

The effect of metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin-induced rat model of alzheimer's disease

Esmaeili MH^{1*}, Mafe-Esmaeili M²

1- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Qazvine University of Medical Sciences, Qazvine, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, I. R. Iran.

Received April 24, 2014; Accepted December 18, 2014

Abstract:

Background: Alzheimer's disease (AD) is closely associated with impaired insulin signaling in brain, suggesting it to be a brain-specific form of diabetes and thus termed as the "type 3 diabetes". Metformin is one of the most widely used agent against insulin resistance. The present study aimed to investigate the therapeutic effect of metformin on memory retention in streptozotocin (STZ)-induced model of AD in rats using an inhibitory avoidance learning.

Materials and Methods: In this experimental study, 56 male Wistar rats were randomly allocated into 7 groups: control; STZ-treated, STZ plus saline or metformin. For the induction of AD, STZ (3 mg/kg) was administered bilaterally into lateral ventricles. All rats were trained in shuttle box for inhibitory avoidance learning. Metformin (50, 100, 200 mg/kg, i.p) or saline were injected immediately after the training. The retention test was performed after two days.

Results: The results showed that post-training injection of metformin dose-dependently increased the time spent in the light chamber before entering to the dark chamber in STZ-treated rats. Moreover, metformin dose-dependently improved the memory retention in the rats.

Conclusion: Post-training injection of metformin dose-dependently enhanced the memory retention in STZ-induced model of AD.

Keywords: Alzheimer, Metformin, Inhibitory avoidance learning, Memory

* Corresponding Author.

Email: esmail66@yahoo.com

Tel: 0098 912 1818 906

Fax: 0098 28 333 24971

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2015; Vol. 19, No 1, Pages 1-7

Please cite this article as: Esmaeili MH, Mafe-Esmaeili M. The effect of metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin-induced rat model of alzheimer's disease. *Feyz* 2015; 19(1): 1-7.

تاثیر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی مهاری

محمد حسین اسماعیلی^{*۱}، مهین مافی اسماعیلی^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر ارتباط نزدیکی با اختلال سیگنالینگ انسولین در مغز دارد و فرم خاصی از دیابت مغزی است که آن را دیابت نوع ۳ نامیده‌اند. متفورمین، یکی از داروهای ضد مقاومت انسولینی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر درمانی متفورمین بر ذخیره حافظه موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی مهاری انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد که به‌طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل و گروه تیمار شده با استرپتوزوسین و گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوسین به‌همراه سالین یا متفورمین. برای القای مدل آلزایمر، استرپتوزوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به درون بطن‌های جانبی تزریق شد. تمام موش‌ها در جعبه شاتل تحت آموزش احترازی مهاری قرار گرفتند. بلافاصله بعد از آموزش سالین یا متفورمین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، درون صفاقی) به موش‌ها تزریق شد. تست به‌خاطر آوری دو روز بعد انجام گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که تزریق بعد از آموزش متفورمین به موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین زمان سپری شده در ناحیه روشن قبل از ورود به ناحیه تاریک را به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌دهد. همچنین، متفورمین به‌صورت وابسته به دوز باعث بهبود حافظه در موش‌های مذکور شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که تزریق بعد از آموزش متفورمین باعث افزایش وابسته به دوز حافظه در موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین می‌شود.

