

بررسی اثر مکمل‌های روی و ملاتونین بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین

سید علیرضا طلائی^۱، دکتر مریم غلامی^۲، سعیده داوری^۳، دکتر مرجان قائمی^۴، دکتر محمود سلامی^۵

نویسنده‌ی مسؤل: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی salami-m@kaums.ac.ir

دریافت: ۹۱/۲/۴ پذیرش: ۹۱/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف: دیابت شیرین یک معضل پیچیده‌ی متابولیک است که باعث ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه‌ی فضایی می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مکمل‌های روی و ملاتونین بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی دیابتی بود.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی از ۵ گروه ۱۰ سری موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. گروه شاهد (C)، گروه موش‌های دیابتی با رژیم غذائی نرمال (D)، حیوانات دیابتی دریافت کننده‌ی روی (روزانه ۲۲۷ میلی گرم در لیتر آب آشامیدنی، D+Z)، موش‌های دیابتی دریافت کننده‌ی ملاتونین (روزانه ۱۵۰ میلی گرم در لیتر آب آشامیدنی، D+M) و موش‌های دیابتی دریافت کننده‌ی هر دو مکمل (D+ZM)، مصرف مکمل‌ها از ۵ روز قبل از القای دیابت (تک دوز ۶۰ میلی گرم به ازای وزن بدن استرپتوزوسین) شروع شد. ۲۰ روز بعد از القای، یادگیری فضایی به مدت ۵ روز (هر روز ۴ جلسه) در ماز آبی موریس سنجیده شد. در روز آخر نیز حافظه‌ی فضایی بررسی شد و میزان قند و انسولین سرم ارزیابی گردید.

یافته‌ها: موش‌های دیابتی در مقایسه با حیوانات کنترل، به‌منظور یافتن سکوی پنهان زمان بیشتری را در ماز سپری کرده، مسافت کمتری را نیز پیمودند ($P < 0.0001$). در مرحله‌ی پروب نیز آن‌ها زمان کمتری را در ربع هدف گذراندند ($P = 0.004$). مصرف همزمان مکمل‌ها مانع از ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: القای دیابت در موش‌های صحرایی باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی آن‌ها در ماز آبی موریس شده، مصرف مکمل‌های ملاتونین و روی با این اختلال مقابله می‌کند.

واژگان کلیدی: دیابت شیرین، استرپتوزوسین، یادگیری ماز، روی، ملاتونین، موش صحرایی

مقدمه

دیابت شیرین یک بیماری مزمن متابولیک است که در آن میزان قند خون افزایش می‌یابد و نیز کمبود مطلق (دیابت نوع ۱ یا وابسته به انسولین) یا نسبی انسولین (دیابت نوع ۲) وجود دارد (۱). هیپرگلیسمی باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بالاخص رادیکال هیدروکسیل شده که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی می‌شود (۲).

۱- دانشجوی دکترای تخصصی علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

۲- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

دیابت شود (۱۳). نشان داده شده است که ملاتونین، محصول اصلی مترشح از غده‌ی پینه آل به‌عنوان اهدا کننده‌ی الکترون نقش آنتی‌اکسیدانی دارد (۱۵) و می‌تواند آسیب‌های اکسیداتیو در موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین را به نحو موثری بهبود بخشد (۵). در یک مطالعه نشان داده شده است که مصرف طولانی مدت ملاتونین باعث کاهش هیپرلیپیدمی و هیپرانسولینمی در موش‌های دیابتی می‌شود (۱۶). با توجه به اینکه در افراد دیابتی استرس‌های اکسیداتیو منجر به ایجاد اختلال در عملکرد شناختی می‌شود، استفاده از آنتی‌اکسیدان منطقی به نظر می‌رسد و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای مشابه با تحقیق حاضر به انجام نرسیده است؛ این مطالعه به‌منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و روی بر اختلال ایجاد شده در عملکردهای شناختی موش‌های دیابتی با استفاده از ماز آبی موریس طراحی شد.

روش بررسی

حیوانات مورد آزمایش و نحوه‌ی نگهداری آن‌ها:

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه (دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 5 درصد، شرایط تاریکی روشنایی ۱۲-۱۲ ساعته) نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با بیانیه‌های کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان و نیز معاهده‌ی هلسینکی رعایت گردیدند.

گروه‌های آزمایش: گروه شاهد (C)، گروه موش‌های دیابتی با رژیم غذایی نرمال (D)، حیوانات دیابتی که مکمل روی (پودر سولفات روی ۷ آب، Merck, Germany) را روزانه با دوز ۲۲۷ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی دریافت می‌کردند (D+Z)، موش‌های دیابتی که مکمل ملاتونین (Sigma-Aldrich, MO; USA) را روزانه با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آب آشامیدنی دریافت می‌کردند (D+M) و

رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب‌های مستقیم به ماکرومولکول‌ها می‌شود؛ به علاوه رادیکال‌های اکسیژنی و نیتروژنی تعدادی از مسیرهای حساس به استرس سلولی را فعال نموده که نقش کلیدی در ایجاد عوارض تاخیری دیابت نوع ۱ و ۲ و مقاومت به انسولین ایفا می‌کنند (۳). اخیراً ثابت شده که در موش‌های دیابتی القا شده با استرپتوزوسین، مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی دچار اختلال می‌شود (۴) و نیز درمان‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پیش‌گیری از عوارض اکسیداتیو در دیابت شیرین دارد (۵). یکی از عوارض بلند مدت دیابت ایجاد اختلالات شناختی، اختلال در یادگیری و تثبیت حافظه است (۶). مالون و همکارانش بیان می‌دارند که هیپرگلیسمی باعث ایجاد اختلال در یادگیری فضایی در ماز آبی می‌شود (۷). همچنین، نشان داده شده است که القای دیابت در موش‌های جوان باعث مختل شدن یادگیری و تثبیت حافظه در ماز Y شکل می‌شود (۸). دانشمندان دیگر نیز به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافته‌اند (۹ و ۱۰). اخیراً تمایل به استفاده از یون‌های فلزی مثل وانادیوم، کبالت، منگنز، سلنیوم و بالاخص روی برای درمان هر دو نوع بیماری دیابت رو به افزایش است (۳). روی دومین عنصر کمیاب پس از آهن و چهارمین عنصر فلزی داخل سلولی است (۱۱). روی در بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها (مثل انسولین) نقش عملکردی و ساختاری دارد (۱۲). میزان عنصر روی در پانکراس افراد سالم دو برابر دیابتی‌ها است (۳). به طور کلی می‌توان گفت که در خون اکثر افراد مبتلا به دیابت، کمبود روی دیده می‌شود و متأسفانه دفع روی در ادرار آن‌ها نیز مشاهده می‌شود (۱۳). با توجه به اینکه روی آنتی‌اکسیدان بالقوه‌ای نیز می‌باشد، کمبود آن باعث بروز آسیب‌های اکسیداتیو در بدن می‌شود (۱۴). با در نظر گرفتن افزایش استرس اکسیداتیو در دیابت شیرین، (۴) و همچنین کاهش میزان روی سرم در دیابت، (۳) مکمل روی می‌تواند باعث اصلاح و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی در

موش‌های دیابتی دریافت کننده هر دو مکمل (D+ZM)، مصرف مکمل‌ها از ۵ روز قبل از القای دیابت با داروی استرپتوزوسین (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (۱۷) شروع شده و تا پایان مطالعات رفتاری (۲۵ روز بعد) ادامه یافت. برای تایید دیابتی بودن حیوانات، ۵ روز بعد از القای دیابت، میزان قند خون حیوانات کنترل شده و در صورتی که بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر بود، حیوانات دیابتی تلقی گردیده و در غیر این صورت از مطالعه حذف شدند.

تحقیقات رفتاری: بررسی روند یادگیری فضایی و تثبیت حافظه‌ی فضایی حیوانات مورد آزمایش ۲۰ روز بعد از القای دیابت و با استفاده از ماز آبی موریس صورت پذیرفت. به طور خلاصه روش کار بدین صورت بود که ماز آبی موریس یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۷۰ سانتی متر است که تقریباً نیمی از آن با آب پر می شد. ماز به طور فرضی به چهار قسمت مساوی تقسیم گردید و یک سکوی نجات با ارتفاع ۲۵ سانتی متر در یکی از چهار قسمت فرضی، حدود ۱ سانتی متر زیر سطح آب واقع گردید که از بیرون قابل دیدن نبود. ماز در اتفاقی قرار گرفت که در آن علایم فضایی مختلفی وجود داشت که در طول آزمایشات ثابت بوده، برای حیوان در ماز قابل دید بود. رفتار حیوانات پس از پایش و ضبط شدن با دوربین فیلمبرداری، توسط نرم افزار ردیاب ویرایش ۷ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج برای تعیین مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده توسط حیوان به منظور یافتن سکوی پنهان در ماز آنالیز گردید.

الف -مرحله‌ی یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه (شمال، جنوب، مشرق و مغرب) ماز در حالی که صورت آن به طرف دیواره‌ی ماز است، در آب رها می شود تا با توجه به اندازه‌ی ماز و نوع حیوان (موش صحرایی برای مدت ۹۰ ثانیه در آب شنا کند. اگر حیوان به طور اتفاقی سکوی پنهان در زیر آب را پیدا کند به او اجازه داده می شود تا به مدت ۱۵ ثانیه روی آن قرا گرفته و علایم

فضایی را به خاطر بسپارد؛ در غیر این صورت و با تمام شدن زمان شنا، توسط پژوهشگر به آرامی به سوی سکو هدایت شده و این مرحله تکرار می شود. پس از ۱۰ دقیقه و از یکی دیگر از جهت‌های فرضی ماز آزمایش تکرار می شود. در مجموع این مرحله از آزمایش به مدت ۵ روز و هر روز ۴ جلسه طول می کشد.

ب - مرحله‌ی بازخوانی یا پروب (Probe Trial): در این مرحله (با توجه به اینکه حیوان محل سکوی پنهان را می داند) سکو از ماز برداشته شده، آزمایش انجام می شود. آنچه در این مرحله دارای اهمیت است، مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده توسط حیوان در ربعی است که قبلاً سکو در آن وجود داشته است. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک بار انجام شده و مدت آن نیز ۹۰ ثانیه طول می کشد.

