Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The acute and chronic effects of metformin on memory retrieval and hippocampal CA1 area intact neurons in streptozotocin-induced Alzheimeric male rats

Niloufar Darbandi*, Samira Moghadasi , Hamid Reza Momeni

Department of Biology, School of Science, Arak University, Arak, Iran.
*Corresponding author; E-mail: N-Darbandi@araku.ac.ir

Received: 6 December 2016 Accepted: 15 January 2017 First Published online: 13 December 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 December - 2019 January; 40(5):38-47

Abstract

Background: In this study, both acute and chronic therapeutic effects of metformin on memory retrieval and the number of intact neurons of hippocampal CA1 area in streptozotocin-induced Alzheimeric male rats were investigated.

Methods: 48 Male Wistar rats weighing 220-250 g were divided into six groups: control group (saline-saline), streptozotocin group (streptozotocine-saline), treated groups with streptozotocin plus metformin for once, one week, three weeks, and eleven weeks. ICV administration of STZ (3mg/kg) was down in the first and the third day of surgery and i.p injection of metformin (200mg/kg) or saline (ml/kg) daily starting one day before surgery to the end of care period. After the memory test, the animals were killed and their brains were fixed and density of intact neurons in the CA1 area of the hippocampus was investigated. Statistical analysis was performed with software SPSS, ANOVA and software Prisme.

Results: The ICV injections of STZ significantly reduced memory retention and the number of intact neurons compared to the control group (p<0/001). The use of metformin in once, one week and three weeks improved the effects of STZ (p<0/001). But metformin in eleven weeks treatment period don't have significant effect on memory retrieval and the number of intact neurons in hippocampal CA1 area compared to the STZ group (p>0/05).

Conclusion: Both acute and chronic metformin uses have different effects on memory retrieval and the number of intact hippocampal CA1 area neurons.

Keywords: Metformin, Streptozotocin, Memory, Hippocampus

How to cite this article: Darbandi N, Moghadasi S, Momeni H R. [The acute and chronic effects of metformin on memory retrieval and hippocampal CA1 area intact neurons in streptozotocin-induced Alzheimeric male rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 December - 2019 January;40(5):38-47. Persian.

© 2018 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات حاد و مزمن متفورمین بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون‌های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ در رت های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین

نیلوفر دربندی* ، **سمیرا مقدسی** ، **حمیدرضا مومنی**

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران
*نویسنده مسئول؛ ایمیل: N-Darbandi@araku.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۹/۲۲
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ آذر و دی؛ ۴۰(۵):۳۸-۴۷

چکیده

زمینه: در این پژوهش، اثرات متفورمین به دو صورت حاد و مزمن بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ در رت های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین بررسی شد.

روش کار: ۴۸ سر رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰-۲۵۰ گرم به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (سالین-سالین)، گروه استرپتوزوتوسین (استرپتوزوتوسین-سالین)، گروه‌های تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین به‌صورت یک نوبته، یک هفته، سه هفته و یازده هفته. تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) در روز اول و سوم پس از جراحی و تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) یا سالین (ml/kg) روزانه از یک روز قبل از جراحی تا پایان دوره تیمار انجام گرفت. پس از تست رفتاری، حیوانات کشته و مغز آنها فیکس شد و تعداد نورون‌های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ بررسی شد. آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS، ANOVA و نرم افزار Prisme انجام گرفت.

یافته ها: تزریق STZ به‌طور معناداری به‌خاطر آوری حافظه ($p<۰/۰۰۱$) و تعداد نورون‌های سالم ($p<۰/۰۰۱$) ناحیه CA1 را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. استفاده از متفورمین در تیمارهای یک‌نوبته، یک هفته و سه هفته اثرات ناشی از STZ را بهبود بخشید ($p<۰/۰۰۱$). اما متفورمین در دوره تیمار یازده هفته تاثیر معناداری بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ نداشت ($p>۰/۰۵$).

نتیجه گیری: مصرف حاد و مزمن متفورمین اثرات متفاوتی بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ دارد.

کلید واژه ها : متفورمین، استرپتوزوتوسین، حافظه، هیپوکامپ.

نحوه استناد به این مقاله: دربندی ن، مقدسی س، مومنی ح ر. مقایسه اثرات حاد و مزمن متفورمین بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون‌های سالم ناحیهCA1 هیپوکامپ در رت های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۵):۳۸-۴۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

بیماری آلزایمر همراه با کاهش حافظه، اختلال در حساسیت انسولین مغزی، اختلال در مصرف گلوکز و متابولیسم انرژی در انسان ایجاد می‌شود. این عوامل باعث ایجاد مقاومت انسولینی، التهاب و استرس اکسیداتیو می‌شود و به دنبال آن مرگ نورونی، ازبین رفتن اتصالات سیناپسی، ایجاد پلاک‌های آمیلوئیدی و کلافه‌های نوروفیبریلی رخ خواهد داد (۱). به نظر می‌رسد نواقص زیادی در علامت‌دهی انسولین در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر وجود داشته باشد که به کاهش مصرف گلوکز و متابولیسم انرژی منجرخواهد شد. همان‌طور که دیابت نوع دو با مقاومت محیطی انسولین مرتبط است، آلزایمر یا دیابت نوع سوم نیز با مقاومت مغزی انسولین مواجه است. در بیماری آلزایمر، برداشت ناکافی انسولین و علامت دهی ناقص در مغز نشانه‌ای از مقاومت به انسولین محسوب می‌شود (۲). انسولین متابولیسم پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا را در نورون‌ها تعدیل کرده و از تجمع آمیلوئید بتا در مغز جلوگیری می‌نماید. 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. در این بیماری هم‌چنین کاهش و پس رفت سلولی در نواحی مغزی به‌خصوص نواحی که برای یادگیری و حافظه مهم هستند از جمله هیپوکامپ و کورتکس پیش‌پیشانی(pre frontal) اتفاق می‌افتد که منجر به اشکالاتی در تفکر، قضاوت، هماهنگی‌های بینایی، احساس، تصمیم‌گیری و برنامه‌ریزی می‌شود. با افزایش سن احتمال دمانس مغزی هم افزایش می‌یابد (۳).