واژگان کلیدی: آلزایمر، متفورمین، یادگیری احترازی مهاری، ذخیره حافظه

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴، صفحات ۷-۱

مقدمه

نشانه‌های پاتولوژیک بیماری آلزایمر ظاهر شدن پروتئین‌های تائو فسفریله شده داخل سلولی و پلاک‌های بتا آمیلوئیدی خارج سلولی است که به‌وسیله آنزیم‌های بتا و گاما سکرناز از پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید به‌وجود می‌آیند [۵، ۶]. آمیلوئید بتا و پروتئین‌های تائو فسفریله شده باعث مسموم شدن موضعی نورون‌ها می‌شوند و در نهایت منجر به مرگ نورون‌ها و بروز بیماری آلزایمر می‌شوند. [۷]. مطالعات قبلی نشان داده است که دیابت خطر ابتلا به آلزایمر را افزایش می‌دهد [۸]. بیان تائوهای فسفریله و آمیلوئید بتا در مغز موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ افزایش می‌یابد [۹-۱۱]. جالب اینکه یافته‌های اخیر نشان داده‌اند بتا آمیلوئید، می‌تواند حذف گیرنده‌های انسولین از غشاء نورون‌ها را تحریک کند و این امر منجر به ایجاد مقاومت بیشتر به انسولین در نورون‌ها می‌شود [۱۲]. به‌تازگی بیان شده است 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 شده است که این روش یکی از بهترین روش‌ها و مدل‌های ایجاد بیماری آلزایمر در حیوانات می‌باشد [۱۳]. متفورمین یکی از پرمصرف‌ترین کاهش‌دهنده‌های خوراکی قند خون است که به- عنوان خط اول درمان بیماری دیابت نوع ۲ استفاده می‌شود [۱۴].

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد انسولین و سیگنالینگ انسولین برای بقاء نورون‌ها مهم می‌باشند [۱، ۲]. با مطالعه‌های انجام شده بر روی مغز بیماران آلزایمری کاهش بیان گیرنده انسولین در آنها نشان شده است [۲]. در حال حاضر این موضوع که بیماری آلزایمر با اختلال در سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز در مغز مرتبط است، به‌طور گسترده‌ای به رسمیت شناخته شده و به همین دلیل پیشنهاد شده است که بیماری آلزایمر فرم خاصی از دیابت بوده و نام دیابت نوع ۳ را به آن داده‌اند [۳]. بالا بودن انسولین خون (مشابه آنچه در دیابت تیپ ۲ اتفاق می- افتد) یکی از ریسک فاکتورهای ابتلا به آلزایمر می‌باشد [۴].

^۱ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شمال

* نشانی نویسنده مسئول:

قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

دوره‌نویس: ۰۲۸۳۳۳۲۴۹۷۱

تلفن: ۰۹۱۲ ۱۸۱۸۹۰۶

پست الکترونیک: esmail66@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۴

دستگاه استرئوتاگس قرار داده شدند و پس از فیکس کردن حیوان در دستگاه در پشت سر حیوان در خط وسط یک برش ایجاد شد. بعد از تمیز کردن سطح جمجمه و یافتن نقطه برگما به‌عنوان مرجع، با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون محل مورد نظر تزریق در دو طرف سر نشانه گذاری گردید. بعد از علامت گذاری نقاط هدف بر روی سطح جمجمه، دو سوراخ به کمک دریل دندان پزشکی ایجاد شد و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول استرپتوزوتوسین به‌صورت دوطرفه به درون بطن‌های جانبی به آرامی تزریق شد. گروه‌های مورد آزمایش به شرح زیر بودند: (۱) گروه کنترل؛ (۲) گروه شم؛ و (۳) گروه مدل آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین که خود به ۵ زیرگروه به‌شرح زیر تقسیم شدند: (۱) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین؛ (۲) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به‌همراه سالین؛ (۳) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به‌همراه متفورمین که متفورمین را با دوزهای (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت درون صفاقی بلافاصله بعد از آموزش دریافت می‌کردند [۱۶]. برای ارزیابی یادگیری و حافظه حیوان از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال ساخت شرکت طب آزما تبریز استفاده شد [۱۹].

