

بررسی اثرات تزریق داخل هیپوکامپی انسولین و گلی بن کلامید بر روی اختلالات حافظه در مدل تجربی دیابت

امیر مهدی افشار مازندران*، مهدیه فقیهی، مهری کدخدایی

خلاصه:

شواهد بسیاری نشانگر دخالت انسولین در اعمال مغز مانند حافظه می‌باشند. در این بررسی، با بکارگیری یک آزمون حافظه فضایی در ماز شعاعی؛ ما این نظریه را که تزریق هیپوکامپی انسولین در موشهای مبتلا به دیابت تجربی می‌تواند به طور نسبی اختلال حافظه را جبران نماید مورد آزمون قرار دادیم. در این بررسی موش‌های نر پس از آموزش و رسیدن به آستانه یادگیری تحت جراحی استروتاکسیک و کانول گذاری قرار گرفتند. سپس آنها در معرض تزریق داخل هیپوکامپی انسولین، گیلی بن کلامید، انسولین همراه با گیلی بن کلامید، و سالین قرار گرفتند. تعداد خطاها و زمان سپری شده برای هر انتخاب به عنوان شاخص‌های حافظه ثبت و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. یافته‌ها نشان می‌دهند: ۱- انسولین بطور انتخابی سازوکارهای حافظه فضایی را در هیپوکامپ به شیوه‌ای وابسته به زمان تحت تاثیر قرار می‌دهد. ۲- اثر تقویتی انسولین همراه با گیلی بن کلامید نشان دهنده سازوکارهای مستقل ولی همگرای آنها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انسولین، ماز شعاعی، حافظه فضایی و هیپوکامپ

مقدمه:

درصد (خفیف) تا ۴۰ درصد (شدید) کاهش می‌یابد (۳).
تجویز گلوکز به این بیماری باعث جبران نسبی اختلالات حافظه می‌گردد. حال این پرسش مطرح می‌شود افزایش توان حافظه به دلیل تأثیر گلوکز است یا تأثیر انسولین؟ در تجربه‌ای دیگر با تجویز ساندواستاتین که اثرات مشابه با سوماتواستاتین را دارد، انسولین داخلی در بیماران آلزایمری سرکوب شده و این بیماران با تجویز گلوکز در شرایط هیپرگلیسمی قرار گرفتند. لیکن بهبودی در روند حافظه مشاهده نگردید. در حالی که همین بیماران

شواهد بسیاری حاکی از اهمیت انسولین در روند حافظه می‌باشد. کمبود انسولین یا عدم پاسخگویی مغز به این هورمون عوارض متعددی از فراموشی خفیف تا بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند (۱). شواهد حاصل از بررسی بیماریهایی که توام با آسیب بافتی پیشرونده عصبی همراه با اختلالات روز افزون حافظه می‌باشند، نشان داده‌اند که به موزات این عوارض، ناهنجاریهایی در متابولیسم گلوکز رخ می‌دهد (۲).

همگام با شدت گرفتن اختلالات حافظه از خفیف به شدید میزان مصرف گلوکز توسط بافتهای مغز بین ۱۰

گردیدند. (در محور قدامی - خلفی ۳/۸ میلی متر عقب تر از بزرگما، ۴ میلی متر در محور عرضی و به عمق ۳/۸ میلی متر پایین تر از سخت شامه) که از اطلس پاکسینو و واستون استخراج شده بود (۱۰) پس از جراحی به حیوانات یک هفته استراحت داده شد و در طول این مدت از نظر عفونت مورد مراقبت قرار داشتند.

تزریقات داخل هیپوکامپی:

تزریقات داخل هیپوکامپی با کمک یک لوله شماره ۲۸ که از یک سو به کانول نصب شده به سر حیوان و از سوی دیگر به یک سرنگ هاملتون ۱۰ میکرولیتری متصل بود با سرعت نیم میکرو لیتر در دقیقه انجام می‌گردید. داروها در محلول سالین حل شده بودند لیکن برای حل بهتر؛ گلی بن کلامید Tween-80 به این محلول افزوده شده بود (۱/۵ درصد وزنی) حجم تزریق برای داروهای انسولین، گلی بن کلامید و سالین یک میکرو لیتر و برای ترکیب انسولین و گلی بن کلامید دو میکرو لیتر بوده است.