استرپتوزوتوسین دارای ساختار سمی (N-methyl-N-nitrosourea) است که به مولکول گلوکز متصل شده و توسط انتقال دهنده GLUT2 جذب می‌شود (۴). این ماده با افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygen species) سبب تشدید استرس اکسیداتیو در بعضی از نواحی مغز ازجمله هیپوکامپ می‌شود (۵). همچنین استرپتوزوتوسین از طریق تولید فرآورده‌هایی نظیر ۳-متیل آدنین و ۷-متیل گوانین منجر به متیلاسیون DNA می‌شود که از این طریق با آسیب به‌DNA، کاهش بیان پروتئین و کاهش ذخیره انرژی سلولی منجر به آپاپتوز نورونی می‌شود (۶).

متفورمین دارویی از خانواده‌ی Biguanide بوده و از گیاهی به نام Gallega Officinallis به‌دست می‌آید. این دارو در دیابت نوع II به تنهایی یا همراه با سایر داروهای خوراکی پایین آورنده قند خون و یا انسولین مورد استفاده قرار می‌گیرد. متفورمین از طریق کاهش برونده گلوکز و افزایش جذب گلوکز در بافت‌های محیطی و به‌طور عمده ماهیچه‌ها باعث کاهش سطح قند خون می‌شود. علاوه بر آن متفورمین دارای خواص آنتی اکسیدانی بوده و از طریق جلوگیری از تنفس میتوکندریایی از یک طرف تولید اکسیژن فعال را کاهش داده و از طرف دیگر با کاهش سطح ATP و فعال کردن مسیر کاتابولیک وابسته به (AMP- activated protein kinase) AMPK گلوکونئوژنز را کاهش می‌دهد (۷) و از این طریق منجر به حفاظت نورونی می‌شود. به همین سبب می‌تواند برای بهبود علائم بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد (۸).

با وجود اثرات حفاظت نورونی که برای متفورمین شناخته شده است، مصرف بلند مدت این دارو در برخی بیماران با خطر ابتلاء به اسیدوز لاکتیک همراه است. متفورمین با ممانعت از زنجیره تنفسی میتوکندریایی در سلول‌های کبدی لاکتات خون را افزایش می‌دهد. در افراد با نارسایی‌های کلیه‌ای متفورمین دفع نمی‌شود و به همین دلیل غلظت آن در بدن افزایش یافته و می‌تواند سطح بالاتری از لاکتات را در بدن تولید کند. بنابراین مصرف متفورمین در افراد مسن و یا افراد با نارسایی‌های کلیه‌ای، کبدی و ناراحتی‌های قلبی با خطر بالای اسیدوز لاکتیک همراه است. همین عامل می‌تواند باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو شود (۹).

با توجه به مطالب بالا و اثرات دوگانه‌ای که برای متفورمین گزارش شده است، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات تزریق حاد و مزمن متفورمین بر بازخوانی حافظه و تعداد نورون‌های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ در رت های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شد.

روش کار

در این مطالعه آزمایشگاهی پژوهشی اصیل از رت های نر نژاد ویستار (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. در راستای انجام این تحقیق کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفته شد. این حیوانات به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری و برای عادت کردن به محیط جدید حدود یک هفته قبل از شروع آزمایش، به حیوان‌خانه منتقل شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی۱۲ساعته (شروع روشنایی هفت صبح)، دمای۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود و آزمایش‌ها در زمان معینی از روز انجام می‌گرفت. هشت حیوان در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یکبار آزمایش می شد. تمامی آزمایشات بر پایه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی تایید شده توسط دانشگاه علوم پزشکی اراک صورت گرفت.

کتامین هیدروکلراید و زایلزین (ساخت شرکت Alfasan) به صورت درون صفاقی جهت بیهوش کردن حیوان مورد استفاده قرار گرفت. پودر استرپتوزوتوسین (ساخت شرکت سیگما- آمریکا) به صورت محلول در نرمال سالین با غلظت مشخص (۳mg/kg) به صورت درون بطن مغزی جهت القای آلزایمر به کار

برده شد. متفورمین (ساخت شرکت آریا دارو–تهران) به صورت محلول در نرمال سالین، با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به صورت تزریق درون صفاقی در دوره تیمارهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

