

# تأثیر متفرمین بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های الزایمری مدل استرپتوزوتوسین

مریم خسروی<sup>۱</sup>، محمد حسین اسماعیلی<sup>۲</sup>، مهین مافی اسماعیلی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شمال

<sup>۲</sup> دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شمال

نشانی نویسنده مسؤل: گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دکتر محمد حسین اسماعیلی

E-mail: esmail66@yahoo.com

وصول: ۹۳/۲/۱۳، اصلاح: ۹۳/۲/۲۸، پذیرش: ۹۳/۳/۱۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری الزایمر، ارتباط نزدیکی با اختلال در سیگنالینگ انسولین مغز دارد. این بیماری، فرم خاصی از دیابت مغزی است که آن را «دیابت تیپ ۳» نامیده‌اند. از این رو، بررسی نقش عوامل دارویی که می‌توانند مقاومت به انسولین نورون‌ها را بهبود بخشند، در درمان الزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. متفرمین، یکی از داروهای است که به‌طور گسترده‌ای، بر ضد مقاومت انسولین محیطی استفاده می‌شود. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر درمانی متفرمین بر یادگیری و حافظه‌ی موش‌های الزایمری مدل استرپتوزوتوسین صورت گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ۵۶ موش نر ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) به ۷ گروه کنترل، شم، تحت تیمار با استرپتوزوتوسین، تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به‌همراه سالین و تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به‌همراه متفرمین (۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، از طریق تزریق درون صفاقی) تقسیم شدند. برای القای آلزایمر، استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌درون بطن‌های جانبی تزریق شد. تمام موش‌ها به‌کمک ماز آبی تحت آزمون یادگیری و حافظه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تزریق متفرمین، یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های الزایمری را به‌صورت وابسته به دوز بهبود می‌بخشد. به‌گونه‌ای که موش‌های تحت تیمار با متفرمین در زمان کمتر و با طی مسافت کمتر، سکوی نجات را پیدا کردند. متفرمین به‌صورت وابسته به دوز زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده در ناحیه‌ی هدف در تست، به‌خاطر آوری اطلاعات را در موش‌های الزایمری افزایش داد.

**نتیجه‌گیری:** تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین، باعث کاهش میزان یادگیری و حافظه‌ی فضایی می‌شود و پیش‌درمانی با متفرمین، می‌تواند یادگیری و حافظه را افزایش دهد و برای درمان الزایمر مفید باشد.

**واژه‌های کلیدی:** الزایمر، متفرمین، یادگیری، حافظه‌ی فضایی

## مقدمه

فعالیت‌های سمپاتیک، اعمال انسولین محیطی، حتی یادگیری، حافظه، تکثیر نورونی، اپیتوزیس و انتقالات سیناپسی را تنظیم می‌کند (۱، ۲، ۳). در این شرایط، هرگونه

انسولین، در مغز فرایندهای کلیدی زیادی از قبیل دریافت غذا، هوموستاز انرژی، اندوکرینولوژی تولید مثل،

فسفریله و آمیلوئید بتا، در مغز موش‌های دارای دیابت نوع ۲ افزایش می‌یابد (۱۳).

محققان نشان داده‌اند که مغز موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های نرمال، آمیلوئید بتای بیشتری دارد و هیپوکامپ موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل، میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله‌ی بیشتری دارد و تزریق درون صفاقی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفرمین به موش‌های دیابتی، افزایش میزان پروتئین تائوی فسفریله و غیرفسفریله را به حد اقل می‌رساند (۱۴).

متفرمین، داروی خوراکی کاهش‌دهنده‌ی قند خون است که امروزه از طرف اکثر محققان به عنوان خط اول درمان بیماری دیابت نوع ۲ مطرح می‌باشد (۱۵). گزارش شده که متفرمین، به عنوان یک محافظت‌کننده‌ی نورونی نیز می‌تواند عمل کند (۱۶). محققان مشاهده کردند که چنانچه نوروها را در محیط کشت به مدت طولانی در معرض انسولین قرار دهند، علاوه بر این که نسبت به انسولین مقاوم می‌شوند، نشانه‌های پاتولوژیک بیماری الزایمر را نیز از خود نشان می‌دهند و درمان با متفرمین، حساسیت به انسولین را در این نوروهای مقاوم به انسولین افزایش می‌دهد و همچنین از ظاهر شدن ویژگی‌های مولکولی و پاتولوژیکی بیماری الزایمر در آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۷). باتوجه به شواهد ارائه شده در بالا، چنین به نظر می‌رسد که داروی متفرمین، از طریق کاهش مقاومت به انسولین در مغز، بتواند در درمان الزایمر (دیابت تیپ ۳) موثر باشد. از این رو، در تحقیق پیش رو، سعی شده اثرات تزریق درون صفاقی متفرمین با دوزهای مختلف بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های الزایمری شده‌ی مدل استرپتوزوتوسین مورد ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی، در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه علوم