مراحل آزمون حافظه و یادگیری احترازی غیرفعال

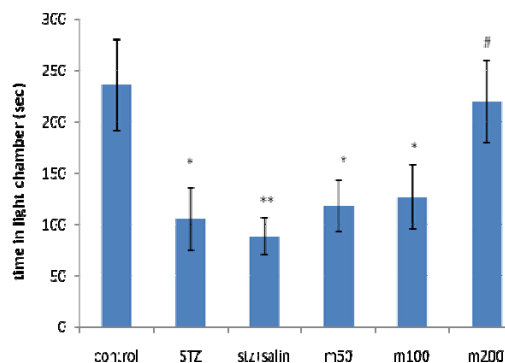
۱- سازش یافتن: ابتدا همه گروه‌های آزمایشی به دستگاه عادت داده شدند؛ به این ترتیب که موش‌های هر گروه یکی یکی درون دستگاه قرار گرفتند و ۷ ثانیه بعد درب بین دو محفظه برداشته شده و به مدت دو دقیقه به موش اجازه داده می‌شد آزادانه در دو محفظه تاریک و روشن رفت و آمد کند، که معمولاً در این مرحله موش به‌طور طبیعی تمایل داشت وارد محفظه تاریک شود. بلافاصله پس از ورود حیوان به قسمت تاریک، درب بسته شده و پس از سپری شدن چند ثانیه حیوان به قفس بازگردانده می‌شد. ۲- اکتساب: ۳۰ دقیقه پس از عادت کردن، مرحله اکتساب انجام شد؛ بدین‌ترتیب که موش در قسمت روشن جعبه گذاشته شده و دو دقیقه به حیوان مهلت داده می‌شد تا وارد محفظه تاریک شود. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک درب بسته شده و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱ میلی‌آمپر به‌مدت ۳ ثانیه به پای حیوان وارد می‌گردید. سپس، موش از محفظه تاریک خارج شده و به قفس بازگردانده می‌شد. پس از ۲ دقیقه موش مجدداً در ناحیه روشن قرار گرفته تا تست یادگیری انجام شود. عدم ورود به ناحیه تاریک به‌مدت ۱۲۰ ثانیه به‌عنوان یادگیری موفق در نظر گرفته می‌شد. در صورت ورود مجدد حیوان به ناحیه تاریک، درب برای بار دوم بسته شده و شوک به‌صورت قبل وارد

جالب اینکه گروهی از محققین نشان داده‌اند که متفورمین بیان آمیلوئید بتا در محیط‌های کشت نورونی را افزایش می‌دهد [۱۵]. این در حالی است که گروه دیگری از محققین نشان داده‌اند مغز موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های طبیعی آمیلوئید بتای بیشتری داشته و هیپوکامپ موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله و تام بیشتری دارد. به‌علاوه، تزریق درون صفاقی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین به موش‌های دیابتی برای مدت ۱۸ هفته از افزایش میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله جلوگیری می‌کند [۱۶]. چنانچه نورون‌ها را در محیط کشت به‌مدت طولانی در معرض انسولین قرار دهند علاوه بر اینکه نسبت به انسولین مقاوم می‌شوند، نشانه‌های مولکولی و پاتولوژیکی بیماری آلزایمر را نیز از خود نشان می‌دهند و درمان با متفورمین از ظاهر شدن ویژگی‌های مولکولی و پاتولوژیکی مشاهده شده در بیماری آلزایمر در آنها جلوگیری می‌کند [۱۷]؛ از این‌رو، تحقیق در مورد نقش عوامل دارویی هم‌چون متفورمین که می‌توانند مقاومت به انسولین نورون‌ها را بهبود ببخشند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. با توجه به شواهد ارائه شده در بالا چنین به نظر می‌رسد که داروی متفورمین از طریق کاهش مقاومت به انسولین در مغز بتواند در درمان آلزایمر موثر باشد. لذا، در تحقیق پیش رو سعی شد اثرات تزریق درون صفاقی متفورمین با دوزهای مختلف بر ذخیره حافظه موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین در آزمون یادگیری احترازی غیرفعال مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. تعداد ۵۶ سر موش نر نژاد ویستار (خریداری شده از موسسه رازی تهران) که وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم داشتند در ۷ گروه (۸ موش در هر گروه) مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط استاندارد از نظر دما (23 ± 2 درجه سانتی‌گراد) و نور نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش موش‌ها آب و غذای طبیعی خود را آزادانه دریافت می‌کردند. برای القای آلزایمر ۱۰ میکرولیتر از محلول استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌وسیله جراحی استرئوتاگسیک به درون هرکدام از بطن‌های جانبی با مختصات برحسب برگما: $-0/5 =$ قدامی خلفی، $\pm 1/2 =$ جانبی نسبت به خط وسط، $-3/2 =$ پشتی شکمی تزریق شد [۱۸، ۱۳]. برای جراحی ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین/زایلازین (۶/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و سپس در

همراه متفورمین (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار بود ($P < 0.05$ ، نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- تاثیر متفورمین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین بر زمان گذرانده شده در ناحیه روشن در آزمون به خاطر آوری در موش های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین نشان داده شده است. * $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ تفاوت با گروه کنترل، # $P < 0.05$ تفاوت با گروه استرپتوزوسین.