جهت جراحی و کانول گذاری در ناحیه بطن‌های جانبی ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق درون صفاقی مخلوطی از کتامین (۵۰mg/kg) و زایلزین (۵mg/kg) بیهوش شد. مختصات بطن‌های جانبی بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۰) به دست آمد (۰/۸ به سمت عقب از برگما، ۱/۴ میلیمتر در طرفین شکاف ساژیتال و ۳/۵ میلیمتر به طرف پایین از سطح جمجمه). در سطح جمجمه محل کانول گذاری توسط مته دندانپزشکی تا پرده منتز سوراخ شد. کانول های راهنما به طول ۸ میلیمتر از سر سوزن ۲۲ گیج تهیه شده و به صورت دوطرفه در محل های سوراخ شده، حدود ۱ میلیمتر بالاتر از ناحیه مورد نظر به کمک آکریل دندانپزشکی ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما قبل از تزریق، سرسوزن های دندانپزشکی به شماره ۳۰ گیج که به اندازه طول کانول راهنما بریده می‌شد، در داخل آن قرار گرفت (۱۱).

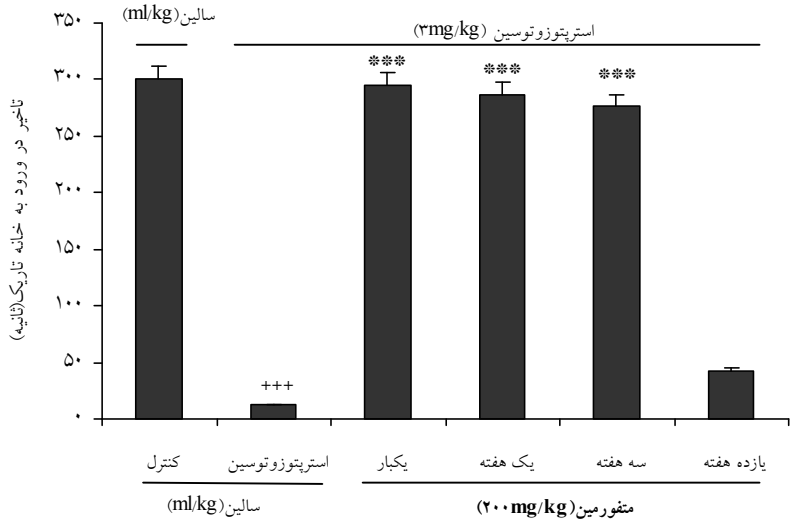
برای تزریق درون بطن مغزی دارو، حیوان به آرامی توسط دست گرفته شد. سر سوزن ۳۰ گیج از کانول راهنما خارج شده و به کمک سر سوزن دندانپزشکی ۲۷ گیج (که ۱ میلی متر بلندتر از کانول راهنما بریده شده بود)، رابط پلی اتیلن و سرنگ هامیلتون ۲۵ میکرولیتری تزریقات مرکزی انجام شد. تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی صورت گرفت. برای اطمینان از جذب کامل دارو از طریق کانول تزریق به داخل ناحیه مغزی موردنظر، کانول تزریق با تاخیر ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ای پس از تزریق خارج شد. در پایان آزمایش برای ارزیابی صحت عملیات و درستی مختصات محل جراحی و تزریق، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱درصد متیلن بلو به صورت دوطرفه تزریق شد، مغز حیوان از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱روز ثابت شد. برش‌گیری درناحیه تزریق و بررسی توزیع رنگ در فضای بطن‌های جانبی بیان‌گر میزان صحت کانول گذاری بود. داده های حیواناتی که محل کانول گذاری آن‌ها خارج از ناحیه بطن‌های جانبی بود از آنالیزها حذف شد. دستگاه سنجش حافظه ازجنس پلکسی گلاس (ساخت شرکت برج صنعت–تهران) و دارای دو سمت مجزا یکی به رنگ سیاه (۳۰×۲۰ ×۲۰ سانتیمتر) و دیگری به رنگ سفید (۳۰×۲۰×۲۰ سانتیمتر) است که توسط یک درب گیوتینی (۹×۷ سانتیمتر) واقع در دیواره میانی این دو بخش به یکدیگر راه دارند. در کف بخش سیاه رنگ میله های فلزی به قطر ۲/۵ میلیمتر و فواصل ۱ سانتیمتر از یکدیگر قرارگرفته است. هنگامی که دستگاه روشن می شود یک جریان الکتریکی به مدت ۳ ثانیه و شدت ۱ میلی آمپر در میله‌های فلزی برقرار می شود. یادگیری اجتنابی غیرفعال به روش "گذر از یک بخش دستگاه به بخش دیگر"(Step through) برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام می شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه می‌باشد، روز دوم یا روز آزمون شامل بررسی میزان حافظه حیوانات آموزش دیده است(۱۲).

در این تحقیق شش گروه از حیوانات در روزهای اول و سوم پس از جراحی به‌وسیله استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) و یا سالین به میزان۱۰ میکرولیتر در هر بطن تیمار شدند. همه حیوانات سالین(ml/kg) یا متفورمین (۲۰۰mg/kg) را به صورت درون صفاقی در دوره تیمارهای مختلف دریافت کردند. در پایان تیمار، حیوانات در دستگاه حافظه اجتنابی غیر فعال(Step Through) آموزش دیدند. ۲۴ ساعت بعد، آزمون حافظه انجام شد. پس از پایان آزمون رفتاری، پرفیوژن مغزی انجام شد. برای انجام این عمل از محلول پارافرمالدهید ۴۰ درصد جهت فیکس کردن مغز استفاده شد. پس از خارج نمودن مغز از جمجمه تمام مراحل پاساژ بافتی شامل قرارگیری نمونه‌ها در دستگاه پاساژ ، بلوک‌گیری، برش‌گیری توسط میکروتوم و رنگ آمیزی با کمک روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام و در نهایت نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت(۱۳).