اختلال در متابولیسم انسولین در مغز، ممکن است اثرات نامطلوبی را بر جای بگذارد. بیماری الزایمر، شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو مغز در دنیا می‌باشد که با افزایش سن، خطر ابتلا به آن نیز افزایش می‌یابد. این بیماری، یک فرم زوال عقلی با علت نامعلوم است. در ۹۵ درصد از موارد، عامل اصلی شروع‌کننده این بیماری، تخریب آهسته‌ی سلول‌های مغز می‌باشد که منجر به اختلال در حافظه، تفکر، رفتار و نهایتاً مرگ می‌شود. تعداد مبتلایان به این بیماری در سال ۲۰۱۰، حدود ۳۵ میلیون نفر بوده‌اند اگر هیچ درمان پیشگیری‌کننده‌ای وجود نداشته‌باشد، هر ۲۰ سال این تعداد دو برابر خواهد شد (۴). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد انسولین و مکانیسم سیگنالینگ انسولین برای بقای نوروها مهم می‌باشند (۵، ۶). مطالعات، کاهش بیان گیرنده‌ی انسولین را در مغز افرادی که از بیماری الزایمر رنج می‌برند، نشان داده‌اند (۶). این دو موضوع، باعث جلب توجه محققان بسیاری به سمت تعیین و توصیف نقشی که اختلال عمل انسولین می‌تواند در بروز بیماری الزایمر داشته باشد، شده است (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

این رشد سریع مقالات که به ارتباط بین الزایمر و انسولین پرداخته‌اند، باعث توصیف بیماری الزایمر به عنوان "دیابت مغز" شده است. در حال حاضر، این موضوع که بیماری الزایمر با اختلال در سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز در مغز، مرتبط است، به طور گسترده‌ای به رسمیت شناخته شده است. به همین دلیل، پیشنهاد شده است که بیماری الزایمر، فرم خاصی از دیابت است و به همین جهت، نام دیابت «نوع ۳» را به آن داده‌اند (۱۲).

نشانه‌های پاتولوژیک بیماری الزایمر، ظاهر شدن پروتئین‌های تائو فسفریله شده‌ی داخل سلولی و پلاک آمیلوئیدی بتا خارج سلولی می‌باشد. آمیلوئیدهای بتا و پروتئین‌های تائو فسفریله شده، باعث مسموم شدن موضعی نوروها می‌شوند که نهایتاً منجر به مرگ نوروها و بروز بیماری الزایمر می‌شود. نشان داده شده که بیان تائوهای

پزشکی قزوین انجام شد. تعداد ۵۶ موش نر ویستار (تهیه شده از موسسه‌ی رازی) که وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم داشتند، در ۷ گروه (۸ موش در هر گروه) آزمایش شدند. موش‌ها، در ۶ قفس جداگانه در شرایط استاندارد از نظر دما ( $23 \pm 2$ ) درجه‌ی 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 طرفه‌ی استرپتوزوتوسین به درون بطن‌های طرفی به منظور ایجاد مدل آلزایمر (۲) تزریق درون صفاقی متفرمین به موش‌های آلزایمری شده توسط استرپتوزوتوسین به مدت ۱۰ روز (از ۴ روز به آزمون تا آخر آزمون، هر روز صبح ۲۰ دقیقه قبل از آزمون) (۳) آزمون رفتاری ماز آبی به مدت ۶ روز و آزمون به‌خاطر آوری اطلاعات به منظور ارزیابی حافظه‌ی موش‌ها در روز هفتم آزمون به منظور تعیین اثر متفرمین بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌ها به‌عنوان معیار ارزیابی بیماری آلزایمر. برای القای آلزایمر، ۱۰ میکرولیتر از محلول استرپتوزوتوسین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به وسیله‌ی جراحی استرئوتاکسیک به درون هر کدام از بطن‌های جانبی مغز با مختصات بر حسب برگما:  $-0.5 =$  قدامی خلفی،  $\pm 1.2 =$  جانبی نسبت به خط وسط،  $-3.2 =$  پشتی شکمی تزریق شد. در این جراحی، ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین/ زایلازین (۶/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) 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 نقطه‌ی برگما به‌عنوان 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 دوطرفه

