸۱۸۹۰۶، پست الکترونیکی : esmail66@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری زوال نورونی ویرانگر می‌باشد و افزایش سن، ژنتیک و عوامل زیست محیطی نیز به پیشرفت آن کمک می‌کنند. بیماری آلزایمر نه تنها توسط رسوب پاتولوژیک پپتیدهای بتا آمیلوئیدی و پروتئین‌های تائوی فسفریله مشخص می‌شود بلکه با التهاب و اختلال در تنظیم چربی‌ها و متابولیسم گلوکز همراه است. با مطالعات صورت گرفته، مشخص شده است که انسولین علاوه بر اینکه نقش مهمی در کنترل سوخت و ساز بدن در بافت‌های محیطی دارد، تأثیرات عمیقی بر سیستم عصبی مرکزی نیز دارد(۳-۱). مطالعات اخیر نشان داده است که انسولین مغز در شکل‌یابی سیناپسی (Synaptic Plasticity)، بقاء نورون‌ها، اعتیاد، تنظیم اعمال هیپوتالاموس، یادگیری و حافظه نقش مهمی دارد. جالب اینکه مسیر داخل سلولی استفاده شده توسط انسولین برای تحت تأثیر قرار دادن شکل‌یابی سیناپسی و بقاء نورونی از طریق مسیری مشترکی می‌باشد(۴). احتمالاً انسولین از طریق شکل‌یابی سیناپسی مانع از مرگ سلول‌های مغز می‌شود. در این شرایط هرگونه اختلال در متابولیسم انسولین در مغز ممکن است اثرات نامطلوبی را برجای بگذارد. بیماری آلزایمر یک فرم زوال عقلی با علت نامعلوم است. در ۹۵ درصد از موارد، عامل اصلی شروع‌کننده این بیماری تخریب آهسته سلول‌های مغز می‌باشد که منجر به اختلال در حافظه، تفکر، رفتار و نهایتاً مرگ می‌شود. در حال حاضر هیچ درمانی برای بیماری آلزایمر وجود ندارد. درمان‌های فارماکولوژیک موجود قادر به متوقف کردن روند این بیماری نیستند، اما می‌توانند روند پیشرفت علایم آن را برای مدتی کند کنند. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد انسولین و مکانیسم سیگنالینگ انسولین برای بقاء نورون‌ها مهم می‌باشند(۵،۶). مطالعات قبلی کاهش بیان گیرنده انسولین در مغز افرادی که از بیماری آلزایمر رنج می‌برند را نشان داده‌اند(۷). این دو موضوع باعث جلب توجه محققین بسیاری به سمت تعیین و توصیف نقشی شده است که اختلال عمل انسولین می‌تواند در بروز بیماری آلزایمر داشته باشد(۱۲-۸). این رشد سریع مقالات که به ارتباط بین آلزایمر و انسولین پرداخته‌اند، باعث توصیف بیماری آلزایمر به عنوان " دیابت مغز" و استفاده از واژه دیابت نوع ۳ برای بیماری آلزایمر شده است(۱۳). تحقیقات نشان داده‌اند که بیان پروتئین تائوی فسفریله و آمیلوئید بتا در مغز موش‌های دارای دیابت نوع ۱ و ۲ افزایش می‌یابد(۱۳). همچنین شواهد اپیدمیولوژیک و تجربی و کلنیکی نشان می‌دهد بین بیماری آلزایمر و دیابت نوع ۲ ارتباط نزدیکی وجود دارد. انسولین متابولیسم پروتئین پیش‌ساز آمیلوئیدبتا در نورون‌ها را تعدیل می‌کند و تجمع پپتیدهای بتاآمیلوئیدی داخل سلولی را که در بروز بیماری آلزایمر مهم می‌باشد، کاهش می‌دهد.

از این رو تحقیق در مورد نقش عوامل دارویی که ب‌تواند مقاومت به انسولین نورون‌ها را جهت درمان بیماری آلزایمر بهبود بخشد مورد توجه ویژه قرار گرفته است. متفورمین یکی از پرمصرف‌ترین حساس کننده (Insulin Sensitizer) بر ضدمقاومت انسولین محیطی در درمان دیابت نوع ۲ می‌باشد. محققین مشاهده کرده‌اند، چنانچه نورون‌ها را در محیط کشت به مدت طولانی در معرض انسولین قرار دهند علاوه بر اینکه نسبت به انسولین مقاوم می‌شود، نشانه‌های شبه بیماری آلزایمر نیز در آنها ظاهر می‌شود. در حالی که درمان با متفورمین علاوه بر اینکه حساسیت به انسولین را در این نورون‌های مقاوم به انسولین افزایش می‌دهد، از ظاهر شدن نشانه‌های شبه بیماری آلزایمر در آنها نیز جلوگیری می‌کند(۱۴). همچنین گزارش شده است که متفورمین می‌تواند به عنوان یک محافظت کننده نورونی (Neuroprotectant) نیز عمل کند(۱۵). با استفاده از محیط کشت‌های نورونی محققین نشان داده‌اند که متفورمین می‌تواند فسفریلاسیون پروتئین‌های تائوی مغز را کاهش دهد(۱۶). محققین نشان داده‌اند که مغز موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های طبیعی آمیلوئید بتای بیشتری دارند و همچنین هیپوکامپ موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله بیشتری دارد و تزریق درون صفاقی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین برای مدت ۱۸ هفته به موش‌های دیابتی افزایش

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله و تام را به حداقل می‌رساند. بنابراین برای درمان بیماری آلزایمر می‌تواند مؤثر باشد(۱۷،۱۸).