به علاوه، نتایج نشان داد که تاخیر زمانی ورود به قسمت تاریک و زمان حضور در ناحیه روشن در گروه کنترل و گروه استرپتو-زوسین به همراه متفورمین (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) طولانی تر از سایر گروه ها است. این موضوع نشان می دهد این دو گروه دریافت شوک را در صورت ورود به ناحیه تاریک بیشتر به حافظه سپرده اند. این موضوع نشان دهنده این است که تزریق متفورمین بلافاصله بعد از آموزش به موش های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین باعث افزایش وابسته به دوز ذخیره حافظه می شود (نمودار شماره ۱ و ۲). هم چنین، آنالیز زمان گذرانده شده در محفظه تاریک در طی آزمایش به خاطر آوری نشان داد اگرچه بین گروه های استرپتو-زوسین و استرپتوزوسین به همراه سالین اختلاف معنی داری وجود ندارد، ولی اختلاف بین این دو گروه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین به همراه متفورمین (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار است ($P < 0.05$ ، نمودار شماره ۳).

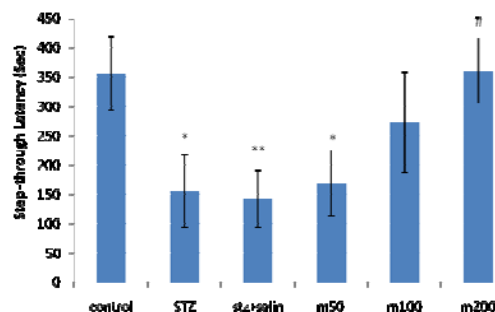
بحث

نتایج آنالیز تاخیر زمانی اولین ورود به قسمت تاریک (منطقه شوک) و کل زمان گذرانده شده در محفظه تاریک و روشن گروه های مختلف در طی تست به خاطر آوری نشان داد که تزریق متفورمین بلافاصله بعد از آموزش به موش های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین باعث افزایش وابسته به دوز تاخیر زمانی اولین

می گردید و این کار آن قدر تکرار می شد تا موش یاد بگیرد وارد محفظه تاریک نشود. ۳- به خاطر آوری: در آزمون به خاطر آوری که ۴۸ ساعت بعد از آموزش صورت گرفت، موش در قسمت روشن قرار گرفته، ۷ ثانیه بعد درب باز می گردید و زمانی که طول می کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک شود و مدت زمانی که در قسمت تاریک و روشن می ماند به مدت ۹ دقیقه بررسی می گردید. سپس، داده های جمع آوری شده از پارامترهای مذکور در هر یک از گروه های آزمایشی با استفاده از تست های آماری مناسب مورد مقایسه قرار گرفتند [۱۹]. در تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون ANOVA یک طرفه و (آزمون تعقیبی توکی) استفاده شد. هم چنین، سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

آنالیز تاخیر زمانی ورود به قسمت تاریک گروه های کنترل و شم نشان داد بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود ندارد. هم چنین، آنالیز این پارامتر بین گروه های استرپتوزوسین و استرپتو-زوسین به همراه سالین نشان داد بین این دو گروه نیز اختلاف معنی داری وجود ندارد، ولی اختلاف بین این دو گروه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین به همراه متفورمین (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار بود ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱).