اندازه‌گیری قند و انسولین سرم: میزان قند خون حیوانات هر ۵ روز یکبار تا پایان آزمایشات با اخذ خون از کف پا و با استفاده از دستگاه چک قند خون دیجیتال (Exicheck, Iran) چک شد و میزان انسولین سرم آنها نیز در روز انتهایی آزمایش، پس از اخذ نمونه‌ی خون ورید دمی توسط کیت اندازه‌گیری انسولین سرم موش صحرایی (Cayman Chemicals; USA) و با استفاده از دستگاه الیزا (Synergy H4, Biotek; USA) اندازه‌گیری گردید.

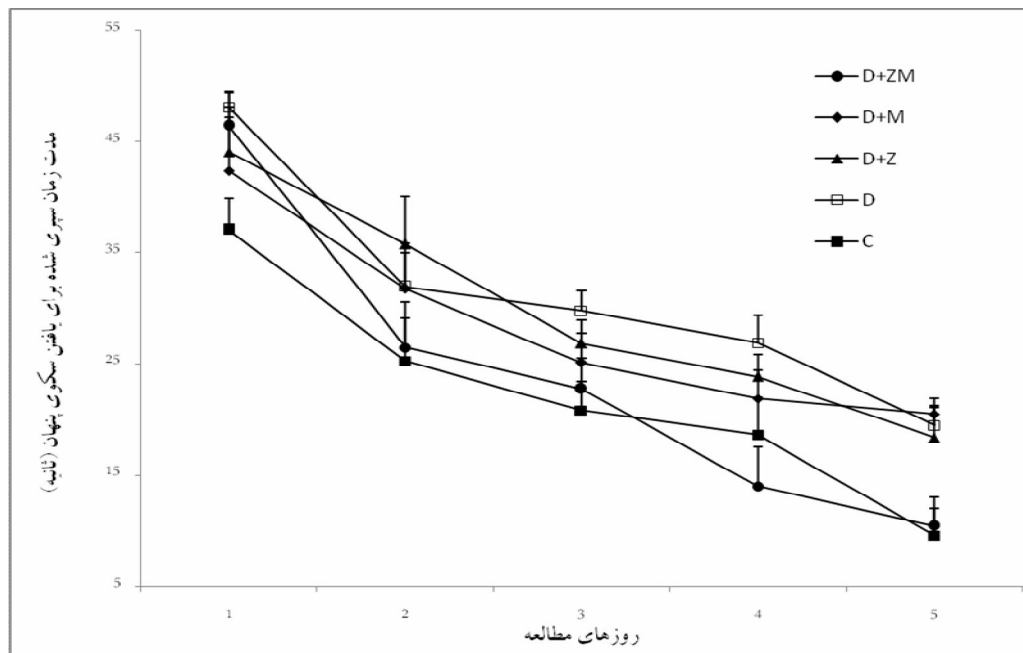
آنالیز داده‌ها: برای مقایسه‌ی داده‌های مربوط به مرحله‌ی یادگیری از آزمون Three-Way Repeated Measure ANOVA و نیز آزمون تعقیبی Bonferroni استفاده شد (۱۸). داده‌های مربوط به مرحله‌ی بررسی تثبیت حافظه و نیز میزان قند و انسولین سرم حیوانات، به وسیله‌ی آزمون Two-Way ANOVA و آزمون تعقیبی Bonferroni مقایسه شدند. مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

روند یادگیری موش‌های صحرایی: بررسی داده‌های

روی به مدت ۳۰ روز بر میزان زمان سپری شده (نمودار ۱) و نیز مسافت پیموده شده (اطلاعات نشان داده نشده‌اند) توسط حیوانات دیابتی بی‌تاثیر بوده و این در حالی است که دریافت هم‌زمان این دو مکمل باعث شده روند یادگیری این حیوانات به‌وضوح بهبود یابد؛ به‌گونه‌ای که این حیوانات در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه D، مدت زمان کمتری را در ماز سپری کرده و مسافت کمتری را پیموده‌اند ($P=0/002$ برای هر دو مقایسه). جالب آن‌که آزمون‌های آماری نشان داد در مقایسه‌ی داده‌های مربوط به زمان سپری شده و مسافت طی شده از دو گروه C و D+ZM اختلافی وجود نداشت؛ به بیان ساده‌تر پیش درمان و دریافت مکمل‌های ملاتونین و روی طی این بازه زمانی ۳۰ روزه باعث گردید تا اختلالی در روند یادگیری فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس ایجاد نشود.