یک هفته پس از جراحی، موشها در ماز شعاعی هشت بازویی برای آموزش قرار داده شدند پس از ۳ روز مرحله تطابق، آموزش آغاز شد؛ و تا رسیدن به حد آستانه یادگیری ادامه یافت. موشها سپس به چهار گروه آزمایشی تقسیم گردیدند ($n=7$).

گروه الف: تحت تزریق درون هیپوکامپی سالین قرار گرفت (گروه شاهد).

گروه ب: تحت تزریق درون هیپوکامپی انسولین قرار گرفت (۱۰ نانومول).

گروه ج: تحت تزریق درون هیپوکامپی گلی بن کلامید قرار گرفت (۱۰ نانومول).

گروه د: تحت تزریق ترکیب انسولین و گلی بن کلامید قرار گرفتند (۲۰ نانومول).

هر موش ۳۰ دقیقه قبل از آزمون رفتاری مورد تزریق

ایجاد شرایط هیپرانسولیسمی، بدون افزایش گلوکز باعث افزایش قابل ملاحظه حافظه گردید (۴).

لیکن به سوالي که هنوز پاسخ داده نشده این است که چه قسمتی از مغز مسئول بروز این اثرات انسولین می‌باشد. با توجه به اینکه بالاترین میزان تجمع گیرنده‌های انسولین در هیپوکامپ قرار دارد (۵).

و از آنجا که دخالت این عضو در روند حافظه بارها به اثبات رسیده است (۶). و در روند آسیب‌های پیشرونده عصبی در بیماری آلزایمر این ناحیه صدمه می‌بیند (۷). ما تصمیم گرفتیم، با تزریق داخل هیپوکامپی انسولین به موشهای مبتلا به دیابت تجربی، نقش هیپوکامپ در ظهور اثرات جبرانی و تقویتی گلوکز بر روی حافظه را بررسی نمائیم. از آنجا که اثر گلوکز بر روی حافظه از طریق مسدود نمودن کانال‌های پتاسیمی صورت می‌پذیرد (۸). برای روشن شدن ارتباط بین گلوکز و انسولین در ایجاد اثرات تقویتی و جبرانی بر روی حافظه از تزریق انفرادی همزمان با انسولین گلی بن کلامید که یک مسدود کننده کانال پتاسیمی است کمک گرفتیم (۹).

مواد و روش کار:

حیوانات مورد آزمایش:

تعداد ۲۸ موش صحرایی در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند حیوانات تحت شرایط استاندارد دما و روشنایی نگهداری می‌شدند. پس از جراحی تا پایان مراحل بررسی هر موش در قفس جداگانه نگهداری می‌گردید. جراحی:

موشها با استفاده از کتامین (۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم) بیهوش شده و با روشهای استاندارد استروناکسی کانول‌های هدایتی فلزی به شماره ۲۳ در هیپوکامپ با مختصات ذیل به صورت یکطرفه نصب

قرار گرفت. آزمون رفتاری با قرار دادن در محوطه مرکزی و باز نمودن درب‌ها و دادن فرصت هشت دقیقه‌ای به حیوان انجام شد تعداد خطاها و مدت زمان سپری شده در هر بازو ثبت گردید. ماز متشکل از صفحه مرکزی به قطر ۲۲ سانتی متر، هشت بازو به طول ۶۰ سانتی متر و عرض و ارتفاع لبه‌های ۶ سانتی متر و مجهز به درب‌های کشویی بوده است. ماز در اتاق آزمون قرار داشت. علائم خارج مازی تا پایان مراحل رفتاری ثابت بودند خطای آزمون به صورت ورود مجدد به بازویی که قبلاً بازدید شده ثبت می‌گردید.

پس از پایان آزمون رفتاری، موشها قربانی شده و با محلول ۰/۹٪ و ۱۰٪ فرمالین پرفیوز شده و مغز از جمجمع خارج و در محلول سوکروز ۳۰٪ و فرمالین ۱۰٪ نگاهداری شد. سپس با ایجاد مقاطع به قطر ۴۰ میکرومتر از ناحیه هیپوکامپ با کریستال ویوله رنگ آمیزی گردیدند تا از محل کانول گذاری اطمینان حاصل شود.

قبل و بعد از آزمون رفتاری با خونگیری از دم و اندازه‌گیری گلوکز خون از مقدار گلوکز حیوانات را بین 2 ± 17 ثبت نمودیم که از مقدار طبیعی بین $0/5 \pm 5/5$ بسیار بالاتر بود.