به درون بطن‌های جانبی به آرامی تزریق شد. گروه‌های مورد آزمایش، به شرح ذیل بودند: (۱) گروه کنترل (۲) گروه شم (۳) گروه آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین که خود به ۵ زیرگروه‌ی مشروح ذیل تقسیم شدند (۱) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین (۲) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه سالین (ناقل متفرمین) که به مدت ۱۰ روز و روزی یک مرتبه نرمال سالین (۰/۲ میلی‌لیتر) به صورت درون صفاقی از ۴ روز قبل از شروع آزمون یادگیری و در طول آزمون یادگیری فضایی (۲۰ دقیقه قبل از آزمون) دریافت می‌کردند. (۳-۶) گروه‌های تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه متفرمین که به مدت ۱۰ روز و روزی یک مرتبه متفرمین (۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی) مشابه گروه سالین دریافت می‌کردند.

برای ارزیابی یادگیری و حافظه‌ی فضایی حیوان از ماز آبی موریس 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 که 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 آنالیز می‌گردد. حداکثر زمانی که حیوان جهت پیدا کردن سکو در اختیار دارد، ۶۰ ثانیه است. در صورتی که حیوان در طول این مدت، سکو را پیدا نکرد با دست به سمت سکو هدایت می‌شود و به مدت ۱۰ ثانیه روی آن قرار می‌گیرد تا با توجه به علائم نصب شده در آزمایشگاه، بتواند موقعیت سکو را به خاطر بسپارد. در صورتی که حیوان سکو را پیدا کند، همزمان با قرارگیری حیوان روی سکو، عمل ضبط دوربین متوقف می‌شود. این آزمایش، به مدت ۶ روز و هر روز ۴ بار با فاصله‌ی ۱۰ دقیقه تکرار می‌شود. در این مراحل، روند یادگیری حیوان بر اساس مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده و سرعت حرکت حیوان جهت یافتن سکو سنجیده می‌شود. در پایان روز ششم، پس

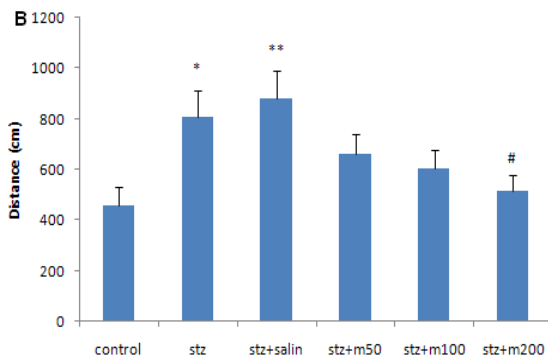
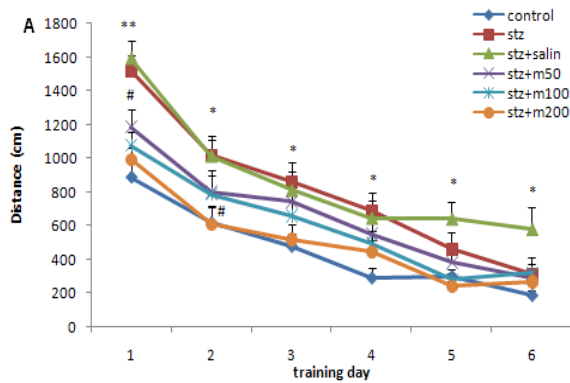
از تمام آزمایش‌ها، یک مرحله پروب انجام می‌شود. بدین صورت که پس از برداشتن سکو، حیوان از یکی از جهات درون ماز رها می‌شود. این آزمایش براین اساس است که با فرض این که حیوان محل سکو را به خاطر سپرده باشد، باز باید در بیشترین زمان و مسافت، در ربع محل قرارگیری سکوبماند. این مرحله برای هر حیوان یک-بار تکرار می‌شود که مدت آن، ۶۰ ثانیه است. 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 نیز سرعت حرکت حیوان جهت یافتن سکو در مدت ۶ روز یادگیری و همچنین برای بررسی حافظه‌ی مدت زمان حضور در ربع سکوی هدف و مسافت طی شده در ربع سکوی هدف در روز هفتم، بین گروه‌ها مقایسه شد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های تی مستقل، آنوای یک طرفه (و آزمون تعقیبی توکی) استفاده گردید.