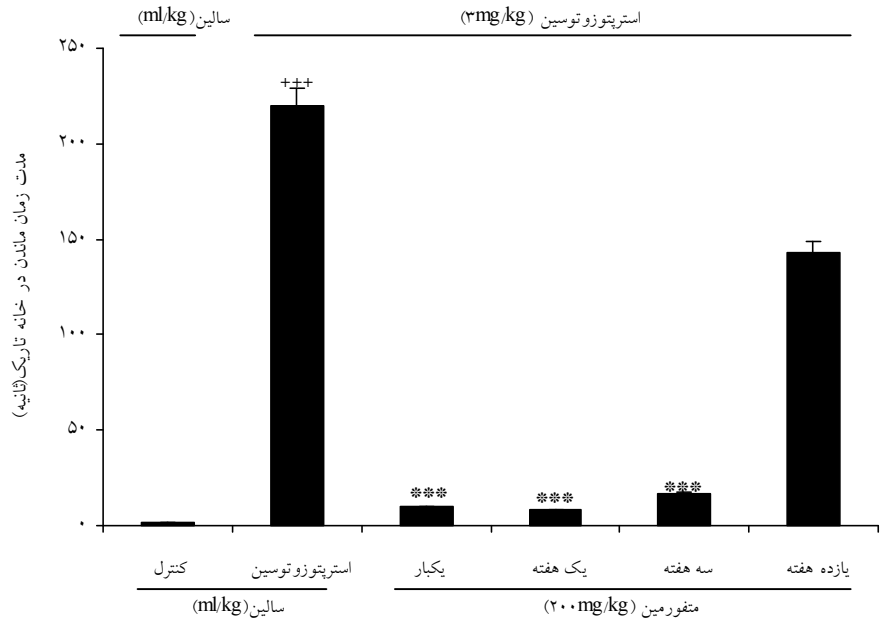
آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش‌های رفتاری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت و با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way Anova) و آزمون توکی (Tukey-test) سطح معنادار بودن آن ها تعیین شد. آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش‌های بافتی توسط نرم افزار Prisme و با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه صورت گرفت.

یافته ها

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های آزمون رفتاری نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg) در روزهای اول و سوم پس از جراحی، باعث کاهش زمان ورود به اتاق تاریک (STL) (نمودار۱) و هم‌چنین افزایش مجموع مدت زمان باقی ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) (نمودار۲) نسبت به گروه کنترل شد که به معنی تخریب حافظه است ($P<0/001$).



نمودار۱: مقایسه حافظه اجتنابی غیرفعال در گروه های آزمایشی. اندازه گیری میزان تاخیر در ورود به خانه تاریک (STL)