از آنجایی که آمیلوئیدبتا و پروتئین‌های تائوی فسفریله در مغز موش‌های دیابتی تجمع بیشتری دارند و تزریق درون صفاقی متفورمین به موش‌های دیابتی افزایش میزان پروتئین‌های تائو را به حداقل می‌رساند و در محیط کشت سلولی سرشار از انسولین که در نورون‌ها مقاومت به انسولین ایجاد کرده، اضافه کردن متفورمین ضمن افزایش حساسیت نورون‌ها به انسولین از ظاهر شدن علایم شبه بیماری آلزایمر در آنها جلوگیری می‌کند. بنابراین می‌توان انتظار داشت که متفورمین از طریق افزایش حساسیت نورون‌های مغز به انسولین در درمان بیماری آلزایمر مفید باشد و هدف مطالعه حاضر نیز بررسی اثرات تزریق درون بطنی متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. تعداد ۴۸ موش نر نژاد ویستار (تهیه شده از موسسه رازی) که وزن۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم داشتند به طور تصادفی در ۶ گروه (۸ موش درهرگروه) مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌ها در ۶ قفس جداگانه در شرایط استاندارد از نظر دما (۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد) و نور نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش موش‌ها آب و غذای طبیعی خود را آزادانه دریافت می‌کردند. این تحقیق در ۳ مرحله اجرا گردید: ۱) جراحی استرئوتاکسی و تزریق دو طرفه استرپتوزوتوسین (سیگما- آمریکا) به درون بطن‌های طرفی به منظور ایجاد مدل آلزایمر و همچنین کانول گزاری دو طرفه بطن‌ها بعد از تزریق استرپتوزوتوسین به منظور تزریق درون بطنی متفورمین بعد از طی دوره بهبودی ۲) تزریق درون بطنی متفورمین (سیگما- آمریکا) به موش‌های آلزایمری شده توسط استرپتوزوسین به مدت ۱۰ روز (از ۴روز قبل از آزمون تا آخر آزمون، هر روز صبح ۲۰ دقیقه قبل از آزمون) ۳) آزمون رفتاری ماز آبی به مدت ۶ روز و تست به خاطرآوری (آزمون probe) در روز هشتم آزمون به منظور تعیین اثر متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری.

برای القای آلزایمر ۱۰ میکرولیتر از محلول استرپتوزوتوسین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به وسیله جراحی استرئوتاکسیک به درون هر کدام از بطن‌های جانبی مغز با مختصات بر حسب برگما: ۰/۵- میلی‌متر خلفی نسبت به برگما، ۱/۲ ± میلی‌متر جانبی و ۳/۲- میلی‌متر عمقی، تزریق شد. در این جراحی ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین (۶۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) و زایلازین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سپس در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting- آمریکا) قرار داده شدند و پس از فیکس کردن حیوان در این دستگاه، در پشت سر حیوان در خط وسط یک برش ایجاد شد. بعد از تمیز کردن سطح جمجمه و یافتن نقطه برگما به عنوان مرجع، با استفاده از اطلس پاکسینوز به روش استرئوتاکسیک محل مورد نظر تزریق در دو طرف سر نشانه‌گذاری گردید. بعد از علامت‌گذاری نقاط هدف بر روی سطح جمجمه، دو سوراخ به کمک دریل دندان پزشکی ایجاد شد و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۰ میکرولیتر در هر طرف) به صورت دو طرفه به درون بطن‌های جانبی به آرامی تزریق شد. بعد از تزریق استرپتوزوتوسین کانول گزاری (سر سوزن شماره ۲۳) دو طرفه بطن‌ها به منظور تزریق درون بطنی متفورمین بعد از طی دوره بهبودی انجام شد(۱۹). گروه‌های مورد آزمایش به شرح زیر بودند: ۱)گروه شاهد ۲)گروه آلزایمری شده با STZ که خود به ۵ زیر گروه به شرح زیر تقسیم شدند. الف) گروه STZ ب)گروه سالین + STZ که به مدت ۱۰ روز و روزی یک مرتبه نرمال سالین (۵ میکرولیتر) به صورت درون بطنی از ۴ روز قبل از شروع آزمون یادگیری و در طول آزمون یادگیری فضایی (۲۰ دقیقه قبل از آزمون) دریافت می‌کردند. ج، د، هـ) گروه‌های متفورمین+ STZ که به مدت ۱۰ روز و روزی یک مرتبه متفورمین (۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰میکروگرم بر کیلوگرم) به صورت درون بطنی مشابه گروه سالین دریافت می‌کردند. برای تزریق سالین و متفورمین در روزهای آزمایش از سرنگ هامیلتون و لوله پلی اتیلن شماره ۲۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