## یافته‌ها

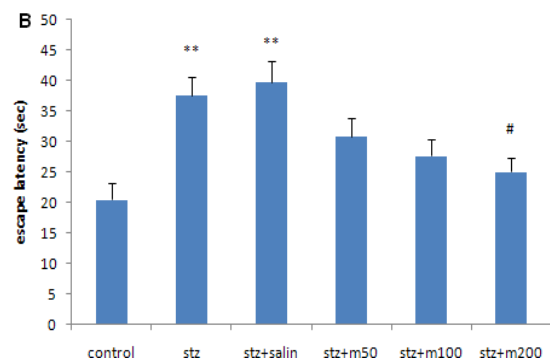
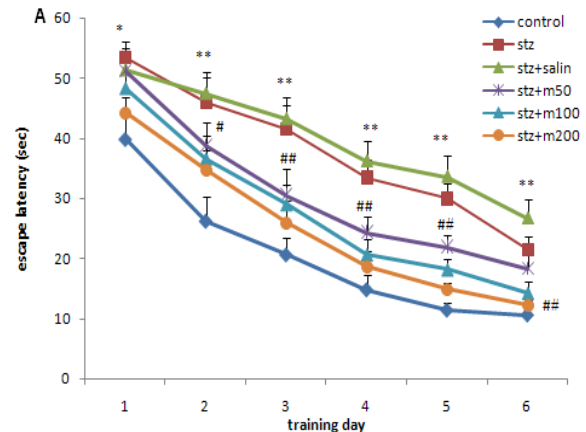
اثر متفرمین بر یادگیری فضایی موش‌های الزایمری چنین می‌باشد: در گروه کنترل، به تدریج که موش‌ها به روزهای آخر آزمون نزدیک می‌شدند مدت زمان لازم و مسافت طی شده جهت یافتن سکوی نجات زیر آب کاهش می‌یافت، ولی این دو پارامتر در گروه استرپتوزوتوسین، بیشتر بود. بین گروه کنترل و گروه شم در بررسی زمان لازم و مسافت طی شده جهت یافتن سکوی نجات، تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $p < 0/05$ ). به همین خاطر، در ادامه‌ی کار، کل گروه‌ها با گروه کنترل مقایسه شدند. بین گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین همراه با سالین نیز تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $p < 0/05$ ). به عبارت دیگر، تزریق سالین به-عنوان حلال متفرمین، تاثیری بر میزان یادگیری حیوانات الزایمری شده با استرپتوزوتوسین نداشت، ولی بین این دو گروه و گروه کنترل، اختلاف در تمام روزهای آموزش

معنادار بود ( $p < 0/01$ ). در تمام روزهای آموزش، موش‌های گروه استرپتوزوتوسین به همراه سالین دیرتر از موش‌های گروه کنترل و موش‌های گروه‌های استرپتوزوتوسین به-همراه متفرمین، سکوی نجات را پیدا کردند. در هیچ کدام از روزهای آزمون، اختلاف گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفرمین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه استرپتوزوتوسین به همراه سالین، معنادار نبود. اختلاف گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفرمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه استرپتوزوتوسین به همراه سالین در روزهای ۲ ( $p < 0/05$ )، ۳، ۴ و ۵ ( $p < 0/01$ ) آزمون معنادار بود. اختلاف گروه استرپتوزوتوسین به همراه متفرمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه استرپتوزوتوسین به همراه سالین در روزهای ۳ تا ۶ ( $p < 0/01$ ) آزمون معنادار بود. نمودار (۱).

در تمام روزهای آموزش، موش‌های گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین همراه با سالین مسافت، بیشتری برای رسیدن به سکوی نجات در مقایسه با موش‌های گروه کنترل و موش‌های گروه‌های استرپتوزوتوسین همراه با متفرمین طی کردند. اختلاف بین گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین همراه با سالین با گروه کنترل در تمام روزهای آموزش، معنادار بود ( $p < 0/05$ ). در هیچ کدام از روزهای آزمون، اختلاف گروه متفرمین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین همراه با سالین معنادار نبود. اختلاف گروه متفرمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه استرپتوزوتوسین همراه با سالین در روزهای اول تا سوم آزمون، معنادار بود ( $p < 0/05$ ). نمودار (۲). در ارتباط با پارامتر سرعت حرکت حیوانات جهت یافتن سکو، برعکس پارامترهای زمان و مسافت طی شده که به تدریج از روز اول تا روز ششم کاهش یافت، سرعت حرکت جهت رسیدن به سکو در تمام گروه‌ها افزایش یافت، ولی بین گروه‌ها اختلاف معناداری در این پارامتر مشاهده نشد.