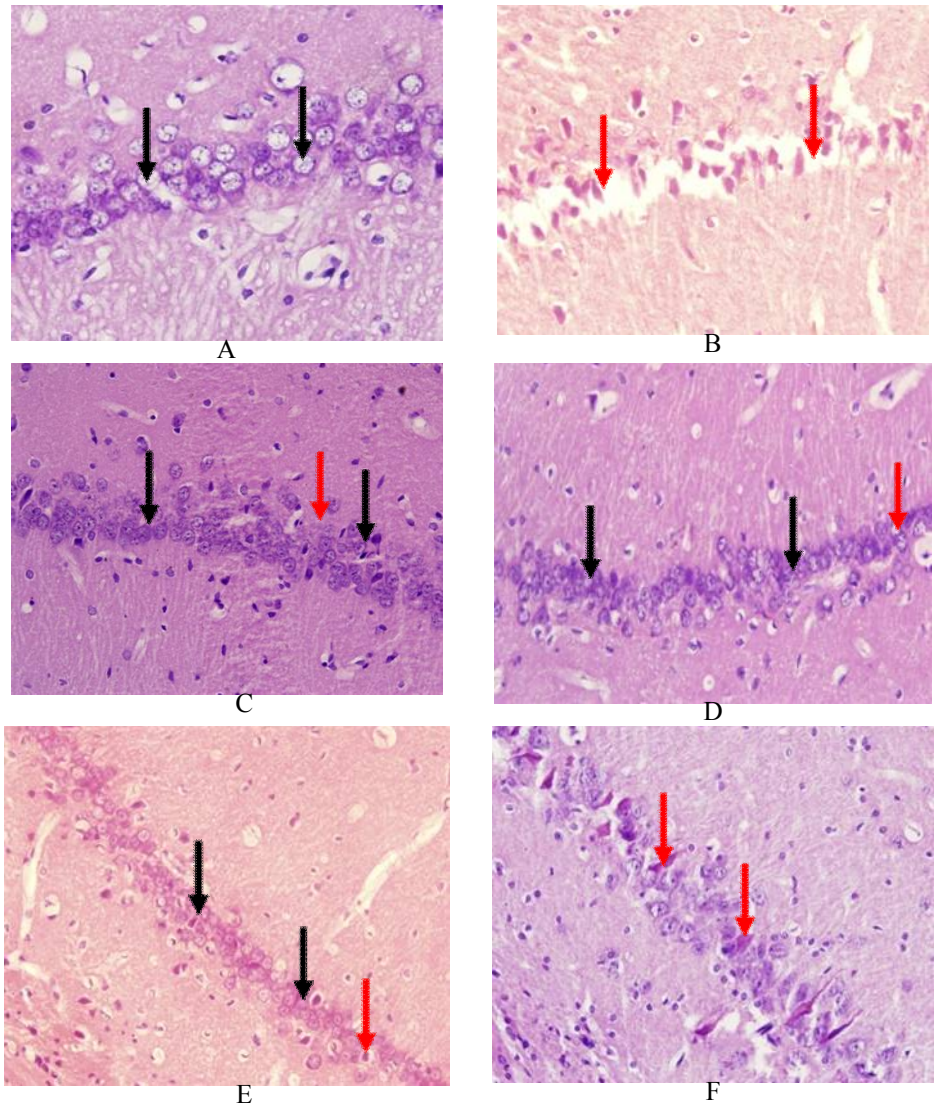


نمودار۲: مقایسه حافظه اجتنابی غیرفعال در گروه های آزمایشی. اندازه گیری مدت زمان ماندن حیوانات در قسمت تاریک (TDC) .

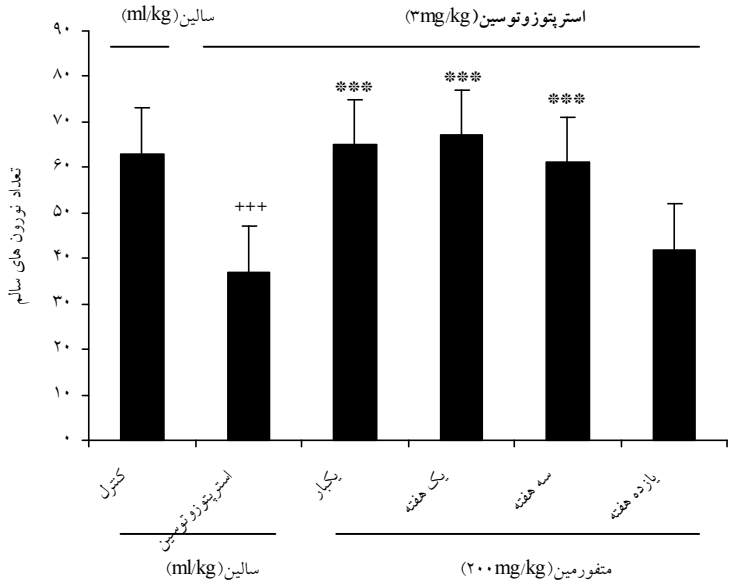
تجویز متفورمین (۲۰۰mg/kg) به‌صورت درون‌صفاقی در دروه تیمارهای مختلف به همراه تزریق استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg) به‌صورت درون‌مغزی در روز اول و سوم پس از جراحی، حافظه را با نسبت‌های مختلف در مقایسه با گروه STZ بهبود بخشید. آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی STZ به‌همراه متفورمین نشان داد که تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) یک‌بار پس از آموزش، همچنین تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت یک هفته و سه هفته منجر به بهبود به خاطرآوری حافظه نسبت به گروه STZ می‌شود ($p< ۰/۰۰۱$). اما تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت ۱۱هفته نتوانست به طور معناداری به خاطرآوری حافظه را نسبت به گروه STZ بهبود ببخشد ($p> ۰/۰۵$) (نمودار ۱). آزمون مکمل Tukey نشان می‌دهد که متفورمین در دوره تیمارهای یک‌بار، یک هفته و سه هفته به‌طور معناداری منجر به افزایش زمان STL نسبت به گروه STZ شده [($p< ۰/۰۰۱$)

و ۲۲/۸۷۹=(۳۶و۴)F]، همچنین مجموع زمان باقی ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) را به طور معناداری کاهش می دهد [(۰/۰۰۱ >p و ۸۶/۵۸۱=(۳۶و۴)F] (نمودار۲).

بررسی‌های بافتی برش‌های مغز به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین نشان داد نورون‌های موجود در مغز گروه کنترل کاملا سالم بوده و تراکم نورونی در ناحیه CA1هیپوکامپ آن‌ها زیاد است (شکلA-۱). در حالی‌که استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg) به طور معناداری منجر به مرگ نورنی در ناحیهCA1 هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل می شود (شکلB-۱). تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰ mg/kg) در دوره تیمارهای یک‌بار پس از آموزش(شکلC -۱)، یک هفته (شکلD-۱) و سه هفته (شکلE-۱) توانست نورون های ناحیهCA1 هیپوکامپ را در برابر آسیب استرپتوزوتوسین حفاظت کند. برش‌های بافتی در گروه تیمار شده با متفورمین به مدت ۱۱ هفته (شکلF-۱) تفاوت معناداری با گروه STZ نشان نداد (p>۰/۰۵).



شکل۱: مقایسه نورون‌های ناحیه CA۱ هیپوکامپ رنگ آمیزی شده به روش هماتوکسیلین-ائوزین در گروه های A) کنترل ، B) استرپتوزوتوسین و گروه های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) در دوره تیمارهای C) یکبار پس ازآموزش D) یک هفته، E) سه هفته و F) یازده هفته. (بزرگنمایی ۴۰۰ x). فلش‌های سیاه نشان‌دهنده نورون‌های سالم و فلش‌های قرمز نشان‌دهنده نورن‌های مرده است.