که به کانول تزریق (سر سوزن شماره ۳۰) وصل بود، استفاده شد. تزریقات با پایین بردن کانول تزریق که طولی ۱ میلی‌متر بیشتر از طول کانول راهنما داشت، انجام شد. به منظور تزریق متفورمین به درون بطن، ابتدا حیوانات به آرامی با دست مهار می‌شدند، سپس درپوش‌ها برداشته شده و کانول تزریق به جای آنها در کانول راهنما قرار می گرفت و ۵ میکرولیتر نرمال سالین یا متفورمین با سه دوز به آرامی در مدت ۶ دقیقه به داخل بطن‌ها تزریق می‌شد. برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی حیوان از ماز آبی موریس(تکنیک آزما- ایران) استفاده شد که یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۶۰ سانتی‌متر است و تا نیمه از آب پر می‌شود و یک سکوی نجات با قطر ۱۰ سانتی‌متر در یکی از چهار ربع آن ۱ سانتی‌متر زیر سطح آب قرار گرفته است. این مجموعه از طریق دوربین ردیابی و اطلاعات مربوط به آزمایش در کامپیوتر ذخیره و تجزیه و تحلیل گردید. حداکثر زمانی که حیوان جهت پیدا کردن سکو در اختیار دارد ۶۰ ثانیه بود. در صورتی که حیوان در طول این مدت سکو را پیدا نکرد با دست به سمت سکو هدایت می‌شد و به مدت ۱۰ ثانیه روی آن قرار می‌گرفت، تا موقعیت سکو نسبت به علایم نصب شده در آزمایشگاه را به خاطر بسپارد. در صورتی که حیوان سکو را پیدا کند همزمان با قرارگیری حیوان روی سکو عمل ضبط دوربین متوقف می‌شد. این آزمایش به مدت ۶ روز و هر روز ۴ بار با فاصله ۱۰ دقیقه تکرار می‌شد. در این مراحل روند یادگیری حیوان بر اساس مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده و سرعت حرکت حیوان جهت یافتن سکو سنجیده شد. در روز هشتم پس از اتمام آزمایشات یک مرحله پروب انجام شد، بدین صورت که پس از برداشتن سکو (Probe) حیوان از یکی از جهات درون ماز رها شد. این آزمایش بر این اساس بود که با فرض اینکه حیوان محل سکو را به خاطر سپرده باید بیشترین زمان و مسافت را در ربع محل قرارگیری سکو بماند. این مرحله برای هر حیوان یک بار تکرار شد که مدت آن ۶۰ ثانیه بود. مدت زمان و مسافت طی شده در ربع محل قرارگیری سکو معیار و میزان سنجش حافظه است. برای بررسی یادگیری مدت زمان رسیدن به سکو و مسافت طی شده و سرعت حرکت حیوان جهت یافتن سکو در مدت ۶ روز یادگیری در بین گروه‌ها با هم مقایسه شد. برای بررسی حافظه مدت زمان حضور در ربع سکوی هدف و مسافت طی شده در ربع سکوی هدف در روز هشتم در بین گروه‌ها با هم مقایسه گردید. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج

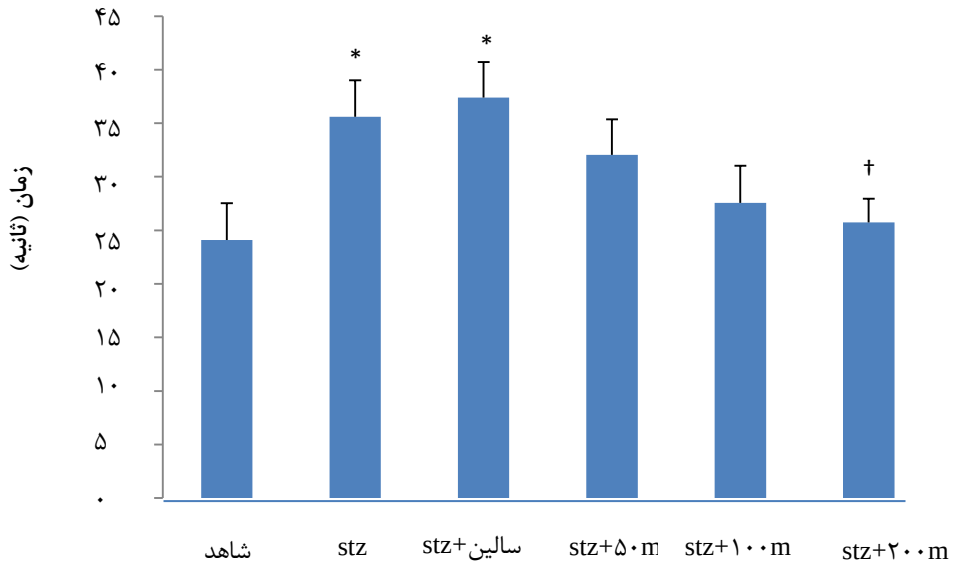
بین گروه STZ و گروه سالین + STZ از نظر اثر متفورمین بر یادگیری فضایی موش‌های آلزایمری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تمام روزهای آموزش موش‌های گروه STZ و گروه سالین + STZ دیرتر و با طی مسافت بیشتر از موش‌های گروه شاهد و موش‌های گروه‌های متفورمین+ STZ سکوی نجات را پیدا کردند. استرپتوزوتوسین تزریقی به داخل بطن‌ها باعث کاهش میزان یادگیری فضایی شد به گونه‌ای که در پارامتر زمان رسیدن به سکو اختلاف بین گروه سالین + STZ و گروه کنترل در روزهای ۱ و ۲ و ۵ و ۶ معنی‌دار شد. در پارامتر مسافت طی شده جهت یافتن سکو نیز به جز روز سوم در بقیه روزها اختلاف بین گروه سالین + STZ و گروه کنترل معنی‌دار بود. تزریق داخل بطنی متفورمین به موش‌های آلزایمری مدل STZ باعث افزایش وابسته به دوز یادگیری فضایی شد به گونه‌ای که در پارامتر زمان رسیدن به سکو اختلاف بین گروه STZ + سالین و گروه STZ + متفورمین ۲۰۰ میکروگرم در روزهای ۱ و ۴ و ۵ و ۶ و در پارامتر مسافت طی شده جهت یافتن سکو در روزهای ۳، ۴، ۵ و ۶ معنی‌دار شد. این بدان معنی است که داروی متفورمین با دوز ۲۰۰ میکروگرم برکیلوگرم تزریقی به داخل بطن‌های حیوان توانسته تا حدود زیادی علایم آلزایمر در حیوانات آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین را کاهش دهد (جداول و نمودارهای ۲ و ۱). در پارامتر سرعت حرکت حیوان نتایج نشان داد که حیوانات به تدریج که از روز اول به روز ششم نزدیک می‌شوند، سرعت افزایش می‌یابد ولی بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. به عبارت دیگر تزریق استرپتوزوسین و سالین و دوزهای مختلف متفورمین تأثیری بر فعالیت حرکتی حیوانات نداشته است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱: مقایسه تاخیر زمانی(ثانیه) رسیدن به سکو بین گروه‌های مورد مطالعه

