مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، خرداد ۱۳۹۴، ۲۲۲-۲۱۱

تأثیر تزریق داخل بطنی متفورمین بر ذخیره حافظه موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین

هاشم حق‌دوست[۱]، محمدحسین اسماعیلی[۲]، محمد صوفی‌آبادی[۱]، شهرام رستاک[۳]، بهناز حیدری[۴]، زینب چرم‌چی[۴]، لیلا قاسمی[۵]

دریافت مقاله: ۹۳/۷/۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۹/۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۱۲/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۴/۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: انسولین فرآیندهای زیادی مانند شکل‌پذیری سیناپسی، یادگیری و حافظه را در مغز تنظیم می‌کند. شواهد تجربی نشان می‌دهند که بین دیابت نوع ۲ و بیماری آلزایمر ارتباط وجود دارد. انسولین باعث تعدیل متابولیسم پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا می‌شود. همچنین، انسولین تجمع داخل سلولی آمیلوئید بتا را کاهش می‌دهد. هدف ما در مطالعه حاضر بررسی اثرات تزریق داخل بطنی متفورمین بر ذخیره حافظه موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین بود.

مواد و روش‌ها: ۵۶ سر موش صحرایی نر ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) به ۷ گروه کنترل، شم، استرپتوزوتوسین، سالین+ استرپتوزوتوسین و متفورمین با سه دوز مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم + استرپتوزوتوسین تقسیم شدند. برای القای آلزایمر، استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۰ میکرولیتر) به صورت دو طرفه به درون بطن‌های جانبی تزریق شد. دو هفته بعد موش‌ها ی صحرایی در دستگاه یادگیری احترازی آموزش داده شدند. بلافاصله بعد از آموزش سالین (۵ میکرولیتر) یا متفورمین (۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم، ۵ میکرولیتر) از طریق کانال راهنما به داخل بطن‌های طرفی موش‌ها تزریق شد و دو روز بعد تست به خاطرآوری انجام شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد تزریق متفورمین بعد از آموزش به داخل بطن‌های مغزی، ذخیره حافظه در موش‌های صحرایی آلزایمری را به صورت وابسته به دوز بهبود می‌بخشید، به طوری که زمان حضور در ناحیه روشن در گروه متفورمین + استرپتوزوتوسین (۲۰۰میکروگرم بر کیلوگرم) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه استرپتوزوتوسین به تنهایی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که استفاده از متفورمین می‌تواند برای درمان بیماری آلزایمر مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، متفورمین، داخل بطنی، یادگیری احترازی مهاری، ذخیره حافظه، استرپتوزوتوسین

۱- استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
تلفن: ۳۳۳۳۶۰۰۱-۰۲۸ دورنگار: ۳۳۳۲۴۹۷۱-۰۲۸، پست الکترونیکی: esmail66@yahoo.com
۳- مربی گروه هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

مقدمه

مطالعات نشان داده است که انسولین در مغز، در شکل‌پذیری سیناپسی، بقاء نورون‌ها، اعتیاد و تنظیم اعمال هیپوتالاموس نقش مهمی‌دارد [۲-۱]. مسیر داخل سلولی استفاده شده توسط انسولین برای تحت تأثیر قرار دادن شکل‌پذیری سیناپسی و بقاء نورونی از طریق مسیری مشترکی به نام فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز (PI3 kinase) می‌باشد [۳]. بیماری آلزایمر یک فرم زوال عقلی با علت نامعلوم است و در ۹۵٪ از موارد عامل اصلی شروع کننده این بیماری تخریب آهسته سلول‌های مغز می‌باشد که منجر به اختلال در حافظه، تفکر، رفتار و نهایتاً مرگ می‌شود. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد انسولین و سازوکار سیگنالینگ انسولین برای بقاء نورون‌ها مهم می‌باشند [۵-۴]. مطالعات کاهش بیان گیرنده انسولین در مغز افرادی که از بیماری آلزایمر رنج می‌برند را نشان داده‌اند [۶]. اختلال عمل انسولین می‌تواند در بروز بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۸-۷]. ارتباط وسیع آلزایمر با اختلال عمل انسولین باعث توصیف بیماری آلزایمر به عنوان "دیابت مغز" و استفاده از واژه دیابت نوع ۳ برای بیماری آلزایمر شده است [۹]. علائم مهم بیماری آلزایمر کاهش حافظه و تجمع داخل و خارج سلولی پروتئین‌های آمیلوئید بتا (Beta-amyloid protein) و پروتئین‌های تائوی فسفریله (Tau phosphorylated protein) می‌باشد. تحقیقات نشان داده است بیان ژن پروتئین‌های تائوی فسفریله و آمیلوئید بتا در مغز موش‌های دارای دیابت نوع ۱ و ۲ افزایش می‌یابد [۹]. انسولین متابولیسم پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا در نورون‌ها را تعدیل می‌کند و تجمع آمیلوئید بتا در مغز را کاهش می‌دهد [۱۰].