نمودار۳ : مقایسه تعداد نورون های سالم در ناحیه CA۱ هیپوکامپ در مغز گروه کنترل، گروه آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین و گروه های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین به‌همراه تیمار متفورمین (۲۰۰mg/kg) در طول تیمارهای مختلف.

بر اساس شمارش نورونی صورت گرفته در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده شد، تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین به طور معناداری (P<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (نمودار ۳). همچنین بر اساس داده های به دست آمده تیمار متفورمین به صورت یک‌نوبته، یک هفته و سه هفته به‌طور معناداری تعداد نورون های سالم را در مقایسه با گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین افزایش داد (p<۰/۰۰۱). در گروه تیمار شده با متفورمین به مدت ۱۱ هفته تفاوت معناداری در تعداد نورون های سالم در مقایسه با گروه STZ دیده نشد [F (۵و۲۳)=۱۹/۵۵۳ (p> ۰/۰۵)] (نمودار۳).

بحث

به منظور سنجش حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی از الگوهای رفتاری متعددی استفاده می‌شود. از این بین مدل یادگیری اجتنابی مهاری به‌صورت گسترده جهت بررسی حافظه بلندمدت در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴–۱۵).

داده‌های به‌دست آمده از آزمایشات رفتاری در بررسی حاضر نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی پس از ۲۱ روز در مقایسه با گروه کنترل زمان ورود به اتاق تاریک (STL) را کاهش و مجموع مدت زمان باقی ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) را افزایش می دهد که به معنی تخریب حافظه است. هم‌چنین بررسی‌های بافتی صورت گرفته در پایان دوره تیمار نشان داد که تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه STZ در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری کاهش یافته است. مطالعات گذشته نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می کنند (۱۶–۲۱).

تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین موجب بروز مقاومت انسولینی، کاهش میزان انرژی در دسترس سلول‌های عصبی و افزایش میزان گلوگز در مغز می‌گردد (۲۲). استرپتوزوتوسین با اثر بر سوبسترای گیرنده‌های انسولینی باعث کاهش فعالیت مسیر (phosphatidyl inositol 3- kinase) /Akt/PKB(Protein PI3K Kinase B) شده و از این طریق باعث کاهش فعالیت آنزیم GSK3β(glycogen synthase kinase 3β) می‌گردد. کاهش فعالیت این آنزیم به معنای افزایش تجمع پلاک‌های بتا آمیلوئیدی و افزایش پروتئین‌های تائو و کلافه‌های نوروفیبریلی است. تمام موارد فوق موجب پس‌رفت نورونی و از بین رفتن سیناپس‌ها خواهد شد (۶). استرپتوزوسین هم‌چنین سبب تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در بعضی از نواحی مغز از جمله هیپوکامپ می‌شود. استرس اکسیداتیو با طیف وسیعی از آسیب‌های بالینی مانند التهاب، ایسکمی، دیابت، آترواسکلروزیس، بیماری‌های نورودژنره و تشکیل تومور در ارتباط است (۵).

در پژوهش حاضر تجویز درون‌صفاقی متفورمین (mg/kg ۲۰۰) در دوره تیمارهای یک‌بار پس از آموزش، همچنین در دوره

تیمارهای یک هفته و سه هفته که از یک روز قبل از جراحی شروع شده بودند، توانست اثرات ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین را بر بازخوانی حافظه در مقایسه با گروه STZ به‌طور معناداری بهبود دهد. علاوه بر این بررسی‌های بافتی مغز در پایان دوره تیمارهای ذکر شده نیز نشان داد تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 در این گروه‌ها به‌طور معناداری نسبت به گروه STZ افزایش داشته و تقریبا معادل با گروه کنترل شده است. نتایج حاصل از پژوهش محققان دیگر نیز با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد (۱۹، ۲۳–۲۵).

به نظر می رسد متفورمین دارای خواص آنتی اکسیدانی است که به‌طور کامل مشخص نشده است. تحقیقات نشان می‌دهد که مقادیر بالای گلوکز خون با افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در ارتباط است. متفورمین از طریق جلوگیری از تنفس میتوکندریایی منجر به کاهش سطح اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. در این مسیر متفورمین از طریق کاهش سطح ATP، مسیر کاتابولیک وابسته به AMPK (AMP- activated protein kinase) را فعال کرده و از این طریق ساخت گلوکز از منابع جدید را کاهش می‌دهد (۷). در مسیر دیگر متفورمین با کاهش تولید فروکتوز ۱و۶– بیس فسفات از گلوکونئوژنز می کاهد. بررسی‌ها نشان می‌دهد متفورمین با اثر بر میزان فعالیت پروتئین کیناز C نیز قادر است سطح استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۸).