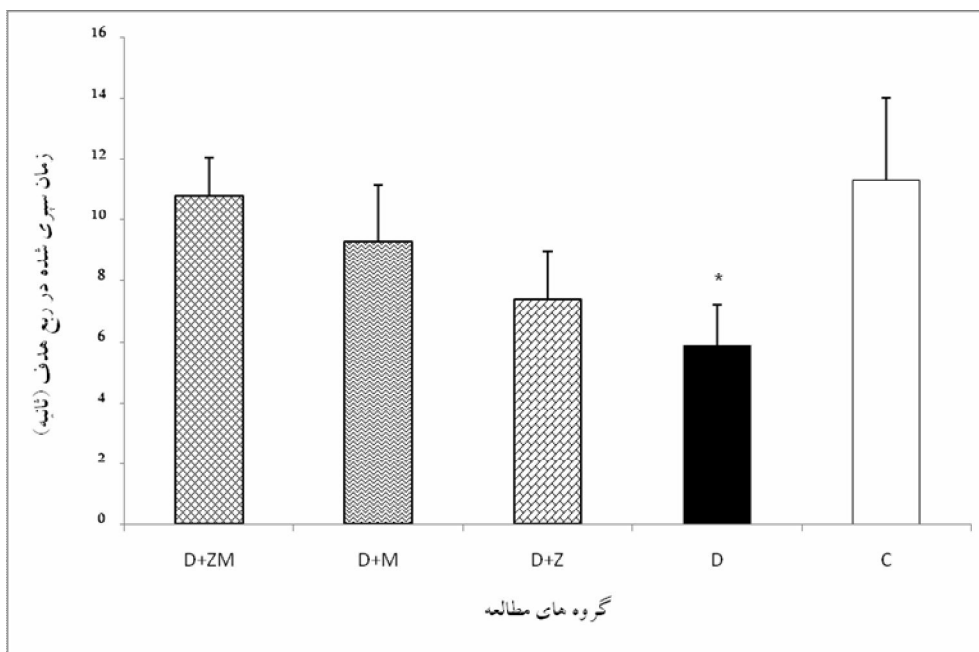
حاصل از مجموع ۲۰ جلسه آموزش حیوانات در ماز آبی موریس بیان‌گر این مطلب است که حیوانات مورد مطالعه به تدریج با استفاده از کلیدهای فضایی موجود در محل آزمایشگاه محل سکوی پنهان را شناخته و هم‌زمان با پیشرفت آزمایشات مدت زمان کمتری را صرف یافتن سکوی پنهان کرده و همچنین مسافت کمتری را می‌پیمایند. نتایج آزمون آماری بیان می‌دارد که اختلاف بین همه گروه‌های شرکت کننده در آزمایش از نظر مدت زمان سپری شده ($F_{4/195}=13/975$; $P<0/0001$) و مسافت پیموده شده معنی‌دار است ($F_{4/195}=15/282$; $P<0/0001$). با بررسی نتایج پس آزمون Bonferroni می‌توان دریافت که دیابت باعث شده است موش‌های صحرایی مدت زمان بیشتری را در ماز صرف یافتن سکوی پنهان نمایند ($P<0/0001$) و مسافت بیشتری را نیز بپیمایند ($P<0/0001$). به‌علاوه، مکمل‌های ملاتونین و



نمودار ۱؛ مدت زمان سپری شده در ماز به منظور یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات گروه‌های کنترل داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. اختلاف بین گروه‌های D و C ($P<0/0001$) و نیز D و D+ZM ($P=0/002$) معنی‌دار است. همچنین، اختلافی بین روند یادگیری حیوانات گروه C و D+ZM مشاهده نمی‌شود.

تثبیت حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی: بررسی میزان تثبیت حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی با انجام یک جلسه شنا در ماز آبی که سکوی پنهان آن برداشته شده بود، انجام گردید. نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که اختلاف بین گروه‌های مختلف آزمایش از نظر مدت زمان سپری شده در ربعی که قبلاً محل استقرار سکو بوده است ($F_{4/49}=11/778$; $P<0/0001$) و یا از نظر مسافت پیموده

شده در ربع مذکور ($F_{4/49}=7/415$; $P<0/0001$) معنی‌دار بود. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد، القای دیابت در موش‌های صحرایی باعث شد که این حیوانات در مقایسه با موش‌های کنترل مدت زمان کمتری (نمودار ۲) را در ربع هدف گذرانده، مسافت کمتری (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) را طی نمایند ($P=0/04$ برای هر دو مقایسه)؛ یعنی دیابت باعث تضعیف تثبیت حافظه‌ی فضایی در موش‌های صحرایی گردید.



نمودار ۲: مدت زمان سپری شده در ربع هدف توسط حیوانات گروه‌های مختلف مطالعه داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. *اختلاف بین دو گروه D و D+ZM معنی‌دار است ($P=0/0001$).