میانگین تعداد دفعات مورد نیاز برای رسیدن به آستانه یادگیری $1/2 \pm 10/9$ روز بوده است. آزمون‌های انجام شده برای مقایسه بین چندین میانگین بوده و تفاوت معنی دار $0/83$ (دو سویه) بین دو میانگین برای کسب سطح معنی دار بودن $P > 0/05$ ضرورت داشت.

نتایج:

گروه آزمایشی سالیان (میانگین $\pm$ SEM) = $0/67 \pm 2/11$ میانگین خطا.
گروه آزمایشی انسولین (میانگین $\pm$ SEM) =

($0/22 \pm 1/22$) میانگین خطا.

گروه آزمایشی گلی بن کلامید (میانگین $\pm$ SEM) = $0/4 \pm 1/24$ میانگین خطا.

گروه آزمایشی گلی بن کلامید و انسولین (میانگین $\pm$ SEM) = $0/34 \pm 0/67$ میانگین خطا.

همانگونه که ملاحظه می‌شود بین گروه‌های آزمایشی سالیان و انسولین تفاوت معنی دار وجود دارد اما بین گروه گلی بن کلامید و سالیان تفاوت معنی دار نیست این در حالی است که تفاوت معنی دار بین گروه گلی بن کلامید و انسولین با گروه سالیان وجود دارد.

گروه آزمایشی سالیان (میانگین $\pm$ SEM) = 5 ± 36 ثانیه.

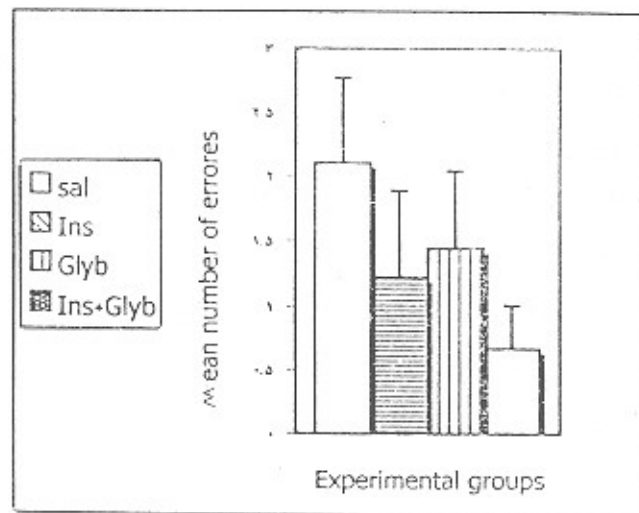
گروه آزمایشی انسولین (میانگین $\pm$ SEM) = 5 ± 27 ثانیه.

گروه آزمایشی گلی بن کلامید و انسولین (میانگین $\pm$ SEM) = 4 ± 22 ثانیه.

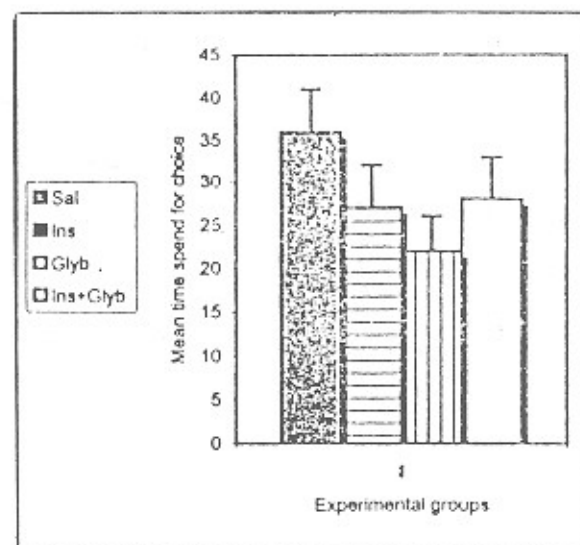
آزمون‌های آماری انجام شده برای مقایسه بین چندین میانگین انجام شد و تفاوت معنی دار ۷ ثانیه (دو سویه) بین دو میانگین برای کسب سطح معنی دار بودن $P < 0/5$ ضرورت داشت. بر این اساس ملاحظه می‌شود که، فقط بین گروه‌های سالیان با انسولین و انسولین و گلی بن کلامید تفاوت معنی دار وجود دارد.

بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج برخی از یافته‌های پیشین که از تأثیر مثبت انسولین در جبران اختلالات حافظه حکایت می‌کردند همخوانی دارد (۱۱). در حالی که برخی از محققین بر این نکته که انسولین در حالت سلامت تأثیری بر حافظه ندارد تأکید می‌ورزند (۱۲) آزمایش جاری نشان داد که تأثیر انسولین در جبران اختلالات حافظه فقط با تأثیر بر روی هیپوکامپ بطور



نمودار ۱: میزان تغییرات میانگین تعداد خطاها در گروه‌های آزمایشی $P < 0.05$



نمودار ۲: میزان تغییرات زمانی سپری شده برای هر انتخاب در گروه آزمایشی $P < 0.05$

تنهایی در جبران اختلالات حافظه در بیماران آلزایمری بدون ایجاد هیپرانسولینمی ثانویه متعاقب آن بی تأثیر است همچنانی دارد (۴). این فرضیه که اثرات گلی بن‌کلامید و انسولین در تقویت حافظه از دو مکانیسم جدا اما همگرا عمل می‌کنند با توجه به معنی دار بودن تأثیر ترکیب این دو دارد نیز تقویت می‌شود. بدین ترتیب به نظر

اختصاصی آشکار می‌شود. بویژه تأثیر انسولین در حافظه فضایی در نتایج حاصل از ماز شعاعی به خوبی جلوه گر گردیده است. از سوی دیگر معنی دار بودن تأثیر گلی بن‌کلامید به تنهایی نشان دهنده این امر است که نتایج کرافت و همکاران از دانشگاه واشنگتن که نشان داده‌اند گلوکز به

- 1 - Wickelgren I: Tracking insulin to the mind: *Science*. 24: 517-519, 1998.
 - 2 - Hoyer S: Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long term diminution's in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats, *Behavioral Neuroscience* 112 (5): 1199-1208, 1998.
 - 3 - Kumar, et al: High resolution PET studies in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 4: 35-46, 1991.
 - 4 - Craft, et.al: Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose: *Archive of general psychiatry*. 56(12): 1135-40, 1999.
 - 5 - Baskin D, et al: Insulin in the brain: Annual review of physiology. 49: 335-347, 1987.
 - 6 - Marighetto F, et al: Effects of intraseptally injected glutamergic drugs on hippocampal sodium dependent high affinity choline uptake in native and trained mice: *Pharmacology biochemistry and behavior*. 49: 689-699, 1994.
 - 7 - Winocur G, et al: Hippocampal and prefrontal cortex contributions to learning and memory: Analysis of lesion and aging effects on maze learning, 4: 544-51, 1990.
 - 8 - Stefani I, et al: ATP- sensitive potassium channel block ades enhance spontaneous alternation performance in the rat: A potential mechanism for glucose mediated memory enhancement: *Neuroscience*. 93(2): 557-63, 1999.
 - 9 - Ashcroft, et al: Adenosine 5 - triphosphate sensitive potassium channels: Annual review of neuroscience. 11: 97-118.
 - می‌رسد بار دیگر اهمیت نگرشی عمیق‌تر به تأثیرات متابولیسم گلوکز و عوامل تنظیمی آن و تعادل انرژی در فعالیت‌های مغزی و حافظه به طرز بارزی آشکار شده است. این اختلالات می‌تواند جزئی از مکانسیم ایجاد اختلالات حافظه یا حداقل از عوامل مشارکت کننده در این روند محسوب شوند. اهمیت این اختلالات در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم و همچنین افراد مسن بسیار گسترده است.
 - در پایان شاید بررسی‌های بیشتر در این زمینه منجر به طراحی گروه‌های دارویی گردد که تأثیرات مثبت انسولین بر روی حافظه بدون ایجاد اثرات متابولیک دیگر آن در دستگاه عصبی ایجاد کنند و بدین ترتیب در کنترل این عوارض که آسیب‌های فردی و اجتماعی قابل ملاحظه‌ای را موجب می‌گردند؛ ایفای نقش نمایند. در واقع این حرکت چندی است که آغاز شده، نسل جدید داروهای ضد بیماری قند مانند روزلین (Rezolin) که در مرحله آزمایشی قرار دارند. ممکن است چنین اثراتی را آشکار سازند.
- کتابنامه:**
- 10 - Paxinos, et al: The rat brain in stereotaxic coordinates 2nd ed., Sandiego: Academic press, 11:97-118, 1988.
 - 11 - Craft, et al: Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimers disease: *Neurobiology of aging* 17 (1): 123 - 130, 1996.
 - 12 - Messier, et al: (1996), Glucose regulation and cognitive functions: Relative to Alzheimer's disease: *Behavioral brain research*. 75 (1-11), 1996.