متفورمین با فعال کردن آدنوزین مونوفسفات پروتئین کیناز (AMPK) نقش مهمی در سیگنال‌دهی انسولین، تعادل انرژی کل بدن، متابولیسم گلوکز و چربی‌ها دارد. متفورمین قادر است با کاهش لیپوژنز، سطح سرمی لیپیدها را در خون کاهش داده و از این راه استرس اکسیدتیو را کاهش دهد. متفورمین با فعال کردن AMPK، فسفوریلاسیون استیل کوآکربوکسیلاز را مهار و سطح مالونیل کوآ که پیش‌ساز مهم ساخت اسیدهای چرب است را کاهش می‌دهد. از سوی دیگر متفورمین باعث فعال شدن لیپوپروتئین لیپاز شده و امکان تجزیه لیپوپروتئین VLDL به اسیدچرب را فراهم کرده و اکسیداسیون اسیدهای چرب را فراهم می‌کند (۲۶).

متفورمین سطح کلسترول خون را نیز کاهش می‌دهد. بالا بودن کلسترول نیز زمینه ساز استرس اکسیداتیو است. متفورمین از طریقAMPK، آنزیم سیتوزولی بیوسنتز کلسترول را فسفریله و مهار کرده، در نتیجه بیوسنتز کلسترول کاهش می‌یابد. هم‌چنین با کاهش بیوسنتز تری آسیل گلیسرول در کبد سطح تری گلیسرید را نیز کاهش می‌دهد (۲۷).

علاوه بر آن پژوهش حاضر نشان داد، تجویز درون‌صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت یازده هفته نتوانست اثرات ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین را بر بازخوانی حافظه در مقایسه باگروه STZ به‌طور معناداری بهبود دهد. در این دوره تیمار مدت زمان تاخیر حیوان برای ورود به اتاق تاریک نسبت به دیگر گروه‌های تیمار با متفورمین کاهش نشان داد. در بررسی‌های بافتی نیز در این گروه اختلاف معناداری در تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در مقایسه با گروه STZ دیده نشد.

مطالعات گذشته نتایج متفاوتی را در این خصوص نشان می‌دهد. در مطالعه ای تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) به مدت ۱۸ هفته در موش‌های مدل دیابتی شده با جلوگیری از کاهش سطح پروتئین سیناپتوفیزین تا حدی منجر به بهبود نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس شد (۱۱). در مطالعات صورت گرفته در جوندگان که در آن رژیم غذایی پر چرب مورد استفاده قرار گرفت، اضافه نمودن متفورمین به میزان ۱ درصد از وزن بدن به آب آشامیدنی حیوانات به مدت ۶ ماه تقریبا اثری بر میزان حافظه، یادگیری و توانایی‌های شناختی حیوانات نداشت در بررسی بالینی دیگری توسط این محقق نیز که در افراد دیابتی مصرف‌کننده متفورمین انجام شد، نتایج حاصل از آزمون‌های رفتاری و حافظه‌ای نسبت به گروه کنترل مقادیر کم‌تری را نشان داد (۲۸).

اگرچه متفورمین سال‌هاست به عنوان داروی پایین‌آورنده قند خون استفاده شده و دارای اثرات مفیدی است، اما چنانچه گفته شد خود می‌تواند زمینه ساز خطر اسیدوز لاکتیک باشد. در مصرف مزمن این دارو سطح لاکتات پلاسما افزایش یافته و به دنبال آن سطح استرس اکسیداتیو افزایش می یابد (۹). علاوه بر آن، مطالعات نشان داده است که در محیط کشت نورونی متفورمین به تنهایی تولید پروتئین بتا آمیلوئید را افزایش می دهد در حالی که انسولین به‌تنهایی تولید آن را کاهش می‌دهد. اضافه کردن متفورمین بعد از انسولین این کاهش را تشدید می‌کند. لذا متفورمین تنها در حضور سطح انسولین پایه کافی در بدن توانایی مقابله در برابر استرس اکسیداتیو را دارد. استرپتوزوتوسین با برهم زدن تعادل تولید انسولین و تشدید مقاومت انسولینی به صورت مزمن اثرات حفاظتی متفورمین را مختل می‌کند (۱۹).

با توجه به آنچه گفته شد به‌نظر می‌رسد که در تیمار حاد متفورمین این دارو قادر است از طریق کاهش تنفس میتوکندریایی و دارا بودن خاصیت کاهنده گلوکز خون، کاهش مقاومت انسولینی، هم‌چنین کاهش تولید رادیکال‌های آزاد از طریق کاهش سطح اسیدهای چرب و کلسترول، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و از مرگ نورونی جلوگیری نماید. در حالیکه مصرف مزمن متفورمین از طریق افزایش اسیدوز لاکتیک، استرس اکسیداتیو را افزایش داده و منجر به اختلال در عملکرد نورون‌ها و کاهش حافظه می‌شود. این حالت با برهم خوردن تعادل تولید انسولین و مقاومت انسولینی تشدید می‌گردد.

نتیجه گیری

متفورمین در مصرف کوتاه مدت با کاهش استرس اکسیداتیو باعث بهبود حافظه و افزایش تعداد نورون های سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ شده اما در مصرف طولانی مدت با ایجاد اسیدوز لاکتیک باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش مرگ نورونی می شود.

قدردانی

این تحقیق با کمک مالی دانشگاه اراک انجام شده است. همچنین از زحمات کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله بر گرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم سمیرا مقدسی به شماره ۲۳۳۳۸۹۰ می باشد.