نمودار ۲: منحنی یادگیری حیوانات در طی روزهای آموزش، A: مقایسه‌ی مسافت پیموده‌شده تا سکو بین گروه‌های مورد مطالعه، B: مقایسه‌ی میانگین کل مسافت پیموده‌شده برای رسیدن به سکو بین گروه‌ها در ۶ روز آموزش. ( $p < 0.05$ ) و ( $##p < 0.01$ ) اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه کنترل. ( $p < 0.05$ ) و ( $###p < 0.01$ ) اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه سالین+استرپتوزوتوسین.



نمودار ۱: منحنی یادگیری حیوانات در طی روزهای آموزش، A: مقایسه‌ی مدت زمان پیدا کردن سکو در گروه‌های مورد مطالعه، B: مقایسه‌ی میانگین کل مدت زمان پیدا کردن سکو بین گروه‌ها در ۶ روز آموزش. ( $p < 0.05$ ) و ( $##p < 0.01$ ) اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه کنترل. ( $p < 0.05$ ) و ( $###p < 0.01$ ) اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه سالین+استرپتوزوتوسین.

همراه با سالین اختلاف معناداری وجود ندارد، ولی بین این دو گروه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوتوسین همراه با متفرمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف معنادار است ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد که متفرمین به صورت وابسته به دوز، زمان سپری شده و مسافت طی شده در ناحیه‌ی هدف را در موش‌های الزایمری افزایش می‌دهد. نمودار (۳).

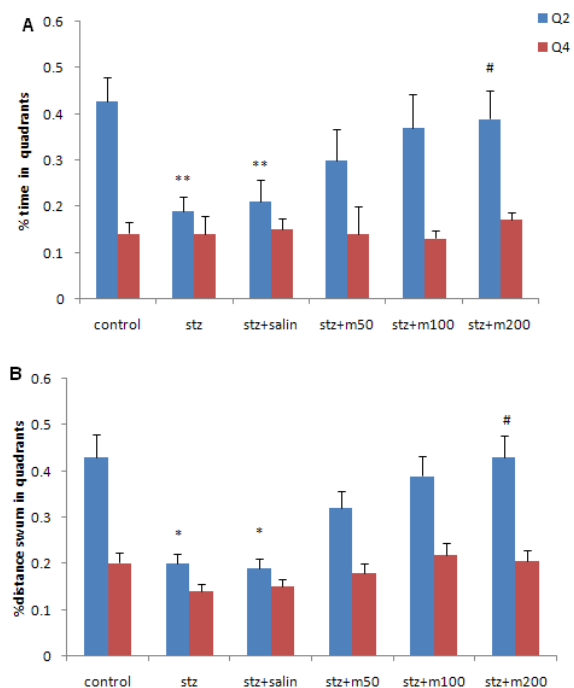
### بحث

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج ما نشان داد که متفرمین به صورت وابسته به دوز، تا حدود زیادی یادگیری و حافظه‌ی موش‌های الزایمری شده توسط تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین را بهبود می‌بخشد. از این نظر،

اثر متفرمین بر به‌خاطرآوری اطلاعات: نتایج نشان داد که گروه کنترل نسبت به گروه استرپتوزوتوسین مدت زمان بیشتر و مسافت بیشتری در ناحیه‌ی هدف طی می‌کنند. مقایسه‌ی درصد زمان سپری شده و مسافت طی شده در ناحیه‌ی هدف و ناحیه‌ی مقابل آن در بین گروه‌های آزمون، نشان داد که در پارامتر درصد زمان سپری شده در ناحیه‌ی هدف بین گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین همراه با سالین اختلاف معناداری وجود ندارد، ولی بین این دو گروه با گروه کنترل ( $p < 0.01$ ) و گروه استرپتوزوتوسین همراه با متفرمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف معنادار است ( $p < 0.05$ ) و در پارامتر درصد مسافت طی شده در ناحیه‌ی هدف بین گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین-