از این رو پژوهش‌ها در مورد نقش عوامل دارویی که می‌تواند مقاومت به انسولین نورون‌ها را بهبود ببخشد برای درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. متفورمین یکی از پر مصرف‌ترین داروها بر ضد مقاومت انسولین محیطی است. محققین مشاهده کردند چنانچه نورون‌ها را در محیط کشت به مدت طولانی در معرض انسولین قرار دهند علاوه بر این که نسبت به انسولین مقاوم می‌شوند، علائم شبه آلزایمر را نیز از خود نشان می‌دهند. اضافه کردن متفورمین به محیط کشت حساسیت به انسولین را در این نورون‌های مقاوم به انسولین افزایش می‌دهد و همچنین، از ظاهر شدن علائم شبه آلزایمر در آنها جلوگیری می‌کند [۱۱-۱۰].

با استفاده از نورون‌های اولیه انسان و موش‌های طبیعی و موش‌های فاقد ژن پروتئین تائو (پروتئینی که در انعطاف‌پذیری و ثبات میکروتوبول‌های اکسون نقش دارد و تجمع زیاد فرم فسفریله آن در مغز باعث بروز بیماری آلزایمر می‌شود)، محققین نشان داده‌اند که متفورمین باعث کاهش خونریزی فسفریلاسیون پروتئین‌های تائوی مغز می‌شود [۱۲].

همچنین، محققین نشان داده‌اند مغز موش‌های دیابتی چاق مقاوم به لپتین نسبت به موش‌های طبیعی، آمیلوئید بتای بیشتری دارد و همچنین، هیپوکامپ موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های طبیعی پروتئین تائوی فسفریله و غیر فسفریله بیشتری دارد و تزریق درون صفاقی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین برای مدت ۱۸ هفته به

موش‌های دیابتی، افزایش میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیر فسفریله را به حداقل می‌رساند [۱۳]. از آنجایی که دیابت خطر ابتلا به آلزایمر را افزایش می‌دهد [۹]، درمان با متفورمین حساسیت به انسولین را در نورون‌های مقاوم به انسولین افزایش می‌دهد و از ظاهر شدن علائم شبه آلزایمر در محیط کشت نورونی جلوگیری می‌کند [۱۱-۱۰]، همچنین، تزریق متفورمین به موش‌های دیابتی از تجمع پروتئین تائو در مغز جلوگیری می‌کند [۱۳] می‌توان پیش‌بینی کرد متفورمین از طریق افزایش حساسیت نورون‌های مغز به انسولین برای درمان آلزایمر مفید باشد. هدف این مطالعه بررسی اثرات درمانی تزریق درون بطنی متفورمین بر ذخیره حافظه موش‌های آلزایمری مدل (Streptozotocin (STZ در مدل یادگیری احترازی غیر فعال بود [۷].

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. تعداد ۵۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار (تهیه شده از مؤسسه رازی) که وزن۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم داشتند در ۷ گروه (۸ موش صحرایی در هر گروه) مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌های صحرایی در ۸ قفس جداگانه در شرایط استاندارد از نظر دما (۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد) و نور نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش موش‌های صحرایی آب و غذای خود را آزادانه دریافت می‌کردند. این تحقیق در ۳ مرحله اجرا گردید: ۱) جراحی به کمک دستگاه استرئوتاکسی و تزریق دو طرفه استرپتوزوتوسین به درون بطن‌های طرفی به منظور ایجاد مدل آلزایمر و همچنین، کانول‌گذاری دو طرفه بطن‌ها بعد از تزریق استرپتوزوتوسین به منظور تزریق درون بطنی متفورمین بعد از طی دوره بهبودی دو هفته‌ای ۲) آموزش یادگیری در دستگاه احترازی غیر فعال و تزریق درون بطنی متفورمین و سالین به موش‌های آلزایمری شده توسط استرپتوزوتوسین بلافاصله بعد از مرحله آموزش ۳) آزمون تست به خاطرآوری ۴۸ ساعت بعد از آموزش به منظور ارزیابی اثر تزریق داخل بطنی متفورمین بر ذخیره حافظه. برای القای آلزایمر محلول استرپتوزوتوسین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر طرف به وسیله جراحی به کمک دستگاه استرئوتاکسی به درون هر کدام از بطن‌های جانبی مغز با مختصات بر حسب برگما : DV=-۳/۲، ML=±۱/۲، AP-۰/۵، تزریق شد [۱۵-۱۴، ۷].