References

1. Dela Monte S. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: Mini-review. *European Neuro psychopharmacology* 2014; **24**: 1954-1960. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.06.008
2. Butterfield D A, Domenico F, Barone E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: Akey role for oxidative stress in brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; **1842**: 1693-1706. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.010
3. Su Y, Wanga Q, Wang Ch, Chan K, Sun Y, Kuang H. The treatment of Alzheimers disease using Chinese Medicinal Plants: From disease models to potential clinical applications. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; **152**: 403-423. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.053
4. Eleazu C, Eleazu K, Chukwuma S, Essien U. Review of the mechanism of cell death resultingfrom streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential riskto humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2013; **12**: 60. doi: 10.1186/2251-6581-12-60
5. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes inperipheral and cerebral glucose metabolism on locomotoractivity, learning and memory in adult rats. *Brain Res* 1990; **532**: 95-100. doi: 10.1016/0006-8993(90)91747-5
6. Kamat P. Streptozotocin (ICV) induced neurotoxicity and brain insulin resistant: A therapeutic intervention for treatment of sporadicAlzheimer's disease (SAD) like pathology. *Article in Molecular Neurobiology* August 2015.
7. Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S, et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain, Behavior, and Immunity* 2014; **40**: 131-142. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.003
8. Rojas L B, Gomes M B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes .*Rojas and Gomes Dialectology & Metabolic Syndrome* 2013; **5**: 6.
9. DeFronzo R, Fleming A, Chen k. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolisms incisal and experimental* 2016; **65**: 20-29. doi: 10.1016/j.metabol.2016.05.014
10. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic*. 4th ed. San Diego, *Academic Press*. 1998; **21**. doi: 10.1016/b978-0-12-547620-1.50009-6
11. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacology Biochem Behave* 2012; **101**(4): 564-674. doi: 10.1016/j.pbb.2012.03.002
12. Zarrindast M R, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of intra hippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J Psychopharmacology* 2002; **16**(4): 313-319.
13. Liu J, Wang A, Li L, Huang Y, Xue P, Hao A. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium–pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure* 2010; **19**(3): 165-172. doi: 10.1016/j.seizure.2010.01.010
14. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast Access of Some Grape Pigments to the Brain. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(18): 7029-7034.
15. Wein S, Behm N, Petersen R K, Kristiansen K. Quercetin Enhances Adiponectin Secretion by a Ppar-Gamma Independent Mechanism. *Eur J Pharm Sci* 2010; **41**(1): 16-22. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.004
16. Vishwakarma S, Goyal R, Gupta V. GABAergic effect of valeric acid from Valeriana Wallachia in amelioration of ICV STZ induced dementia in rats. *Kanaya Lal Dhar Revista Brasileira de Farmacognosia* 2016. doi: 10.1016/j.bjp.2016.02.008
17. Khalili M, Kiasalari Z, Rahmati B, Narenjkar J. Behavioral and Histological Analysis of Crocus Statives Effect in Intracerebroventricular Streptozotocin Model of Alzheimer Disease in Rats. *Iranian Journal of Pathology* 2010; **5**(1): 27-33.

18. Mohammadzadeh E, Alipour F, Khallaghi B. Evaluation of Spatial Memory Impairment after Intracerebroventricular Streptozocin Injection in Adult Rat. *Shefa Neuroscience Research Center* 2014. doi: 10.18869/acadpub.shefa.2.1.40
19. Esmaeili M H, Mafe-Esmaeili M. The effect of metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin-induced rat model of alzheimer's disease. *Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2015; **19**: 1-7.
20. Beheshti S, Aghaie R. Therapeutic effect of frankincense in a rat model of Alzheimer's disease. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2016; **6**(4): 468-475. doi: 10.15171/jhp.2018.31
21. Bahramian A, Rastegar K, Namavar MR, Moosavi M. Insulin potentiates the therapeutic effect of meantime against central STZ-induced spatial learning and memory deficit. *Behavioral Brain Research* 2016; **311**: 247-254. doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.046
22. Rasoolijazi H, Joghataie M T, Roghani M, Nobakht M. The Beneficial Effect of Epigallocatechin-3-Gallate in an Experimental Model of Alzheimer's disease in Rat: A Behavioral Analysis. *Iran Biomed J* 2007; **11**(4): 237-243.
23. Lennox R, Porter D, Flatt P, Holscher C, Irwin N, Gault V. Comparison of the independent and combined effects of sub-chronic therapy with metformin and a stable GLP-1 receptor agonist on cognitive function. Hippocampal synaptic plasticity and metabolic control in high-fat fed mice. *Neuropharmacology* 2014; **86**: 22-30. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.026
24. Khallaghi B, Safarian F, Nasoohi S, Ahmadiani A, Dargahi L. Metformin-induced protection against oxidative stress is associated with AKT/mTOR restoration in PC12 cells. *Life Sciences* 2016; **148**: 286-292. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.024
25. Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Ebrahim-Habibi A, Komaki A. Neuroprotective effects of metformin against A-mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a high-fat diet. *Brain Research Bulletin* 2016; **121**: 178-185. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.02.005
26. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clinical Science 2012; 122(6): 253-270. doi: 10.1042/cs20110386
27. Rena G, Pearson E, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights. *Diabetologia* 2013; **56:** 1898-1906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0
28. Allard J S, Perezb E J, Fukuic K, Carpentera P, Ingrame D, Cabod R. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behavioral Brain Research* 2016; **301**: 1-9. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.012