مدل‌های ایجاد بیماری الزایمر در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد (۲۳). در مطالعه‌ی ما نیز مشخص شد که استرپتوزوتوسین از طریق ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغز و ایجاد دیابت تیپ ۳ می‌تواند جنبه‌هایی از بیماری الزایمر را که موجب کاهش یادگیری و حافظه می‌باشند، القاء کند. جالب این‌که یافته‌های اخیر نشان‌دهنده‌اند که الیگومرهای بتا آمیلوئید، که به‌عنوان نوروتوکسین در بیماری الزایمر می‌باشند می‌توانند حذف‌کننده‌های انسولین از غشاء پلاسمای دندریت‌های نورون‌ها را تحریک‌کنند که این امر، منجر به ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌ها می‌شود (۲۴). تاکنون هیچ گزارشی در مورد اثرات متفرمین بر روند بیماری الزایمر به‌چاپ نرسیده است. ما در اینجا نشان دادیم که متفرمین برای درمان الزایمر، سودمند است. اخیراً نشان‌دهنده PPAR $\gamma$  که داروی مشابه متفرمین می‌باشد، می‌تواند مقاومت نورون‌ها به انسولین را که توسط بتا آمیلوئید ایجاد شده، برطرف کند (۲۵).

همچنین تحقیقات نشان‌دهنده که درمان با متفرمین از فعال‌شدن واسطه‌های مسیر استرس اکسیداتیو و التهاب سلولی که منجر به آپوپتوز می‌شود، جلوگیری می‌کند (۲۶). گزارش شده که استفاده از انسولین در محیط کشت، باعث کاهش سطح بتا آمیلوئید تولیدی در نورون‌ها می‌شود، در حالی‌که متفرمین از طریق یک مکانیسم وابسته به AMPK برعکس باعث افزایش سطح بتا آمیلوئید تولیدی می‌شود. اگرچه انسولین و متفرمین اثرات متضادی بر روی تولید بتا آمیلوئید از خود نشان‌دادند، ولی وقتی این دو باهم استفاده شدند، متفرمین اثرات انسولین در کاهش سطح بتا آمیلوئیدهای نورون‌ها را تشدید کرد. این موضوع نشان می‌دهد که متفرمین می‌تواند حساسیت نورون‌ها به انسولین را افزایش دهد (۱۵). این نتایج با نتایج ما هم‌خوانی دارد. چراکه در حیواناتی که ما استفاده کردیم، اگرچه استرپتوزوتوسین از طریق کاهش حساسیت نورون‌ها به انسولین، باعث ایجاد دیابت مغزی و الزایمر در آنها



نمودار ۳: اثرات تزریق داخل صفاقی متفرمین بر به‌خاطر آوری اطلاعات. A: میانگین  $\pm$  SEM درصد زمان گذرانده‌شده در ناحیه‌ی هدف (Q ۲) و مخالف (Q ۴). B: درصد مسافت طی‌شده در ناحیه‌ی هدف و مخالف بین گروه‌های مورد مطالعه. ( $p < 0.05$ ) و ( $p < 0.01$ ) (\*\*). اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه کنترل. ( $p < 0.05$ ) (#) و ( $p < 0.01$ ) (##) اختلاف معنادار گروه مربوط با گروه سالیین+استرپتوزوتوسین.

نتایج ما با نتایج محققانی که نشان‌دهنده‌اند متفرمین می‌تواند هم مقاومت به انسولین نورون‌های محیط کشت سلولی را که به‌صورت طولانی‌مدت در معرض سطح بالای انسولین قرار گرفته بودند و هم علائم سلولی ملکولی و پاتولوژیک ظاهر شده را در این نورون‌ها، کاهش دهد، هم‌خوانی دارد (۱۷، ۱۹). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان‌دهنده‌اند که بالا بودن انسولین خون، یکی از ریسک فاکتورهای ابتلا به الزایمر می‌باشد (۲۰، ۲۱، ۲۲). این مطالعات به‌طور غیر مستقیم، نقش مهم هیپر انسولینمی را در پاتوژنز بیماری الزایمر پشتیبانی می‌کنند. گروه دلامونته به‌تازگی نشان‌دهنده که القای مقاومت به انسولین در مغز به‌وسیله‌ی تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین، کافی است تا تعدادی از جنبه‌های مهم بیماری الزایمر را در حیوانات ایجاد کند و پیشنهاد کرده‌است که این روش یکی از بهترین روش‌ها و

به‌تنهایی بود.