در این جراحی ابتدا حیوانات با استفاده ار محلول کتامین/ زایلازین (به نسبت ۶/۶۰ میلی‌گرم برکیلوگرم)، بیهوش و سپس در دستگاه استرئوتاکس 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 (Paxinos) به روش استرئوتاکسیک محل مورد نظر تزریق در دو طرف سر نشانه‌گذاری گردید [۱۶]. 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، با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر طرف) به درون بطن‌های جانبی به آرامی تزریق شد.

بعد از تزریق استرپتوزوتوسین کانول‌گذاری دو طرفه بطن‌ها به منظور تزریق درون بطنی متفورمین در آینده بعد از طی دوره بهبودی انجام شد. گروه‌های مورد آزمایش به شرح زیر بودند: ۱) گروه شاهد با تزریق حلال ۲) گروه شم (عمل جراحی بدون تزریق) ۳) گروه آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین که خود به ۵ زیر گروه به شرح زیر تقسیم شدند ۱) گروه استرپتوزوتوسین ۲) گروه استرپتوزوتوسین + سالین که بلافاصله بعد از آموزش یادگیری احترازی نرمال سالین (۵ میکرولیتر) به صورت درون بطنی دریافت می‌کردند. ۳) گروه استرپتوزوتوسین + متفورمین ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم. ۴) گروه استرپتوزوتوسین + متفورمین ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم ۵) گروه استرپتو-زوتوسین+متفورمین ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم که بلافاصله بعد از آموزش یادگیری احترازی متفورمین را با حجم (۵ میکرولیتر) به صورت درون بطنی مشابه گروه سالین دریافت می‌کردند.

برای ارزیابی یادگیری و حافظه حیوان از دستگاه احترازی غیر فعال (ساخت شرکت طب آزما تبریز) استفاده شد [۱۷]. این دستگاه یک محفظه مکعب مستطیل با طول ۴۰ سانتی‌متر و عرض ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۶ سانتی‌متر می‌باشد. دستگاه توسط یک درب به شکل گیوتین به دوقسمت تاریک و روشن که طول قسمت تاریک بیشتر است، تقسیم می‌شود. در کف هر دو بخش میله‌های به فاصله نیم سانتی متر از هم قرار دارند و کف قسمت تاریک به یک مدار الکتریکی وصل است که جریان الکتریکی با شدت و مدت معین از کف آن عبور می‌کند. مراحل آموزش یادگیری در دستگاه احترازی غیرفعال به شرح زیر اعمال گردید:

۱- سازش یافتن: هر موش ابتدا در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرا می‌گرفت و پدال دستگاه زده می‌شد و۷ ثانیه بعد درب باز شده و به موش اجازه داده می‌شد وارد قسمت تاریک شود. سپس درب بسته شده و پس از سپری شدن چند ثانیه حیوان به قفس بازگردانده می‌شد. این مرحله در دو روز و هر روز به مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌شد.

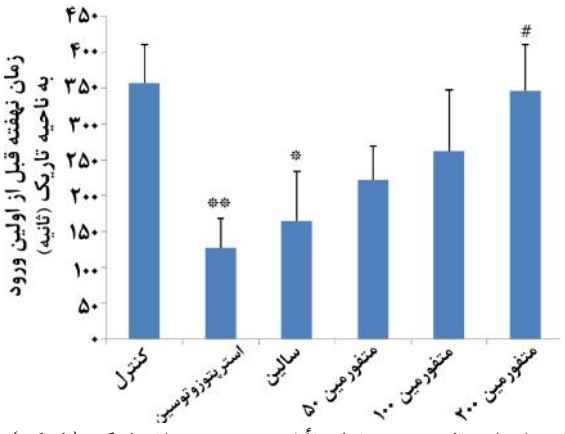
۲- آموزش: ۲۴ ساعت پس از سازش یافتن، آموزش آغاز می‌شد. در این مرحله هر موش ابتدا در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرا می‌گرفت و پدال دستگاه زده می‌شد و ۷ ثانیه بعد درب باز شده و به موش اجازه داده می‌شد وارد قسمت تاریک شود. هنگامی که موش وارد قسمت تاریک می‌شد درب گیوتین دستگاه بسته شده و شوک الکتریکی با شدت ۱ میلی‌آمپر با فرکانس ۵۰ هرتز، به مدت ۳ ثانیه و یک دفعه به حیوان اعمال می‌شد. این مرحله آنقدر تکرار می‌شد تا حیوان در مدت ۱۲۰ ثانیه‌ای که در قسمت روشن قرار می‌گرفت وارد قسمت تاریک نشود. وقتی حیوان از ترس شوک دیدن بیش از ۱۲۰ ثانیه در قسمت روشن می‌ماند آموزش خاتمه یافته تلقی می‌شد و بلافاصله پس از خارج کردن حیوان از دستگاه متفورمین و یا حلال آن سالین به صورت درون بطنی به حیوان تزریق می‌شد.

۳- تست به خاطرآوری: ۴۸ساعت بعد از پایان یافتن مرحله آموزش تست حافظه یا به خاطر آوری انجام می‌شد. در این مرحله مثل دفعات قبل هر موش ابتدا در قسمت

روشن دستگاه پشت به درب قرا می‌گرفت و پدال دستگاه زده می‌شد و ۷ ثانیه بعد درب گیوتین باز می‌شد و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان برای اولین بار به قسمت تاریک وارد شود (Step-Through Latency, STL) و کل مدت زمانی که حیوان در مدت ۹ دقیقه تست در قسمت روشن و تاریک به سر می‌برد توسط دستگاه ثبت می‌شد. اطلاعات حاصل با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرف ANOVA و آزمون تعقیبی TUKEY مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

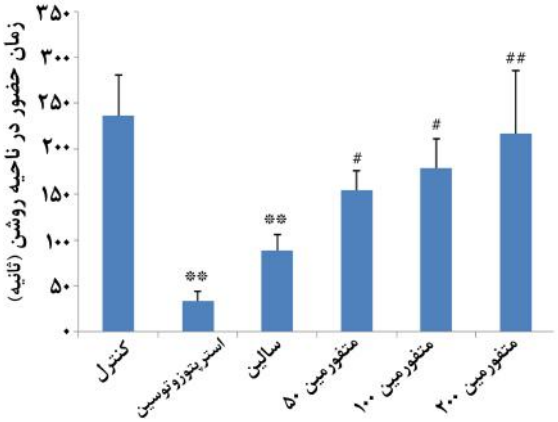
آنالیز STL (مدت زمانی که طول کشید تا حیوان برای اولین بار به قسمت تاریک دستگاه وارد شود) گروه‌های کنترل و شم نشان داد بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود ندارد. به همین دلیل در ادامه کار بقیه گروه‌ها فقط با گروه کنترل مقایسه شدند. همچنین، آنالیز STL در بین گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین به همراه سالین نشان داد بین این دو گروه نیز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، ولی اختلاف بین این دو گروه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین ۲۰۰میکروگرم بر کیلوگرم، معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). (نمودار ۱)



نمودار ۱- مقایسه مدت زمان تأخیر ورود به منطقه شوک (تاریک) بین گروه‌های مورد مطالعه در طی آزمایش به خاطر آوری. * اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه کنترل. $p<۰/۰۱^{**}$ و $p<۰/۰۵^{*}$. #اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه استرپتوزوتوسین $p<۰/۰۵^{\#}$.

آنالیز STL گروه‌های مختلف نشان داد تزریق متفورمین بعد از آموزش به موش‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین باعث افزایش وابسته به دوز بخاطرآوری اطلاعات می‌شود به طوری که موش‌های دریافت کننده متفورمین زمان بیشتری قبل از اولین ورود به ناحیه تاریک در محفظه روشن می‌ماندند. این زمان در گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم از بقیه گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین طولانی تر بود و اختلاف بین این گروه با گروه استرپتوزوتوسین معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۱). همچنین، آنالیز کل زمان سپری شده در ناحیه روشن در طول ۹ دقیقه آزمون به خاطرآوری نشان داد بین گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین به همراه سالین اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی اختلاف بین این دو گروه با گروه گنترل و گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). کل زمان حضور در