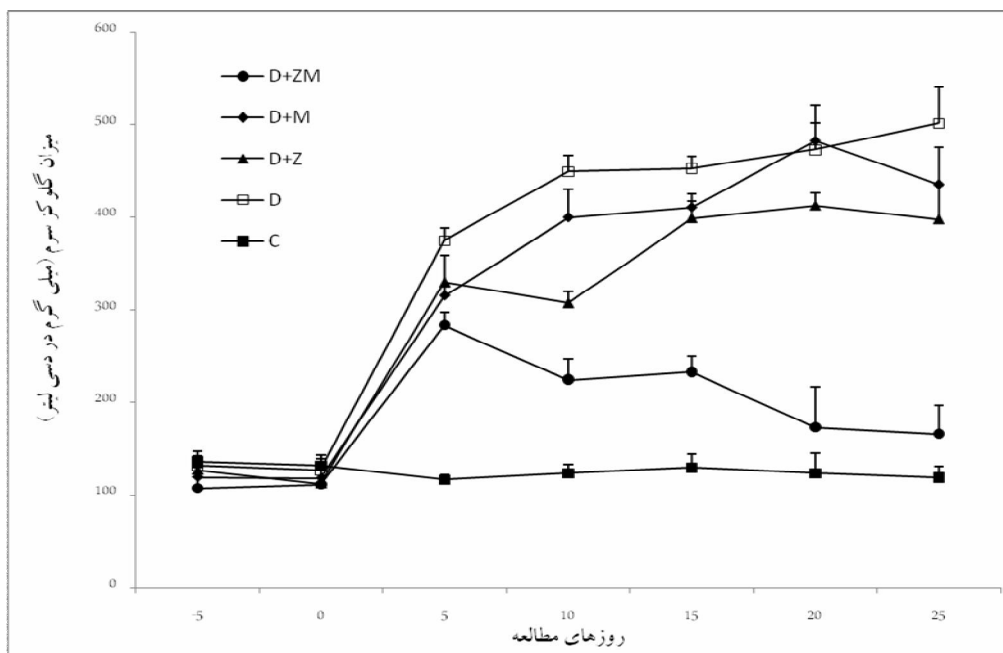
بررسی داده‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که دریافت مکمل‌های ملاتونین و روی به صورت جداگانه بر میزان تثبیت حافظه‌ی فضایی حیوانات دیابتی تاثیری نداشت. پیش درمان با هر دو مکمل و نیز ادامه دادن درمان با هر دو آن‌ها باعث می‌شود که این حیوانات در مقایسه با موش‌های صحرایی دیابتی کنترل مدت زمان بیشتری ($P=0/0001$) را در ربع هدف گذرانده، مسافت بیشتری ($P=0/03$) را در آن طی

کنند. نکته‌ی جالب اینکه اختلاف مشاهده شده بین داده‌های دو گروه D+ZM و C معنی‌دار نبود.

میزان قند و انسولین سرم حیوانات: میزان قند خون حیوانات گروه‌های مختلف طی ۷ مرحله با فاصله‌ی ۵ روز و پس از ۱۴ ساعت ناشتایی چک گردید. نتایج آزمون آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر نشان داد که اختلاف مشاهده شده در میزان قند سرم موش‌های صحرایی در گروه‌های

افزایش قند خون حیوانات دیابتی نداشته است. با این همه، زمانی که این دو مکمل به صورت همزمان دریافت می شوند از روز پنجم بعد از القای دیابت، میزان قند خون موش های صحرایی روند نزولی به خود می گیرد؛ به نحوی که اختلاف بین این گروه و گروه D معنی دار می شود ($P=0/001$). اگرچه میزان قند خون حیوانات دیابتی دریافت کننده هر دو مکمل در پایان آزمایشات به $165/48 \pm 21/17$ میلی گرم در دسی لیتر رسید ولی هنوز بالاتر از میانگین قند خون حیوانات کنترل در روز انتهایی آزمایش ($119/39 \pm 11/97$ میلی گرم در دسی لیتر) بود ($P=0/02$). در پایان آزمایشات به منظور بررسی میزان انسولین سرم و تاثیر دریافت مکمل های دریافتی بر آن از گروه های مختلف مطالعه ی خون گیری به عمل آمد.

مختلف معنی دار بود ($F_{4/195}=46/937$; $P<0/0001$). با مرور نمودار ۳ می توان دریافت که القای دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوسین (روز صفر) باعث بالارفتن سریع قند خون در همه گروه های دیابتی طی ۵ روز بعدی آزمایش می شود. در گروه D میانگین قند خون از $127/53 \pm 14/93$ میلی گرم در دسی لیتر در روز القای دیابت به $374/87 \pm 13/64$ میلی گرم در دسی لیتر در روز پنجم بعد از القای رسید. میزان قند سرم در ۳ گروه D، D+Z و D+M طی ۲۰ روز بعدی به روند صعودی خود ادامه داد؛ هرچند نتایج مربوط به پس آزمون Bonferroni بیان گر این مطلب بود که اختلاف بین این سه گروه معنی دار نیست؛ به عبارت دیگر دریافت مکمل های ملاتونین و روی به تنهایی تاثیری بر روند صعودی