### تقدیر و تشکر

متفرمین مصرفی این تحقیق، از سوی شرکت داروگستر رازی اهداء شده‌است. بدین‌وسیله، نویسندگان مراتب تشکر و سپاس خود را از دست‌اندرکاران شرکت مذکور اعلام می‌کنند.

شد، ولی انسولین بدن آنها در حد طبیعی بود و تزریق متفرمین به آنها به‌صورت وابسته به دوز، باعث افزایش حساسیت نورون‌های مغزشان به انسولین‌گردید و در نتیجه، علائم الزایمر آنها بهبود نسبی یافت. به‌همین دلیل، یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های الزایمری در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی متفرمین به‌صورت وابسته به دوز، بهتر از موش‌های دریافت‌کننده‌ی استرپتوزوتوسین

### References

1. Plum L, Schubert M, Bruning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005; 16(2): 59-65.
2. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol*, 2001; 177(1-2): 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(4): 205-21.
4. Roberts JS, Tersego SM. Estimating and disclosing the risk of developing Alzheimer's disease: challenges, controversies and future directions. *Future Neurol*, 2010; 5(4): 501-17.
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., Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer 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 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; 195-202.
13. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. 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.
14. 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.
15. Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, Thompson RC, Zhao Y, Smith L, Gasparini L, et al. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106(10): 3907-12.
16. El-Mir MY, Daille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, Fontaine E, Almeida A, Lervee X. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci*, 2008; 34(1): 77-87.
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. Sodhi RK, Singh N. All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013; 40: 38-46.

19. Kumar N, Dey CS, Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in 2C12 skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol*, 2003; 65(2): 249-57.
20. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, 2004; 63(7): 1187-92.
21. Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, Schwartz MW, Plymate S, Craft S. Insulin increases CSF Abeta42 levels in normal older adults. *Neurology*, 2003; 60(12): 1899-903.
22. Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, Hosoya K, Terasaki T. Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. *J Neurosci*, 2004; 24(43): 9632-7.
23. Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J*, 2008; 22(1): 246-60.
24. De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Ferreira ST, Klein WL. 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.
25. Ayasolla KR, Giri S, 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.



# The Effect of Metformin on spatial learning and memory in streptozotocin Rat Model of Alzheimer's Disease

**Maryam Khosravi**

Assistant professor of physiology Department of Biology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

**Mohammad Hossein Esmaeili**

Associate Professor of Medical Physiology, Department of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

**Mahine Mafe Esmaeili**

Student of physiology Department of Biology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

Received:03/05/2014, Revised:18/05/2014, Accepted:03/06/2014

---

## Corresponding Author:

Qazvin University of Medical Sciences,  
Qazvin, Iran Dr. Mohammad Hossein Esmaeili  
E-mail: esmail66@yahoo.com

## 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 so termed as "type 3 diabetes". Therefore investigating the role of pharmacological agents that can improve neuronal insulin resistance merit attention in treatment of AD. Metformin is one of the most widely used against peripheral insulin resistance. In present study, we aimed to investigate the therapeutic efficacy of metformin on spatial learning and memory of streptozotocin (STZ) Rat Model of AD.

**Materials and Methods:** 56 Female wistar rat (200-250gr) were divided into 6 groups (n=6): control, sham operated, STZ, STZ +Saline (0.2ml), STZ +Metformin (50,100,200mg/kg, i.p. for 10 day). For induction of AD, STZ (3 mg/kg,) were administered bilaterally into lateral ventricles. All rats were tested spatial learning and memory in the Morris water maze.

**Results :** our results show that pre-training injection of Metformin improves spatial learning and memory in STZ Rat Model of AD in a dose dependent manner, so that rats of Metformin groups found platform in less time and with less distance traveled, in comparison with STZ group. Metformin also increased the percentage of time elapsed and the distance swum in the target quadrant in STZ Rat Model of AD, in probe test.

**Conclusion:** An i.c.v. injection of STZ resulted in a significant decline in spatial learning and memory and pretreatment with Metformin can enhance spatial learning and memory. The results show that metformin as an insulin sensitizer against peripheral insulin resistance is useful for AD treatment.

**Keywords:** Metformin, learning, spatial memory