ناحیه روشن در گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین طولانی‌تر از گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین به همراه سالین بود و اختلاف بین گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم با گروه استرپتوزوتوسین معنی‌دار بود (p<۰/۰۱). کل زمان حضور در ناحیه روشن در گروه کنترل و گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم ، طولانی‌تر از سایر گروه‌ها بود (نمودار ۲). برعکس کل زمان حضور در ناحیه تاریک (ناحیه دریافت شوک) در طول ۹ دقیقه آزمون به خاطرآوری در گروه کنترل و گروه‌های استرپتوزوتوسین + متفورمین ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم، کوتاه‌تر از سایر گروه‌ها بود. این موضوع نشان می‌دهد که گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین خطر مواجه شدن با شوک را در صورت ورود به ناحیه تاریک بیشتر به حافظه سپرده‌اند.



نمودار ۲- مقایسه کل مدت زمان حضور در ناحیه روشن بین گروه‌های مورد مطالعه در طی ۹ دقیقه آزمایش به خاطرآوری. * اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه کنترل. و $p<۰/۰۵^{*}$ و $p<۰/۰۱^{**}$ #اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با گروه استرپتوزوتوسین $p<۰/۰۵^{\#}$ و $p<۰/۰۱^{\#\#}$.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد استرپتوزوتوسین توانسته است در حافظه موش‌ها اختلال ایجاد کند چرا که مدت زمان تأخیر ورود به منطقه شوک (تاریک) و همچنین، کل زمان حضور در ناحیه روشن در گروه استرپتوزوتوسین کمتر از گروه کنترل بود، در حالی که زمان حضور در ناحیه تاریک (ناحیه شوک) در این گروه طولانی‌تر از گروه کنترل بود و این بدان معنی است که ذخیره حافظه این موش‌ها دچار اختلال شده است. تزریق داخل بطنی۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم متفورمین به صورت وابسته به دوز توانست تا حدود زیادی اختلال حافظه ایجاد در اثر تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی را کاهش دهد.

از این نظر نتایج ما با نتایج محققینی که نشان داده‌اند متفورمین می‌تواند مقاومت به انسولین نورون‌های محیط کشت سلولی را کاهش دهد و بروز علائم شبه آلزایمر در این نورون‌ها را کاهش دهد همخوانی دارد [۱۰]. همین‌طور با نتایج محققینی که نشان داده‌اند هر دو فرم دیابت نوع ۱ و ۲ با اختلال عملکرد شناختی همراه می‌باشد همخوانی دارد [۱۹-۱۸]. نشان داده شده است که انسولین هر دو سطح آمیلوئید بتا و فسفوریلاسیون تائو را از طریق آنزیم تخریب کننده 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 [۲۱-۲۰]. در واقع، اضافه کردن مقدار بیشتری از انسولین، به عنوان یکی از سوبسترای آنزیم

تخریب‌کننده انسولین (مانند آنچه که در دیابت نوع ۲ اتفاق می‌افتد) به محیط مغز مانع از فعالیت این آنزیم برای تخریب آمیلوئید بتا می‌شود [۲۰]. 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 تمایل پیدا خواهد کرد و همین امر به طور مؤثری باعث تجمع آمیلوئید بتا در مغز موش‌های دیابتی نوع ۲ خواهد شد که بنوبه خود خطر ابتلا به آلزایمر را در آنها افزایش می‌دهد. در دیابت نوع ۲ به علت اختلال در عملکرد گیرنده انسولین، سلول‌های بدن نسبت به انسولین مقاوم می‌شوند و سازوکار کنترل ترشح انسولین مختل می‌شود نتیجتاً مقدار انسولین پلاسما افزایش می‌یابد. نشان داده شده است که انسولین در غلظت بالا به طور قابل توجهی میزان حذف آمیلوئید بتا را کاهش می‌دهد و باعث افزایش سطح آمیلوئید بتا در مغز موش‌ها می‌شود [۲۲].