گروه	روز اول (میانگین± انحراف معیار)	روز دوم (میانگین± انحراف معیار)	روز سوم (میانگین± انحراف معیار)	روز چهارم (میانگین± انحراف معیار)	روز پنجم (میانگین± انحراف معیار)	روز ششم (میانگین± انحراف معیار)
شاهد	۳۹/۵± ۳/۹	۲۸/۸±۴	۲۶/۶±۴/۱	۲۲/۲±۴	۱۶/۷±۲/۸	۱۰/۸±۱/۷
stz	۵۳/۵±۳/۲**	۳۸/۷±۳/۸*	۳۴/۹±۴	۳۱/۷±۳/۲	۲۸/۴±۳/۵*	۲۶/۳±۲/۸**
سالین+stz	۵۲±۲/۸**	۳۷/۱±۳/۷*	۳۶/۷±۴/۴	۳۶/۳±۳/۷	۳۲/۵±۳/۱*	۲۹/۷±۲/۵**
stz+۵۰m	۴۸/۳±۳/۳	۳۸/۳±۳/۵	۳۰/۳±۳/۶	۲۷/۲۷±۴/۱	۲۳/۶±۳	۲۴/۱±۲/۳
stz+۱۰۰m	۴۷/۴±۳/۷	۳۲/۸±۳/۸	۲۷/۲±۳/۶	۲۳/۵±۳/۵	۲۰/۶±۳/۴	۱۳/۷±۲/۸
stz+۲۰۰m	۴۴/۴۷±۲/۴††	۳۱/۶±۳/۲	۲۸/۶±۳/۳	۲۱/۹±۲/۴††	۱۷/۳±۱††	۱۰/۴±۰/۸۴††

**p<۰/۰۱ و * p<۰/۰۵ ؛ * اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه شاهد؛ †† p<۰/۰۱ و †p<۰/۰۵؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه STZ یا گروه سالین + STZ



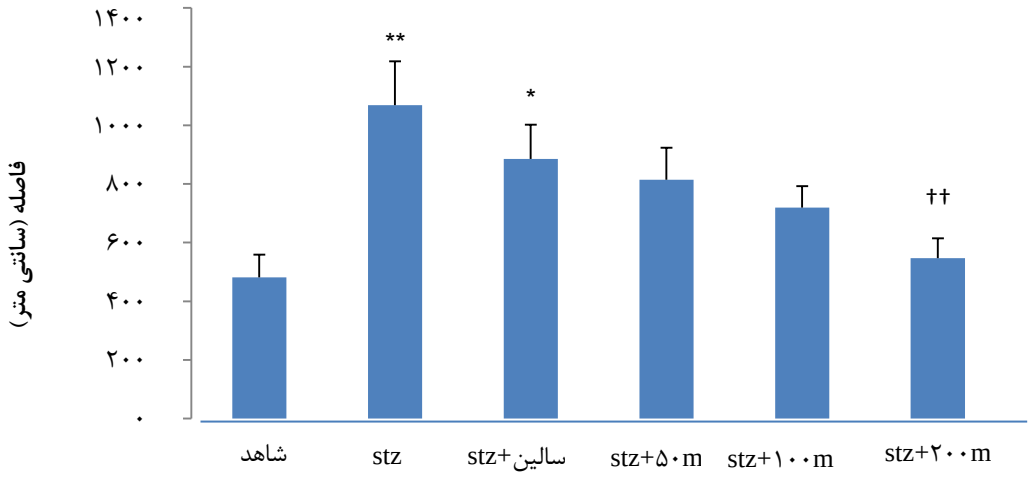
نمودار ۱: مقایسه میانگین کل تأخیر زمانی(ثانیه) رسیدن به سکو بین گروه‌های مورد مطالعه در مدت ۶ روز آموزش
* اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه شاهد. (p<۰/۰۵) † اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه STZ یا گروه سالین + STZ (p<۰/۰۵†)

جدول ۲: مقایسه مسافت طی شده(سانتی متر) جهت یافتن سکو بین گروه‌های مورد مطالعه. * اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه شاهد.