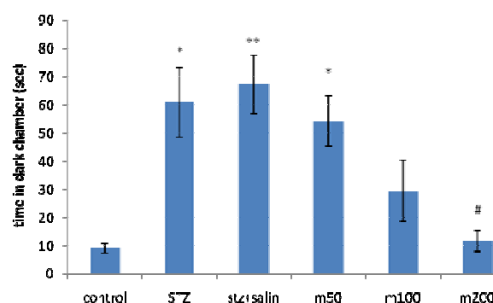


نمودار شماره ۱- تاثیر متفورمین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین بر تاخیر ورود به بخش تاریک در آزمون به خاطر آوری در موش های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین نشان داده شده است. * $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ تفاوت با گروه کنترل، # $P < 0.05$ تفاوت با گروه استرپتوزوسین.

هم چنین، آنالیز زمان گذرانده شده در ناحیه روشن در طی آزمایش به خاطر آوری نشان داد بین گروه های استرپتوزوسین و استرپتو-زوسین به همراه سالین اختلاف معنی داری وجود ندارد، ولی اختلاف بین این دو گروه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین به-

آلزامیر در نورون‌های محیط کشت غنی از انسولین جلوگیری کند [۱۷،۱۵]. به‌علاوه، بیان شده است که تزریق محیطی داروهای ضد دیابتی متفورمین و روزی‌گلی‌تازون به موش‌های دیابتی، فسفریلاسیون پروتئین‌های تائو در هیپوکامپ را کاهش می‌دهد [۲۳،۱۶]. تزریق متفورمین به موش‌های دیابتی نوع ۲ که سطح بالایی از انسولین پلاسمایی را دارند موجب کاهش آمیلوئیدهای بتای مغز می‌شود [۱۶]. متفورمین می‌تواند از طریق افزایش حساسیت نورون‌ها به انسولین اثرات انسولین در کاهش سطح بتا آمیلوئیدهای نورون‌ها را تشدید کند [۱۶]. تزریق انسولین بعد از استرپتوزوسین فسفریلاسیون پروتئین‌های تائو را کاهش می‌دهد [۱۰]. نتایج ما با نتایج محققینی که نشان داده‌اند متفورمین نمی‌تواند از اختلال ایجاد شده در یادگیری و حافظه موش‌های آلزامیری جلوگیری کند [۱۶]، و یا استفاده از متفورمین اختلالات شناختی را در بیماران دیابتی تشدید می‌کند [۲۴] و یا استفاده از متفورمین به‌تنهایی (بدون استفاده هم‌زمان از داروهای ضد دیابتی دیگر هم‌چون انسولین و سولفونیل اوره‌ها) به‌مدت طولانی (۷ سال) خطر ابتلا به آلزامیر را در انسان افزایش می‌دهد [۲۵] و نیز با نتایج محققینی که نشان داده‌اند استفاده از متفورمین به‌تنهایی میزان آمیلوئید بتا در محیط کشت‌های نورونی را افزایش می‌دهد [۱۵] مغایرت دارد. علت مغایرت نتایج ما با مورد اول می‌تواند به‌خاطر تفاوت در نژاد موش‌های مورد استفاده باشد. ما در تحقیقات مان از موش‌های صحرایی ویستار معمولی استفاده کردیم، ولی محققین بالا از موش‌های سوری چاق مقاوم به لپتین استفاده کرده‌اند [۱۶]. علت مغایرت نتایج ما با مورد دوم و سوم می‌تواند نوع مطالعه باشد. آنها تحقیقات خود را بر روی نمونه انسانی و به‌مدت طولانی انجام داده‌اند که عوامل کنترل نشده زیادی در نتایج آن تأثیرگذار است و دقت آن را کاهش می‌دهد. علت مغایرت نتایج ما با مورد آخر می‌تواند عدم وجود انسولین در محیط کشت در موقع اضافه کردن متفورمین باشد [۱۵]. مطالعات مختلف نشان داده است که متفورمین در حضور انسولین باعث کاهش میزان آمیلوئیدهای بتای مغز می‌شود [۱۷،۱۶]. نشان داده شده است که متفورمین به‌تنهایی تولید آمیلوئیدهای بتا را در محیط کشت نورونی افزایش می‌دهد و انسولین به‌تنهایی تولید آمیلوئیدهای بتا را کاهش می‌دهد و اضافه کردن متفورمین بعد از انسولین این کاهش را تشدید می‌کند [۱۵]. هم‌چنین، نشان داده شده است که تولید آمیلوئیدهای بتا در محیط کشت نورونی غنی از انسولین افزایش می‌یابد و این افزایش تولید به‌وسیله متفورمین کاهش می‌یابد [۱۷]. مطالعه‌ی بعدی نشان می‌دهد که تزریق متفورمین به موش‌های دیابتی که سطح انسولین پلاسمایی بالای دارند، میزان آمیلوئیدهای بتای مغز را کاهش می‌

ورود به قسمت تاریک و کل زمان گذرانده شده در محفظه روشن در گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین نسبت به گروه استرپتوزوسین به‌تنهایی می‌شود و برعکس کل زمان سپری شده در محفظه تاریک را در این گروه‌ها نسبت به گروه استرپتوزوسین کاهش می‌دهد.



نمودار شماره ۳- تأثیر متفورمین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوسین بر زمان گذرانده شده در ناحیه تاریک در آزمون به‌خاطر‌آوری در موش‌های مدل آلزامیری شده با استرپتوزوسین. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین نشان داده شده است. $P < 0.05^*$ و $P < 0.01^{**}$ تفاوت با گروه کنترل، $P < 0.05^{\#}$ تفاوت با گروه استرپتوزوسین.

یکی از نشانه‌های پاتولوژیک بیماری آلزامیر افزایش آمیلوئیدها بتا و پروتئین‌های تائوی فسفریله در مغز و کاهش میزان یادگیری و حافظه است [۵،۶]. در مطالعه ما مشخص شد که استرپتوزوسین از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز و ایجاد دیابت تیپ ۳ می‌تواند جنبه‌هایی از بیماری آلزامیر که کاهش یادگیری و حافظه می‌باشد را القاء کند. در تأیید نتایج ما مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که ۱۰ روز بعد از تزریق استرپتوزوسین به داخل بطن‌ها، جنبه‌هایی از بیماری آلزامیر از جمله افزایش فسفریلاسیون پروتئین‌های تائوی مغز و اختلال در یادگیری و حافظه ظاهر می‌شود [۲۱،۲۰،۱۳،۱۱،۱۰]. چنانچه نورون‌ها به‌مدت طولانی در معرض انسولین زیاد قرار گیرند انتقال ناقل گلوکز نوع GLUT4 از سیتوپلاسم به غشاء مختل شده، در نتیجه برداشت گلوکز به‌وسیله نورون‌های مغز مشکل شده و در نورون‌ها مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود و در نهایت علائم سلولی ملکولی بیماری آلزامیر هم‌چون افزایش پروتئین‌های تائوی فسفریله و آمیلوئیدهای بتا، ظاهر می‌شود [۲۲،۱۷]. در مطالعه ما مشخص شد که متفورمین به‌صورت وابسته به دوز ذخیره حافظه در موش‌های مدل آلزامیری شده با استرپتوزوسین را افزایش می‌دهد. در تأیید نتایج ما مطالعه‌های قبلی نشان داده است که متفورمین ضمن کاهش مقاومت نورون‌ها به انسولین می‌تواند از بروز علائم سلولی ملکولی بیماری

می‌کند [۲۸]. با توجه به نتایج کار ما و محققین اشاره شده در بالا می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که متفورمین در حضور انسولین کافی می‌تواند از طریق افزایش حساسیت نورون‌ها به انسولین باعث کاهش پروتئین‌های تائو و آمیلوئیدهای بتای مغز و افزایش محافظت از نورون‌ها در مقابل استرس‌های اکسیداتیو و پدیده آپوپتوز شود و در نهایت یادگیری و حافظه را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت استرپتوزوسین از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز می‌تواند جنبه‌های از بیماری آلزایمر که کاهش یادگیری و حافظه می‌باشد را القاء کند. هم-چنین، متفورمین می‌تواند یادگیری و حافظه موش‌های مدل آلزایمری شده با استرپتوزوسین را تا حدود زیادی بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

متفورمین مصرفی این تحقیق، ازسوی شرکت داروگستر رازی اهداء شده است. بدین‌وسیله، نویسندگان مراتب تشکر و سپاس خود را از دست اندرکاران شرکت مذکور اعلام می‌کنند.

References:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2004; 63(7): 1187-92.
- [5] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 741-66.
- [6] Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 2004; 23(1-2): 105-14.
- [7] Cherian B, Meka N, Katragadda S, Arora R. Therapeutic implications of diabetes in cardiovascular disease. *Am J Ther* 2009; 16(6): e51-9.
- [8] Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2005; 28(3): 726-35.

دهد [۱۶]. این نتایج با نتایج ما هم‌خوانی دارد؛ چراکه در حیواناتی که ما استفاده کردیم اگرچه 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 بنابراین تزریق متفورمین به آنها به کمک انسولین طبیعی بدن آنها باعث کاهش سطح بتا آمیلوئیدهای مغز و در نتیجه بهبود نسبی علائم آلزایمر آنها شده است؛ به‌همین دلیل، حافظه موش‌های مدل آلزایمری در گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین به‌صورت وابسته به دوز بهتر از موش‌های دریافت‌کننده استرپتوزوسین به‌تنهایی بود. یکی دیگر از نشانه‌های آلزایمر کاهش میزان نورون‌ها و سیناپس-های مغز می‌باشد [۲۶]. این خصیصه در مغز موش‌های دیابتی نوع ۲ نیز دیده می‌شود [۲۷]. مقدار پروتئین سیناپسی سیناپتوفیزین به-عنوان یکی از شاخص‌های تعداد نورون و سیناپس در مغز موش-های دیابتی شدیداً کاهش می‌یابد و متفورمین این کاهش را به حداقل می‌رساند [۱۶]. این یافته نشان می‌دهد که متفورمین علاوه بر کاهش سطح آمیلوئید بتای مغز، نورون‌ها را نیز محافظت می‌کند [۲۲، ۱۶]. درمان با متفورمین از فعال شدن واسطه‌های استرس اکسیداتیو و التهاب سلولی که منجر به آپوپتوز می‌شوند، جلوگیری

- [9] Steen E, Terry BM, Rivera EJ. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease: is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 2005; 7(1): 63-80.
- [10] Jolivald CG, Lee CA, Beiswenger KK, Smith JL, Orlov M, Torrance MA, et al. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* 2008; 86(15): 3265-74.
- [11] Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 2009; 150(12): 5294-301.
- [12] 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* 2009; 22(1): 246-60.
- [13] 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.
- [14] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346(6): 393-403.

- [15] 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* 2009; 106(10): 3907-12.
- [16] 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.
- [17] Gupta A, Bisht B, Dey CS. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology* 2011; 60(6): 910-20.
- [18] Rupinder K, Sodhi NS. All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. *Progress in Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry* 2013; 40: 38-46.
- [19] Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J Psychopharmacol* 2002; 16(4): 313-9.
- [20] Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GV, Jope RS. Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes* 2006; 55(12): 3320-5.
- [21] Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, et al. Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci* 2007b; 27(50): 13635-48.
- [22] Mayer CM, Belsham DD. Central insulin signaling is attenuated by long term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation, proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. *Endocrinology* 2010; 151: 75-84.
- [23] Yoon SY, Park JS, Choi JE, Choi JM, Lee WJ, Kim SW, et al. Rosiglitazone reduces tau phosphorylation via JNK inhibition in the hippocampus of rats with type 2 diabetes and tau transfected SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 2010; 40(2): 449-55.
- [24] Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H, et al. Increased Risk of Cognitive Impairment in Patients With Diabetes Is Associated With Metformin. *Diabetes Care* 2013; 36(10): 2981-7.
- [25] Rosenfeld JE. Metformin and Alzheimer's Disease Risk. *Am J Psychiatry* 2014; 171(1): 119.
- [26] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298(5594): 789-91.
- [27] Li ZG, Zhang W, Sima AA. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* 2007; 56(7): 1817-24.
- [28] El-Mir MY, Daille 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.