از طریق مطالعات مختلف مشخص شده است چنانچه بافت‌های محیطی به مدت طولانی در معرض سطح بالای از انسولین قرار گیرند سیگنالینگ انسولین در آنها تضعیف می‌شود [۲۳]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند بالا بودن انسولین خون یکی از عوامل خطر ابتلا به آلزایمر می‌باشد [۱۹-۱۸]. بعلاوه مشخص شده است تزریق محیطی انسولین در انسان موجب افزایش سطح آمیلوئید بتا در مایع مغزی نخاعی می‌شود و تزریق داخل مغزی انسولین کلیرانس آمیلوئیدهای بتای مغز را کاهش می‌دهد[۲۴، ۲۲]. این مطالعات به طور غیر مستقیم نقش مهم هیپرانسولینمی (بالا بودن انسولین خون) و افزایش مقاومت به انسولین را در پاتوژنز بیماری آلزایمر نشان می‌دهد.

de la Monte و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند القاء مقاومت به انسولین در مغز به وسیله تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین کافی است تا علائم مهم بیماری آلزایمر را در حیوانات ایجاد کند و پیشنهاد کرده‌اند که این روش یکی از بهترین روش‌های ایجاد بیماری آلزایمر تجربی می‌باشد [۷]. بنابراین می‌توان انتظار داشت هر عاملی که بتواند مقاومت به انسولین را در نورون‌ها کاهش دهد برای درمان آلزایمر مفید خواهد بود و بر عکس هرعاملی که مقاومت به انسولین را افزایش دهد علائم آلزایمر را تشدید خواهد کرد. جالب این که یافته‌های محققین نشان داده‌اند آمیلوئیدهای بتا که به عنوان نوروتوکسین در بیماری آلزایمر مطرح می‌باشند خود می‌توانند حذف گیرنده‌های انسولین از غشاء نورون‌ها را تحریک کنند و باعث افزایش مقاومت به انسولین شوند [۲۵].

در مطالعه ما نیز مشخص شد استرپتوزوتوسین احتمالاً از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز و ایجاد دیابت تیپ ۳ توانسته است جنبه‌هایی از بیماری آلزایمر که کاهش یادگیری و حافظه می‌باشد را القاء کند. برعکس تزریق متفورمین به داخل بطن‌ها به صورت وابسته به دوز توانست تا حدود زیادی کاهش میزان ذخیره حافظه در موش‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین را جبران کند. Gupta و همکارانش در سال ۲۰۱۱ مشابه نتایج ما نشان دادند که متفورمین، می‌تواند مقاومت به انسولین نورونی و اختلال در متابولیسم گلوکز و علائم شبه

آلزایمر نورون‌های محیط کشت را کاهش دهد [۱۰]. همچنین، De Felice و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که داروی Peroxisome Proliferator- (PPARγ) Activated Receptor gamma که برای درمان بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲، تجویز می‌شود می‌تواند مقاومت به انسولین ایجاد شده توسط آمیلوئیدهای بتا در نورون‌های مغز را کاهش دهد [۲۶]. تحقیقات نشان داده است درمان با متفورمین از فعال شدن واسطه‌های استرس اکسیداتیو و التهاب سلولی که منجر به آپوپتوز می‌شود نیز جلوگیری می‌کند [۲۷]. نتایج تحقیق دیگری نشان داد استفاده از انسولین و متفورمین با هم در محیط کشت باعث کاهش شدید سطح بتا آمیلوئید تولیدی در نورون‌ها می‌شود [۲۸].

این یافته‌ها با نتایج ما همخوانی دارد چرا که در حیواناتی که ما استفاده کردیم اگرچه استرپتوزوتوسین 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 تزریق داخل بطنی متفورمین به آنها به صورت وابسته به دوز باعث افزایش حساسیت نورون‌های مغزشان به انسولین شده و احتمالاً متفورمین تزریقی اثرات انسولین طبیعی بدن حیوان در کاهش سطح بتا آمیلوئیدهای نورون‌ها را تشدید کرده و در نتیجه علائم آلزایمر آنها بهبود نسبی یافته به همین دلیل ذخیره حافظه موش‌های آلزایمری در گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین به صورت وابسته به دوز بهتر از موش‌های دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین به تنهایی بود. نتایج ما و نتایج حاصل از کار محققین قبلی یک روش درمانی جدیدی برای درمان افراد مبتلا به آسیب مغزی یا بیماری‌های ناشی از نورودژنراسیون مغز مثل آلزایمر را پیشنهاد می‌کند.

نتیجه‌گیری

تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در مغز موش‌ها توانست علائم آلزایمر که اختلال در یادگیری و حافظه می‌باشد را ایجاد کند. تزریق داخل بطنی متفورمین توانست اختلال یادگیری و حافظه ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین را به صورت وابسته به دوز کاهش دهد و میزان ذخیره حافظه در مدل یادگیری احترازی غیر فعال موش‌ها را افزایش دهد. بنابراین احتمالاً متفورمین به عنوان داروی کاهش‌دهنده مقاومت به انسولین، برای درمان بیماران آلزایمری می‌تواند مفید باشد.