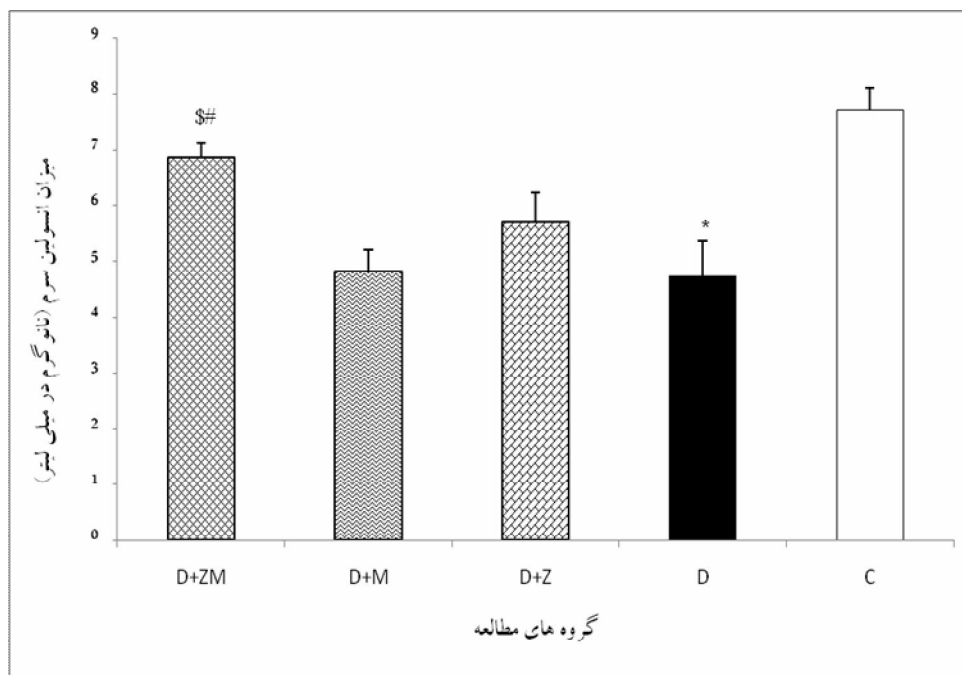
نمودار ۳. میزان قند خون در گروه های مختلف مطالعه داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده اند. اختلاف بین گروه های D و D+ZM معنی دار است ($P=0/001$).

سرم در موش های گروه کنترل $7/79 \pm 0/39$ نانوگرم در میلی لیتر بود و القای دیابت در این حیوانات باعث شده بود که این میزان به $4/73 \pm 0/64$ نانوگرم در میلی لیتر کاهش یابد

نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه بیان گر این مطلب است که اختلاف بین گروه های مختلف آزمایش معنی دار است ($F_{4/49}=1/536$; $P<0/0001$). میزان انسولین

(نمودار ۴)؛ نتایج پس آزمون Bonferroni حاکی از معنی‌دار بودن این اختلاف بود ($P=0/002$). اگرچه دریافت مکمل‌های روی و ملاتونین به تنهایی نتوانسته بر میزان انسولین سرم موش‌های دیابتی موثر واقع شود، اما دریافت هم‌زمان این دو مکمل انسولین سرم این حیوانات را تا $6/87 \pm 0/25$ نانوگرم

در میلی‌لیتر افزایش داده بود، هرچند میانگین انسولین سرم این موش‌ها به میانگین موش‌های گروه کنترل نرسیده بود. پس آزمون آماری نشان داد اختلاف مشاهده شده بین گروه D+ZM و D و نیز اختلاف D+ZM و C معنی‌دار بود (به ترتیب $P=0/002$ و $P=0/04$).



نمودار ۴: میزان انسولین سرم در گروه‌های مختلف مطالعه داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.
 * اختلاف بین گروه‌های D و C ($P=0/002$). # اختلاف بین گروه‌های D و D+ZM ($P=0/002$).
 \$ اختلاف بین گروه‌های C و D+ZM ($P=0/04$).

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که اگرچه پیش درمان و دریافت مکمل‌های ملاتونین و روی به تنهایی تاثیری بر میزان قند و انسولین سرم موش‌ها نداشت، اما دریافت هم‌زمان این دو مکمل به وضوح مانع بالارفتن قند خون و نیز کاهش انسولین سرم در حیوانات دیابتی شد. القای دیابت باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی حیوانات مورد مطالعه شد و دریافت مکمل‌ها به‌طور هم‌زمان با این اختلال مقابله کرد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که دریافت

مکمل‌های روی و ملاتونین بر میزان قند و انسولین سرم حیوانات دیابتی تاثیری ندارد و تنها زمانی که هر دوی این مکمل‌ها باهم مصرف شوند، اثر واضح کاهش‌دهی قند خون و افزایش انسولین سرم آن‌ها در موش‌های دیابتی قابل مشاهده است. آداچی و همکارانش آثار ضد دیابت کمپلکس روی را با استفاده از موش‌های سوری ترانس ژنیک (KKA^y) - یک مدل استاندارد دیابت نوع ۲ و چاقی مفرط بررسی کردند (۱۹). آن‌ها بیان می‌دارند که دریافت ۲۸ روزه این کمپلکس روی باعث نرمال شدن میزان قند و انسولین سرم

موش‌های سوری می‌شود. نتایج یک مطالعه‌ی دیگر نیز نشان می‌دهد که دریافت ۳۰ و ۴۵ روزه دو کمپلکس دیگر از روی به وضوح باعث کاهش میزان قند و انسولین سرم موش‌های GK یک مدل ترانس ژنیک دیابت تیپ ۲ می‌شود (۲۰). علت اختلاف نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما با مطالعات ذکر شده می‌تواند در این موارد باشد که اولاً در تحقیق حاضر از مدل حیوانی تیپ ۱ دیابت استفاده شد و در مطالعات مذکور از مدل ترانس ژنیک تیپ ۲ استفاده شده است و ثانیاً مشخص شده است که کمپلکس کردن روی با برخی مولکول‌های آلی فراهمی زیستی این مولکول را تا حدود زیادی بالا می‌برد (۲۰). علاوه بر آثار آنتی‌اکسیدانی که ملاتونین از خود بروز می‌دهد، امروزه ثابت گردیده است که این هورمون از طریق اتصال به گیرنده‌های MT_1 و MT_2 موجود در جزایر لانگرهانس باعث افزایش ترشح انسولین می‌شود (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر مشخص گردید که دریافت هم‌زمان ملاتونین و روی از ۵ روز قبل از القای دیابت تا ۲۵ روز بعد از القای به‌وضوح با هیپرگلیسمی ناشی از تخریب سلول‌های بتا و کاهش ترشح انسولین مقابله می‌کند. آندرسون و همکارانش نشان داده‌اند که دریافت یک دوز بالای ملاتونین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) ۳۰ دقیقه قبل از دریافت استرپتوزوسین، مانع از القای دیابت توسط این دارو در موش‌های سوری می‌شود (۲۲). نتایج یک مطالعه‌ی دیگر نیز بیان می‌دارد دریافت درون صفاقی تک دوز ۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین، یک ساعت قبل از تزریق استرپتوزوسین، از بالا رفتن قند خون این حیوانات طی ۷۲ ساعت بعدی جلوگیری می‌کند (۲۳). شاید علت بی‌تاثیر بودن استفاده از ملاتونین به تنهایی بر پارامترهای مذکور در مطالعه ما استفاده از دوز اندک ملاتونین باشد. مجموعه‌ی اختلالات موجود در دیابت اعم از افزایش فشار خون، اختلال در متابولیسم هورمون‌ها، افزایش پروفایل لیپیدی سرم و بیماری‌های قلبی عروقی دست‌به‌دست هم داده و منجر به

ایجاد اختلال در عملکرد شناختی افراد دیابتی می‌شود (۶). نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که کاهش عملکرد شناختی در انسان‌ها (۲۴) و نیز حیوانات آزمایشگاهی (۸ و ۱۰) هم‌زمان با پیشرفت بیماری دیابت افزایش می‌یابد. بررسی اطلاعات حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد القا کردن دیابت در موش‌های صحرایی باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی آن‌ها در ماز آبی موریس گردید. مالون و همکارانش بیان می‌دارند که هیپرگلیسمی مزمن باعث کاهش اندازه‌ی نورون‌ها در مغز موش صحرایی شده و علاوه بر آن باعث کاهش حافظه‌ی فضایی می‌شود (۷). در تأیید نتایج حاضر، گفته شده است که دیابت باعث ایجاد اختلال در یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی در ماز آبی موریس می‌شود (۲۵). کاهش بیان RNA پیامبر مولکول نیتریک اکساید در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش صحرایی دیابتی و نیز کاهش تشکیل حافظه‌ی دراز مدت در این ناحیه از مغز نشان داده شده است (۲۶). بیان شده است که تغییر در بیان و توزیع پروتئین‌های سیناپسی مثل سیناپتوفیزین و پروتئین وابسته به میکروتوبول ۲ در نواحی CA1، CA3 و شکنج دندان‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی، علت ایجاد اختلال در تشکیل و تثبیت حافظه است (۲۷). اگرچه تأکید اکثر مطالعات بر این نکته است که مزمن شدن بیماری دیابت باعث بروز عوارض عصبی، بالانقص اختلالات شناختی می‌گردد، ولی ایوای و همکارانش تأکید کرده‌اند که القای دیابت در موش‌های صحرایی ۱۷ روزه نیز باعث کاهش یادگیری فضایی آن‌ها در ماز Y شکل شده، به‌علاوه پلاستیسیته سیناپسی آن‌ها نیز دست‌خوش نقصان می‌شود (۸). نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد که پیش درمان و دریافت مکمل‌های ملاتونین و روی طی یک دوره‌ی ۳۰ روزه باعث بهبود عملکرد یادگیرانه و تثبیت حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی دیابتیک در ماز موریس شده، عملکرد آن‌ها را تا

صحرائی باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی آن‌ها در ماز آبی موریس شده، پیش درمان با مکمل‌های ملاتونین و روی با این اختلال مقابله می‌کند. علت این امر می‌تواند کاهش میزان گلوکز سرم و افزایش ترشح انسولین و احتمالاً کاهش بار استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرائی باشد که این امر تحقیقات بیشتری را می‌طلبد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۰۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد. نویسندگان مقاله از آن معاونت محترم به دلیل تامین هزینه‌های مالی طرح تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

حدودی همانند عملکرد موش‌های کنترل می‌کند. بیان شده است که القای دیابت در موش‌های صحرائی با داروی استرپتوزوسین بعد از ۷ هفته باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی و نیز تثبیت حافظه در ماز آبی موریس می‌شود و دریافت روزانه دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین با ایجاد این اختلال مقابله می‌کند. این محققین این چنین نتیجه می‌گیرند که ملاتونین با کاهش از بار استرس اکسیداتیو دیابت بالاخص در ناحیه‌ی هیپوکامپ موش‌های صحرائی مانع از ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود (۹).

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت القای دیابت در موش‌های

References

- 1- Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2010; 123 (3 Suppl): S3-11.
- 2- DeFronzo RA. Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Overview of newer agents: where treatment is going. *Am J Med.* 2010; 123 (3 Suppl): S38-48.
- 3- Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin.* 2009; 33: 370-7.
- 4- Lapshina E, Lapshina E, Sudnikovich J, et al. Antioxidative enzymes and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. *Life Sci.* 2006; 79: 1804-11.
- 5- Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomedecine & Pharmacotherapy.* 2006; 60: 32-5.
- 6- Lamport DJ, Lawton CL, Mansfield MW, Dye L. Impairments in glucose tolerance can have a negative impact on cognitive function: a systematic research review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33: 394-413.
- 7- Malone JJ, Hanna S, Saporta S, et al. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory. *Pediatr Diabetes.* 2008; 9: 531-9.
- 8- Iwai T, Suzuki M, Kobayashi K, Mori K, Mogi Y, Oka J. The influences of juvenile diabetes on memory and hippocampal plasticity in rats:

- improving effects of glucagon-like peptide-1. *Neurosci Res.* 2009; 64: 67-74.
- 9- Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006; 537: 106-10.
- 10- Lang BT, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain Res.* 2009; 1258: 25-33.
- 11- Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009; 12: 646-52.
- 12- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993; 73: 79-118.
- 13- Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2009; 20: 399-417.
- 14- Prasad AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med.* 2008; 14: 353-7.
- 15- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005; 27: 119-30.
- 16- Nishida E. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine.* 2005; 27: 131-6.
- 17- Gurney AM, Howarth FC. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries. *Cardiovasc Diabetol.* 2009; 8: 4.
- 18- Taghizadeh M, Djazayery A, Salami M, Eshraghian MR, Zavareh SA. Vitamin-D-free regimen intensifies the spatial learning deficit in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2011; 121: 16-24.
- 19- Adachi Y, Yoshida J, Kodera Y, et al. Oral administration of a zinc complex improves type 2 diabetes and metabolic syndromes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 165-70.
- 20- Fugono J, Fujimoto K, Yasui H, Kawabe K, Yoshikawa Y, Kojima Y, et al. Metallokinetic study of zinc in the blood of normal rats given insulinomimetic zinc(II) complexes and improvement of diabetes mellitus in type 2 diabetic GK rats by their oral administration. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002; 17: 340-7.
- 21- Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res.* 2008; 44: 26-40.
- 22- Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1beta-induced damage of rodent pancreatic beta-cells. *J Pineal Res.* 2001; 30: 157-65.
- 23- Rao VS, Santos FA, Silva RM, Teixeira MG. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. *Vascul Pharmacol.* 2002; 38: 127-30.
- 24- Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia.* 2005; 48: 2460-9.
- 25- Kuhad A, Chopra K. Effect of sesamol on diabetes-associated cognitive decline in rats. *Exp Brain Res.* 2008; 185: 411-20.

26- Reagan LP, McEwen BS. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport*. 2002; 13: 1801-4.

27- Grillo CA, Piroli GG, Wood GE, Reznikov LR, McEwen BS, Reagan LP. Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2005; 136: 477-86.

The Effect of Zinc and Melatonin Supplements on Spatial Learning and Memory in Streptozocin-induced Diabetic Rats

Talaei SA¹, Gholami M¹, Davari S¹, Ghaemi M¹, Salami M¹

¹Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran

Corresponding Author: Salami M, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

E-mail: salami-m@kaums.ac.ir

Received: 23 Apr 2012 **Accepted:** 24 Sep 2012

Background and Objective: Diabetes mellitus is a complicated metabolic disorder that can impair both spatial learning and memory. The aim of this study was to evaluate the effect of zinc and melatonin supplements on spatial learning and memory in diabetic rats.

Materials and Methods: This experimental study was carried out on 5 groups of male Wistar rats (n=10 for each): the control animals (C); diabetic adult rats with a normal diet (D); diabetic animals receiving 227 mg/l zinc in drinking water (D+Z); diabetic rats receiving 150 mg/l melatonin in drinking water (D+M); and diabetic rats receiving both supplements (D+ZM). Supplementation was started 5 days before induction of diabetes with streptozocin (60 mg/kg, single dose). Twenty days later, the spatial learning was evaluated by Morris water maze (MWM) for 5 consecutive days (4 trials per day). The spatial memory retrieval was estimated on the last day. The serum levels of glucose and insulin were also measured.

Results: Diabetic rats spent more time and traveled more distance to find the hidden platform than the controls in the learning stage ($P<0.0001$). They also spent less time ($P=0.004$) and passed a shorter distance in the target quadrant over the probe trial. Supplementation with zinc and melatonin inhibited the spatial learning and memory impairment in diabetic animals.

Conclusion: Zinc and melatonin Supplementation seem to improve the induced impaired spatial learning and memory in diabetic rats.

Keywords: *Diabetes mellitus, Streptozocin, Maze learning, Zinc, Melatonin, Rats*