گروه	روز ششم (میانگین± انحراف معیار)	روز پنجم (میانگین± انحراف معیار)	روز چهارم (میانگین± انحراف معیار)	روز سوم (میانگین± انحراف معیار)	روز دوم (میانگین± انحراف معیار)	روز اول (میانگین± انحراف معیار)
شاهد	۸۷۰±۱۰۲	۴۷۸±۷۷/۵	۶۰۹±۱۰۵	۳۰۳±۶۲	۴۳۸±۸۵/۶	۱۹۰±۸/۳۳
stz	۱۵۹۵±۲۲۱*	۱۰۲۲±۱۰۹**	۱۰۶۳±۱۲۶	۱۰۵۲±۱۱۷**	۹۷۴±۱۳۴**	۷۰۳±۱۹۳*
سالین+stz	۱۲۷۸±۹۰/۳	۱۲۱۸±۱۱۵**	۱۰۷۲±۱۳۳	۶۱۶±۱۰۹	۷۰۵±۱۸۳	۴۲۱±۷۲
stz+۵۰m	۱۲۹۳±۱۰۴	۱۰۱۲±۱۱۳	۸۰۹±۱۰۸	۶۴۴±۱۰۸††	۶۰۱±۹۷	۵۲۹±۱۲۴
stz+۱۰۰m	۱۱۵۴±۱۰۳	۸۵۸±۹۸/۵	۹۲۵±۸۵	۵۲۲±۷۵††	۵۵۴±۴۴††	۳۰۳±۳۲/۹
stz+۲۰۰m	۹۸۴±۶۸/۷	۶۱۶±۹۶	۵۱۵±۸۶††	۴۴۹±۶۴††	۴۵۱±۲۹/۲††	۲۶۶±۶۶††

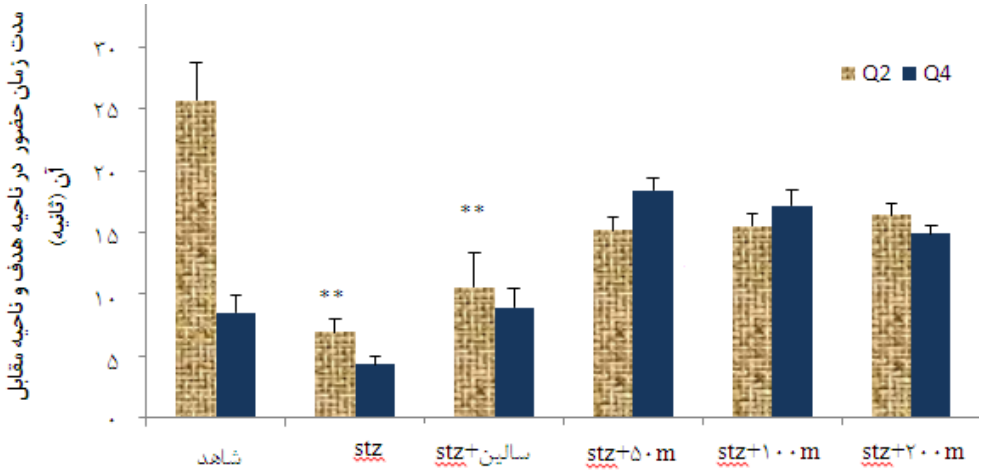
**p<۰/۰۰۱ و * p<۰/۰۵ . † اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه STZ . †† p<۰/۰۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



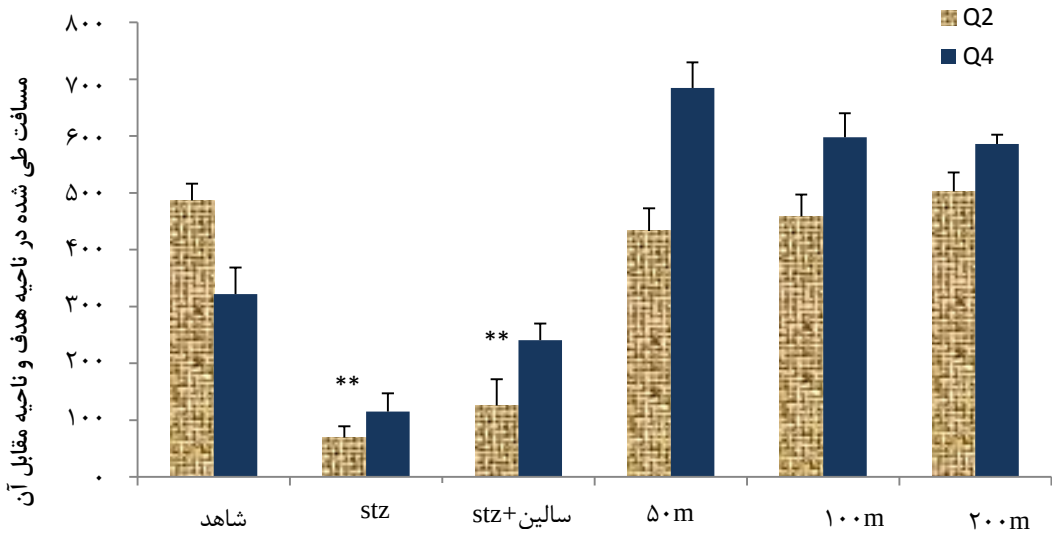
نمودار ۲: مقایسه میانگین کل مسافت طی شده جهت یافتن سکو بین گروه‌های مورد مطالعه در مدت ۶ روز آموزش.
* اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه شاهد. **p<۰/۰۱ و* p<۰/۰۵ . † اختلاف معنی دار بین گروه ها با گروه STZ . †† p<۰/۰۱ و †p<۰/۰۵ .

مقایسه مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود به ناحیه هدف در بین گروه های آزمون نشان داد که فقط اختلاف گروه کنترل با گروه استرپتوزوسین و گروه استرپتوزوسین+سالین معنی‌دار است(p<۰/۰۱). از طرف دیگر بین گروه کنترل و گروه‌های استرپتوزوسین+۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود به ناحیه هدف در گروه استرپتوزوسین+۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین بیش از گروه‌های استرپتوزوسین + ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین بود و برعکس مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده در ناحیه مقابل ناحیه هدف و تعداد دفعات ورود به ناحیه مقابل ناحیه هدف در گروه استرپتوزوسین+۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین کمتر از گروه‌های استرپتوزوسین + ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین بود (نمودارهای ۴ و ۳). مقایسه سرعت طی شده در ناحیه هدف و ناحیه مقابل آن در بین گروه ها نشان داد که بین گروه ها هیچ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ت حیوانات در ناحیه هدف کمتر از ناحیه مقابل آن بوده است.



نمودار ۳: مقایسه زمان طی شده در ناحیه هدف (Q2) و ناحیه مقابل آن(Q4)، بین گروه های مورد مطالعه.
** اختلاف معنی دار بین گروه ها با گروه شاهد. **p<0.01

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



نمودار ۴: مقایسه مسافت طی شده در ناحیه هدف (Q2) و ناحیه مقابل آن(Q4) آن بین گروه های مورد مطالعه.
** اختلاف معنی‌دار بین گروه ها با گروه شاهد. **$p<0.01$.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که استرپتوزوسین توانسته است در موش‌ها آلزایمر ایجاد کند، موش‌های این گروه در تمام روزها با طی مسافت بیشتر و صرف زمان بیشتر نسبت به گروه کنترل توانستند سکوی نجات را پیدا کنند و این بدان معنی است که یادگیری و حافظه این موش‌ها دچار اختلال شده و کاهش یافته است. تزریق ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین به داخل بطن‌ها تقریباً به صورت وابسته به دوز توانست تا حدود زیادی کاهش میزان یادگیری و حافظه در موش‌های آلزایمری شده با استرپتوزوسین را جبران کند و میزان یادگیری و حافظه آنها را افزایش دهد. بنابراین در بهبود علایم آلزایمر مفید می‌باشد. هر دو فرم دیابت نوع I و II با اختلال عملکرد شناختی همراه می‌باشد(۲۰،۲۱). بیماری آلزایمر یک فرم از زوال عقلی است که در آن سلول‌های مغز به آرامی از بین رفته و منجر به اختلال حافظه فرد می‌شود. این بیماری شایع‌ترین اختلال عصبی در سراسر جهان است. بیماری الزایمر با تجمع خارج سلولی آمیلوئیدبتا و تجمع درون سلولی پروتئین تائو هیپرفسفریله مشخص می‌شود. نشان داده شده است که انسولین هر دو سطح آمیلوئید بتا و فسفوریلاسیون تائو، را از طریق مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول تری‌کیناز و آنزیم تخریب‌کننده انسولین (Insulin-degrading enzyme) تحت تأثیر قرار می‌دهد. آمیلوئید بتا و انسولین هر دو سوبسترای آنزیم تخریب‌کننده انسولین می‌باشند و به وسیله این آنزیم تخریب می‌شوند(۲۲،۲۳). در واقع، اضافه کردن مقدار بیشتری از انسولین، به عنوان یکی از سوبسترای آنزیم تخریب‌کننده انسولین (مانند آنچه که در دیابت نوع II اتفاق می‌افتد) به محیط مغز مانع از فعالیت این آنزیم برای تخریب آمیلوئید بتا می‌شود(۲۲). اخیرا نشان داده شده است که انسولین به طور قابل توجهی میزان حذف آمیلوئید بتا را کاهش می‌دهد و باعث افزایش سطح آمیلوئید بتا دست نخورده در مغز موش‌ها می‌شود(۲۴). بنابراین، اگر سطح انسولین در مغز افزایش یابد تخریب آمیلوئید بتا به وسیله آنزیم تخریب‌کننده انسولین کاهش خواهد یافت و فعالیت این آنزیم از تخریب آمیلوئید بتا به تخریب انسولین تغییر پیدا خواهد کرد و همین امر به طور مؤثری باعث تجمع آمیلوئید بتا در مغز خواهد شد. به همین خاطر می‌توان انتظار داشت در بیماران دیابتی نوع ۲ که در آنها انسولین بدن از حد طبیعی بیشتر است به علت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

تجمع بیشتر آمیلوئید بتا در مغز، بیش از سایر افراد بیماری آلزایمر را نشان دهند و یافته‌های کلنیکی نیز این امر را تأیید می‌کنند. در مطالعه حاضر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متفورمین که در کلنیک به عنوان یک حساس کننده انسولین در برابر مقاومت به انسولین محیطی استفاده می‌شود، می‌تواند به صورت وابسته به دوز تا حدود زیادی یادگیری و حافظه در موش‌های آلزایمری شده توسط تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین را بهبود بخشد. از این نظر نتایج مطالعه حاضر با نتایج محققینی که نشان داده‌اند، متفورمین می‌تواند مقاومت به انسولین نورون‌های محیط کشت سلولی که به صورت طولانی مدت در معرض سطح بالای انسولین قرار گرفته بودند را کاهش دهد و علایم شبه بیماری الزایمر ظاهر شده در این نورون‌ها را کاهش دهد، همخوانی دارد(۱۴). از طریق مطالعات مختلف مشخص شده است که چنانچه بافت‌های بدن به مدت طولانی در معرض سطح بالای انسولین قرار گیرند، سیگنالینگ انسولین در آنها تضعیف می‌شود و نسبت به انسولین مقاوم می‌شوند(۲۵). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که بالا بودن انسولین خون یکی از عوامل خطر ابتلا به آلزایمر می‌باشد(۲۰،۲۱). به علاوه مشخص شده است که تزریق محیطی انسولین در انسان موجب افزایش سطح آمیلوئید بتا در مایع مغزی نخاعی می‌شود و تزریق داخل مغزی انسولین ضمن افزایش میزان آمیلوئیدهای بتای مغز کلیرنس آمیلوئیدهای بتای مغز را کاهش می‌دهد(۲۴،۲۶). این مطالعات به طور غیرمستقیم نقش مهم هیپرانسولینمی را در پاتوژنز بیماری آلزایمر پشتیبانی می‌کنند(۲۰،۲۱). De lamonte و همکاران نشان دادند که القاء مقاومت به انسولین در مغز به وسیله تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین کافی است تا تعدادی از جنبه‌های مهم بیماری آلزایمر را در حیوانات ایجاد کند و پیشنهاد کردند که این روش یکی از بهترین روش‌های ایجاد بیماری آلزایمر تجربی می‌باشد(۸). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که استرپتوزوسین از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز و ایجاد دیابت نوع ۳ می‌تواند جنبه‌های از بیماری آلزایمر که کاهش یادگیری و حافظه می‌باشد را القاء کند. یافته‌های محققین نشان داده‌اند که الیگومرهای بتا آمیلوئید، خود می‌توانند حذف گیرنده‌های انسولین از غشاء نورون‌ها را تحریک کنند که این امر منجر به ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌ها می‌شود(۲۷). با توجه به این واقعیت که اختلال در عملکرد سیگنالینگ انسولین و اختلال در متابولیسم گلوکز در مغز می‌تواند منجر به عوارض مختلفی از جمله بیماری آلزایمر شود، یافتن یک استراتژی خوب برای برطرف کردن مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز از اهمیت خاصی برخوردار است. با این حال درمان مقاومت به انسولین نورون‌ها در مغز برعکس درمان مقاومت به انسولین در بافت‌های محیطی در مراحل ابتدایی است. در این مورد محققین نشان داده‌اند که داروی Peroxisome proliferator-activated receptor gamma که عمدتاً برای درمان دیابت نوع ۲ تجویز می‌شود، می‌تواند مقاومت به انسولین نورون‌ها را نیز که توسط آمیلوئیدهای بتا ایجاد می‌شود را کاهش دهد(۲۸). در مطالعه حاضر نشان داده شد که متفورمین، احتمالاً می‌تواند مقاومت نورون‌های مغز به انسولین را نیز کاهش دهد و اختلال یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری شده توسط استرپتوزوسین را تا حدود زیادی بهبود بخشد.

تحقیقات نشان داده است که درمان با متفورمین از اختلال سیگنالینگ پروتئین کیناز (PKC) جلوگیری می‌کند و از فعال شدن واسطه‌های استرس اکسیداتیو و التهاب سلولی که منجر به آپوپتوزمی‌شود، جلوگیری می‌کند(۲۹). گزارش شده است که استفاده از انسولین در محیط کشت باعث کاهش سطح بتاآمیلوئید تولیدی در نورون‌ها می‌شود در حالی که متفورمین برعکس باعث افزایش سطح بتا آمیلوئید تولیدی می‌شود(۳۰). اگر چه انسولین و متفورمین اثرات متضادی بر روی تولید بتاآمیلوئید از خود نشان می‌دهند ولی وقتی این دو با هم استفاده می‌شود متفورمین اثرات انسولین در کاهش سطح بتاآمیلوئیدهای نورون‌ها را تشدید می‌کند. این موضوع نشان می‌دهد که متفورمین می‌تواند حساسیت نورون‌ها به انسولین را افزایش دهد(۳۰). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد چرا که در حیواناتی که در این مطالعه استفاده شده‌اند، اگر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

چه استرپتوزوسین از طریق کاهش حساسیت نورون‌ها به انسولین باعث ایجاد دیابت مغزی و آلزایمر در آنها شد ولی انسولین بدن آنها در حد طبیعی بود و احتمالاً متفورمین تزریقی اثرات انسولین طبیعی بدن حیوان در کاهش سطح بتاآمیلوئید های مغز را تشدید کرده و در نتیجه علایم آلزایمر آنها بهبود نسبی یافته به همین دلیل یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری در گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین به صورت وابسته به دوز بهتر از موش‌های دریافت‌کننده استرپتوزوسین به تنهایی بود. در تحقیقات محققین مشخص شده است که متفورمین تکامل نورون‌ها از سلول‌های بنیادی مغز را نیز افزایش می‌دهد. نورون‌های تکامل یافته جدید نقش مهمی در ترمیم آسیب‌های مغز ناشی از زوال نورونی در مغز حیوانات آلزایمری دارد(۳۱).

نتیجه‌گیری

متفورمین به صورت وابسته به دوز می‌تواند اختلال یادگیری و حافظه فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوسین را احتمالاً از طریق کاهش مقاومت نورون‌ها به انسولین و یا کاهش سطح بتا آمیلوئیدهای مغز و یا افزایش سرعت تکامل نورون‌ها از سلول‌های بنیادی مغز بهبود بخشد. بنابراین متفورمین برای درمان افراد مبتلا به آسیب مغزی یا بیماری‌های ناشی از زوال نورون‌های مغز مثل بیماری آلزایمر مفید می‌باشد.

References:

1- Toth C. ***Diabetes and neurodegeneration in the brain***. Handb Clin Neurol 2014; 126: 489-511.

2- Barbagallo M, Dominguez LJ. ***Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease.*** World J Diabetes 2014; 5(6): 889-93.

3- van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. ***Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive.*** Prog Neurobiol 2006; 79(4): 205-21.

4- Niswender KD, Schwartz MW. ***Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities.*** Front Euroendocrinol 2003; 24(1): 1-10.

5- Ryu BR, Ko HW, Jou I, Noh JS, Gwag BJ. ***Phosphatidylinositol 3-kinasemediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I***. J Neurobiol 1999; 39(4): 536-46.

6- de la Monte SM, Wands JR. ***Chronic gestational exposure to ethanol impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons***. Cell Mol Life Sci 2002; 59(5): 882-93.

7- Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Enqelsberger S, Humrich J, Laufer S, et al. ***Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease.*** J Neural Transm 1998; 105(4-5): 423-38.

8- de la Monte SM, Wands JR. ***Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease***. J Alzheimers Dis 2005; 7(1): 45-61.

9- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. ***Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease.*** J Alzheimers Dis 2006; 9(1): 13-33.

10- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. ***Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

acetylcholine. J Alzheimers Dis 2005; 8(3): 247-68.

11- Hoyer S. ***Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications.*** Adv Exp Med Biol 2004; 541: 135-52.

12- Hoyer S, Lannert H. ***Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein.*** J Neural Transm Suppl 2007; (72): 195-202.

13- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. ***Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease's this type 3 diabetes?.*** J Alzheimers Dis 2005; 7(1): 63-80.

14- Gupta A, Bisht B, Dey CS. ***Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes***. Neuropharmacol 2011; 60(6): 910-20.

15- El-Mir MY, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, et al. ***Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons.*** J Mol Neurosci 2008; 34(1): 77-87.

16- Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, et al. ***Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling.*** Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(50): 21830-5.

17- Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z***. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice.*** Pharmacol Biochem Behav 2012; 101(4): 564-74.

18- DiTacchio KA, Heinemann SF, Dziewczapolski G. ***Metformin treatment alters memory function in a mouse model of alzheimer's disease.*** J Alzheimers Dis 2015; 44(1): 43-8.

19- Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. ***Coenzyme Q10 modulatescognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats***. Behav Brain Res 2006; 171(1): 9-16.

20- Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, et al. ***Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study.*** Am J Epidemiol 1997; 145(4): 301-8.

21- Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. ***Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease.*** Neurology 2004; 63(7): 1187-92.

22- McDermott JR, Gibson AM. ***Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme.*** Neurochem Res 1997; 22(1):49-56.

23- Qiu WQ, Folstein MF**.** ***Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis.*** Neurobiol Aging 2006 ; 27(2): 190-8.

24- Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, et al. ***Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain***. J Neurosci 2004; 24(43): 9632-7.

25- Kumar N, Dey CS. ***Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in 2C12 skeletal***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

muscle cells. Biochem Pharmacol 2003; 65(2): 249-57.

26- Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, et al. ***Insulin increases CSF Abeta 42 levelsin normal older adults.*** Neurology 2004; 60(12): 1899-903.

27- Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, et al. ***Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors.*** FASEB J 2008; 22(1): 246-60.

28- De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, et al. ***Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers***. Proc Natl Acad Sci 2009; 106: 1971-76.

29- Ayasolla KR, Singh AK, Singh I. ***5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) attenuates the expression of LPS- and Abeta peptide induced inflammatory mediators in astroglia.*** J Neuroinflammation 2005; 2: 21-2.

30- Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, et al. ***Antidiabetic drug metformin(GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription***. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(10): 3907-12.

31- Hwang IK, Kim IY, Joo EJ, Shin JH, Choi JW, Won MH, et al. ***Metformin normalizes type 2 diabetes-induced decrease in cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat dentate gyrus.*** Neurochem Res 2010; 35(4): 645-50.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

Effects of Metformin Intra Ventricular Injection on Learning and Spatial Memory in Streptozotocin Rat Model of Alzheimer's Disease

Ghasemi Abhari L(MSc Student)[1], Esmaeili MH(PhD)[*2], Benanaj M(PhD)[3]

[1,3]*Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran*
[2]*Department of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran*

Received: 4 Mar 2014 ***Accepted:*** 11 Dec 2014

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation of extracellular amyloid-β (Aβ) plaques, and intracellular aggregation of hyperphosphorylated Tau protein. Currently, it is widely recognized that AD is closely associated with impaired insulin signaling and glucose metabolism in brain. Therefore, investigating the role of agents that could improve neuronal insulin resistance merits attention in AD therapeutics. The goal of the present study was to investigate the effects of intra ventricular injection of metformin on learning and spatial memory of streptozotocin(STZ) Rat Model of AD.

Methods: In this experimental study, 48 male Wistar rats (200-250gr) were randomly divided into 6 groups(n=8): control, STZ, STZ+ Saline (0.2ul), STZ+Metformin(50,100,200ug/kg, i.c.v. for 10 day). For induction of AD, STZ (3 mg/kg, i.c.v, 10 µl each) were administered bilaterally into latral ventricles. All rats were tested in regard with their learning and spatial memory via the Morris water maze.

Results: The study results revealed that pre-training microinjection of Metformin in to lateral ventricle for 10 days can improve learning and spatial memory in STZ Rat Model of AD in a dose dependent manner, so that rats of these groups in comparison with STZ+ Saline group, found platform in the radial maze within less time and with travelling less distance.

Conclusion: The study results demonstrated possible therapeutic efficacy of metformin on AD via applying its ability to sensitize neuronal insulin resistance and thus, it was revealed that metformin is useful for AD treatment.

Keywords: Alzheimer's disease; Learning; Metformin; Spatial memory

This paper should be cited as:

Ghasemi Abhari L, Esmaeili MH, Benanaj M. ***Effects of metformin intra ventricular injection on learning and spatial memory in streptozotocin rat model of alzheimer's disease***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(1): 1764-75.

****Corresponding author: Tel: +98 9121818906, Email: esmail66@yahoo.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]