References

[1] Plum L, Schubert M, Bruning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 59-65.

[2] Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177: 125-34.

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

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

[5] 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: 882-93.

[6] Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998; 105: 423-38.

[7] Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 13-33.

[8] 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 acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 2005; 8: 247-68.

[9] Steen E, Terry BM, Rivera EJ. 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: 63-80.

[10] Gupta A, Bisht B, Chinmoy Sankar Dey . Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology* 2011; 60: 910-20.

[11] El-Mir MY, Detaille DG, Delgado-Esteban M. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol.Neurosci* 2008; 34: 77-87.

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

[13] 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.

[14] Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, AhmadM, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 2006; 171(1): 9-16.

[15] Rupinder KS, Nirmal S. All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 40 (2013) 38-46.

[16] Paxinos, G, & Watson, C. (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates, 3rd edn, Academic Press, San Diego.

[17] Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of intrahippocampal injectionof GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J Psychopharmacol* 2002; 16(4): 313-9.

[18] Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145(4): 301-8.

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

[20] 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.

[21] 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.

[22] Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H. Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. *J Neurosci* 2004; 24 (43): 9632-7.

[23] Kumar N, Dey CS. Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in 2C12 skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 249-57.

[24] Watson GS, Peskind ER, Asthana S. Insulin increases CSF Abeta42 levelsin normal older adults. *Neurology* 2004; 60: 1899-903.

[25] Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 2009; 22: 246-60.

[26] De Felice FG, Vieira MN, Bomfim, TR. Protection of synapses against Alzheimer’s-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 1971-6.

[27] 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.

[28] Chen Y, Zhou K, Wang R. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 3907-12.

Effects of Metformin Microinjection into Lateral Ventricles on Memory Retention of Streptozotocin Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease

H. Haghdost[1], M.H. Esmaeili[2], M. Sofiabadi[1], S. Rastak[3], B. Heydari[4], Z. Charmchi[4], L. Ghasemi[5]

Received: 23/09/2014 Sent for Revision: 26/11/2014 Received Revised Manuscript: 09/03/2015 Accepted: 08/04/2015

Background and Objective: Insulin regulates many important processes in the central nervous system such as synaptic plasticity, learning and memory. Experimental evidence suggest a link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease (AD). Insulin modulates the metabolism of beta-amyloid precursor protein in neurons, decreasing the intracellular accumulation of beta-amyloid. The aim of the present study was to investigate the effects of intraventricular injection of Metformin on memory retention in streptozotocin (STZ) rat model of Alzheimer's disease.

Materials and Methods: A total of 56 male wistar rats (200-250 gr) were divided into 7 groups (n=8): Control, Sham, STZ, STZ +Salin, STZ +Metformin. For induction of AD, STZ (3 mg/kg, i.c.v, 10 µl each) were administered bilaterally into latral ventricles. Two weeks later all rats were trained in one trial step-through passive avoidance learning. Saline (5 ul) or Metformin (50,100,200ug/kg, 5 ul, i.c.v) were injected through the guide cannula immediately after training. Retention test was done two days later.

Results: Our results showed that post-training microinjection of Metformin into lateral ventricles improves memory retention in STZ rat model of AD in a dose dependent manner, so that the time spent in the light chamber before entering to the dark area in the STZ + Metformin (200ug/kg) group rats were significantly more than STZ group.

Conclusion: The results indicated that Metformin is useful for treatment of Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer, Metformin, Intraventricular, Passive avoidance learning, Memory retention, Streptozotocin

Funding: This research was funded by Qazvine University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Qazvine University of Medical Scinces approved the study.

How to cite this article: Haghdost H, Esmaeili MH, Sofiabadi M, Rastak S, Heydari B, Charmchi Z, Ghasemi L. Effects of Metformin Microinjection into Lateral Ventricles on Memory Retention of Streptozotocin Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease.. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2014; 14(3): 222-211. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran (Corresponding Author) (028) 33336001, Fax :(028) 33324971, E-mail: esmail66@yahoo.com

3- Master, Dept. of Anesthesia, Faculty of Paramedica Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

4- Medical student. Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

5- Student of Physiology, Dept of Biology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran