

## اثر متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل تجربی بیماری آلزایمر القا شده با بتا آمیلوئید در موش صحرایی

نویسندگان: تاجماه ممبینی<sup>۱</sup>، مهدی نصیری<sup>۲</sup>، جمشید نارنجکار<sup>۱</sup>، مهرداد روغنی<sup>۳\*</sup>

۱. گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران.
۲. دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران.
۳. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی-دانشگاه شاهد، تهران.

E-mail: mehjour@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: مهرداد روغنی

### چکیده

مقدمه و هدف: بیماری آلزایمر یک بیماری پیش‌رونده و تحلیل‌برنده سلول‌های مغز به علت انباشتگی دو پروتئین بتا آمیلوئید و تائو است و فعلاً درمان اساسی هم ندارد. متفورمین یک داروی پایین‌آورنده قند خون می‌باشد که در درمان و کنترل دیابت قندی نوع ۲ کاربرد دارد. براساس اثرات حفاظت عصبی، ضد التهابی، کاهش‌دهندگی تجمع بتا آمیلوئید و اثرات ضد استرس اکسیداتیو این دارو در بافت عصبی، هدف مطالعه کنونی، بررسی اثر درمان با متفورمین بر مدل حیوانی آلزایمر القا شده با بتا آمیلوئید در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر به تعداد ۳۲ سر استفاده شد. حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه سالم (شم) کنترل، گروه سالم (شم) دریافت‌کننده متفورمین، گروه بیمار (ضایعه) کنترل و گروه بیمار (ضایعه) تحت درمان با متفورمین تقسیم شدند. گروه‌های دوم و چهارم، به مدت یک هفته قبل از جراحی، روزانه تحت درمان متفورمین به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند. در دو گروه ضایعه، بیماری آلزایمر با جراحی استرئوتاکس و تزریق داخل هیپوکمپی بتا آمیلوئید در موش القا شد. در دو گروه شم همین مراحل انجام، ولی نرمال سالین به داخل هیپوکمپ تزریق شد. پس از گذشت سه هفته، برای ارزیابی یادگیری و حافظه حیوانات از روش‌های رفتار اجتنابی غیرفعال و مان Y استفاده شد.

نتایج: در آزمون رفتار اجتنابی، گروه ضایعه نسبت به گروه شم دارای میانگین میزان تأخیر اولیه کمتری بودند که این کاهش معنی‌دار نبود. در گروه ضایعه دوم، افزایش غیرمعنی‌دار میانگین میزان تأخیر اولیه، در مقایسه با گروه ضایعه دیگر وجود داشت. در گروه شم نیز که همان میزان متفورمین را دریافت کرده بودند نیز کاهش غیرمعنی‌دار زمان تأخیر اولیه در مقایسه با گروه شم به دست آمد. در آزمون اجتنابی غیرفعال که تأخیر در حین عبور را در موش‌های صحرایی بررسی می‌کرد، کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور در گروه آلزایمری نسبت به گروه شم، در پایان کار به خوبی مشاهده گردید ( $p < 0/01$ ). هرچند این کاهش به‌طور غیرمعنی‌دار در گروه آلزایمری دوم نیز نسبت به گروه شم وجود داشت. به‌علاوه، تفاوت بین دو گروه آلزایمری از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: درمان مزمن متفورمین باعث افزایش حافظه در آزمون اجتنابی غیرفعال شاتل باکس شده؛ ولی اثری بر مدل حافظه فضایی در موش صحرایی نر ندارد. احتمال دارد که داروی ضد دیابتی متفورمین در درمان بیماری آلزایمر و انواع دمانس در انسان کاندید مناسبی باشد.

واژگان کلیدی: بتا آمیلوئید، بیماری آلزایمر، متفورمین، رفتار اجتنابی غیرفعال، حافظه فضایی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست‌وسوم-شماره ۱۲۲  
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۰  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۶

## مقدمه

و سلجین مورد استفاده قرار می‌گیرند. خوشبختانه این داروها با سایر داروهای درمانی تداخلی ندارند و می‌توان از آنها به راحتی به همراه دیگر داروها استفاده کرد. در کنار این درمان‌ها، داروهای روان‌پزشکی برای درمان علامتی اختلالات روانی همراه آلزایمر نیز به کار می‌روند (۴). متفورمین یک داروی پایین‌آورنده قند خون می‌باشد که در درمان و کنترل دیابت قندی نوع ۲ کاربرد دارد. در چند سال اخیر، اثرات حفاظت عصبی، ضد التهابی در بافت عصبی و کاهش‌دهندگی تجمع بتا آمیلوئید و ضد استرس اکسیداتیو این ماده اثبات شده است (۷-۹). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند انسولین و سیگنالینگ انسولین برای بقای نورون‌ها مهم می‌باشند. با مطالعه‌های انجام شده بر روی مغز بیماران آلزایمری، کاهش بیان گیرنده انسولین در آنها نشان داده شده است. در حال حاضر این موضوع که بیماری آلزایمر با اختلال در سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز در مغز مرتبط است، به طور رسمی شناخته شده است تا اینکه حتی بیماری آلزایمر را نوع خاصی از دیابت نامیده و آن را دیابت نوع ۳ می‌خوانند. با توجه به بعضی اطلاعات ضدونقیض درباره اثر گیرنده انسولین در بیماری آلزایمر و همچنین با توجه به تأثیرات محافظتی متفورمین بر روی اعصاب در کنار بعضی نتیجه‌های نامعلوم این ماده در وضعیت مدل‌های آلزایمر، بر آن شدیم تا اثر این ماده را بر میزان بیماری‌زایی آلزایمر در مدل‌های این بیماری ارزیابی نماییم. هدف بررسی حاضر، بررسی اثر متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل تجربی بیماری آلزایمر در موش صحرایی بود.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۲۰ تا ۲۷۰ گرم به تعداد ۳۲ سر استفاده شد. موش‌ها از انستیتو پاستور خریداری شد و در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی شاهد با شرایط

بیماری آلزایمر، یک بیماری پیش‌رونده و تخریب‌کننده بافت مغز است که با کاهش پیش‌رونده عملکرد شناختی و تغییر رفتار تظاهر پیدا می‌کند و شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو در دنیاست (۱) و تاکنون درمان ریشه‌کننده‌ای ندارد. بیماری آلزایمر یک بیماری چندعاملی می‌باشد که از جمله می‌توان به ژنتیک و عوامل محیطی اشاره کرد. سن و جهش‌های ژنی، بیشترین عامل تعیین‌کننده هستند. عوامل ژنتیکی شامل جهش در ژن‌های پیش‌ساز آمیلوئید و پرسیلین ۱ و ۲ که منجر به آلزایمر زود هنگام خانوادگی می‌شود (۲). بر طبق اطلاعات انجمن آلزایمر ایران، آمار دقیقی از مبتلایان به آلزایمر در ایران وجود ندارد و احتمال می‌رود حدود ۵۰۰ هزار نفر در ایران مبتلا به آلزایمر باشند (۳). دو مشخصه اصلی این بیماری، پلاک‌های خارج سلولی آمینواسید آمیلوئید بتا ۴۲ و دره‌م‌تیدگی نوروفیبریلاری داخل سلولی می‌باشد (۴). پلاک‌های آمیلوئیدی عمدتاً مخلوط هستند و معمولاً از پروتئین آمیلوئید بتا (A $\beta$ ) تشکیل یافته‌اند که از خاصیت پروتئولیتیک پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید به دست می‌آید (۵). در حالت عادی مقدار این قطعات در سلول کم است و به سرعت تجزیه می‌شود؛ اما اگر در پروتئوم سلول‌های عصبی این تعادل بر هم بخورد و مقدار این قطعات افزایش یابد، ساختارهای پروتئینی کروی و در نتیجه آلزایمر ایجاد می‌شود (۶). درمان اصلی مراحل اولیه آلزایمر براساس موارد ذکر شده در بالا، براساس کولین استرازا می‌باشند. این درمان باعث کاهش هیدرولیز استیل‌کولین‌های آزاد شده از پایانه عصبی در شکاف عصبی می‌شوند که منجر به تحریک پایانه‌های عصبی کولینرژیک می‌شود. اکنون ۳ دارو از این دسته از داروها شیوع پیدا کرده‌اند که داروهای دونپزیل، ریواستیگمین، گالانتامین نام دارند. در مورد آلزایمر پیشرفته و شدید، ممانتین اولین دارویی است که از دسته ان-متیل-دی اسپاراتات-آنتاگونیست‌ها به کار برده شد. در مورد آخرین مرحله‌های آلزایمر آلفا توکوفرول

آماده‌سازی حیوان، شکافی بر روی پوست سر حیوان ایجاد کرده و سطح استخوان جمجمه را کاملاً تمیز و خشک کردیم. در این حالت، محل برگما و درز سهمی به‌خوبی قابل تشخیص بود. پس از تعیین نقطه برگما در محل تلاقی درز تاجی (محل اتصال استخوان‌های پاریتال و فرونتال) و درز سهمی (درز بین استخوان‌های پاریتال) مختصات محل‌های موردنظر برای تزریق داخل هیپوکامپی در دو طرف تعیین شد. طبق اطلس پاکسینوس، مختصات‌های مذکور برابر بوده‌اند با: Anteroposterior: -3.5، Lateral:  $\pm 2$  و Deep: -2.8. پس از علامت‌گذاری نقاط موردنظر، این نقاط با استفاده از مته دستی سوراخ شدند. در این مرحله با استفاده از سرنگ هامیلتون تزریق داخل هیپوکامپی انجام شد. تزریق به‌گونه‌ای انجام شد که در هر دقیقه، یک میکرولیتر از مایع موردنظر تزریق گردید. پس از اتمام تزریق، حدود پنج دقیقه سرنگ در مختصات موردنظر باقی ماند تا مایع تزریق شده پس زده نشود. سپس با سرعت ۱ میلی‌متر در دقیقه سرنگ هامیلتون از محل خود خارج شد. پس از اتمام تزریق، محل جراحی را بخیه زده و استریل نمودیم.

### آزمایشات رفتاری

بررسی حافظه فضایی با استفاده از Y-maze این دستگاه دارای سه بازوی عمود بر هم که هرکدام با یکی از حروف A، B و C علامت‌گذاری شده‌اند، بود. بازوها طولی برابر با ۳۰ سانتی‌متر داشتند. ارتفاع بازوها ۳۰ سانتی‌متر و پهنای هرکدام ۱۵ سانتی‌متر بود. هر سه بازو به‌وسیله یک صفحه سه‌گوش با اضلاع برابر با ۱۵ سانتی‌متر به هم متصل شده بودند. سنجش روند حافظه از نوع بازشناختی (Recognitive) به‌وسیله ماز Y در اتاق تاریک و بدون سروصدا و رفت‌وآمد انجام شد و برای هر موش، تنها یک‌بار انجام پذیرفت. در هنگام شروع آزمایش، هر موش بدون داشتن آشنایی قبلی با دستگاه در بخش ابتدایی بازوی شروع یا بازوی A قرار گرفت. در این زمان، درب گیوتینی دستگاه بسته بود. با برداشتن درب گیوتینی

روشنایی و تاریکی طبیعی، در دمای ۲۳ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. حیوانات به‌صورت تصادفی به ۴ گروه یکسان تقسیم شدند که عبارت بودند از:

۱. گروه شم یا Sham-operated: در این گروه، موش‌های سالمی قرار داشتند که بر روی آن‌ها جراحی استریوتاکسیک با تزریق داخل هیپوکامپی نرمال سالیین انجام شد.

۲. گروه شم و دریافت‌کننده متفورمین که این ماده را به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک هفته قبل از جراحی، به‌طور روزانه تا یک ساعت قبل از جراحی و به‌فرم داخل صفاقی حل‌شده در نرمال سالیین دریافت نمودند.

۳. گروه Lesion یا  $\beta$ -آمیلوئید: در این گروه برای ایجاد مدل بیماری آلزایمر، ماده  $\beta$  (25 - 35) A $\beta$  با دوز 10  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  به درون ناحیه هیپوکامپ پشتی به‌صورت دو طرفه تزریق گردید. تزریق بدین صورت انجام شد که به هر طرف از مغز با مختصات Anteroposterior: -3.5، Lateral:  $\pm 2$  و Deep: -2.8، از 2  $\mu\text{l}$  A $\beta$  تزریق گردید.

۴. گروه Lesion یا  $\beta$ -آمیلوئید دریافت‌کننده متفورمین که این ماده را به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک هفته قبل از جراحی به‌طور روزانه تا یک ساعت قبل از جراحی، حل‌شده در نرمال سالیین دریافت نمودند و در زمان جراحی  $\beta$ -آمیلوئید را مشابه گروه ۳ دریافت نمود.

در پایان هفته سوم پس از جراحی، تمامی گروه‌ها مورد آزمایش‌های رفتاری مربوط به یادگیری و حافظه قرار گرفتند.

برای انجام جراحی استریوتاکسیک، موش‌های صحرایی نر با استفاده از تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از تراشیدن موهای سر حیوان، آن را در داخل دستگاه استریوتاکس قرار دادیم. پوست سر حیوان با استفاده از بتادین ضدعفونی شد و چشم حیوان با استفاده از پمادهای استریل چشمی مرطوب نگه داشته شد. پس از

گیوتینی ارتباط‌دهنده محفظه روشن و تاریک کاملاً بسته بود. در انتهای دوره، لامپ محفظه روشن شده و درب گیوتینی باز گردید. به محض بازکردن درب، کرونومتر به کار انداخته شد و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان از محفظه روشن به محفظه تاریک برود، یادداشت گردید که این تأخیر اولیه زمانی، تحت عنوان تأخیر اولیه یا IL اطلاق گردید (ملاک برای ورود حیوان به محفظه تاریک، عبور اندام‌های حرکتی پشتی حیوان از درب ارتباط‌دهنده دو محفظه بود). سپس، درب پایین آورده شد و یک تک شوک به حیوان وارد آمد. در پایان کار پس از ۱ دقیقه، حیوان به قفس منتقل گردید. در ارتباط با این مرحله، موش‌های با تأخیر اولیه بیشتر از ۶۰ ثانیه از آزمایشات حذف گردیدند.

نگهداری اطلاعات: این مرحله ۲۴ ساعت پس از مرحله دوم، در روز چهارم انجام پذیرفت. این مرحله مشابه مرحله قبل بود؛ با این تفاوت که زمانی که حیوان به محفظه تاریک وارد می‌شد، هیچ‌گونه شوکی را دریافت نمی‌کرد. در این مرحله، تأخیر در حین عبور یا STL اندازه‌گیری گردید. منظور از تأخیر در حین عبور، مدت زمانی است که قبل از آنکه حیوان وارد محفظه تاریک شود، در محفظه روشن باقی می‌ماند. زمان قطع آزمایش (Cut off) نیز ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق، نتایج به صورت  $Mean \pm SEM$  بیان شدند. برای مقایسه بین گروهی، نتایج با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه و تست توکی انجام شد و P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار Sigma Stat 3.5 برای آنالیز نتایج و از برنامه Excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

آزمایش شروع شد. در طی هشت دقیقه، بازوهای را که موش وارد آن‌ها شده بود (با این ملاک که قاعده دم حیوان وارد بازو شده باشد) به ترتیب یادداشت شد. در پایان هشت دقیقه، موش از دستگاه خارج شده و به قفس خود بازگردانده شد. در پایان، بازوهای که حیوان به آن‌ها وارد شده بود، بدون احتساب بازوی شروع در توالی‌های سه‌تایی دسته‌بندی گردیده، دسته‌هایی که در آن‌ها بازوی تکراری وجود داشت حذف شد و براساس فرمول زیر درصد تناوب محاسبه گردید:

$$\text{alteration percentage} = \frac{\text{ACTUAL ALTERATION}}{\text{MAXIMAL ALTERATION} - 2} \times 100$$

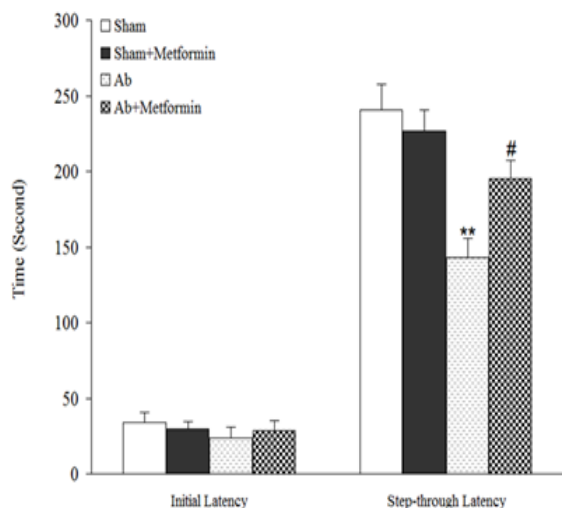
علاوه بر این، تعداد بازوهای که هر حیوان در طول مدت انجام آزمایش به آن‌ها وارد می‌شد نیز مورد مقایسه قرار می‌گرفت.

#### استفاده از shuttle box برای بررسی رفتار اجتنابی غیرفعال

برای بررسی رفتار اجتنابی (احترازی) غیرفعال، از یک دستگاه به ابعاد  $20 \times 80 \times 20$  سانتی‌متر (شاتل باکس) دارای یک محفظه روشن و یک محفظه تاریک استفاده شد. از میله‌های فلزی موجود در کف محفظه تاریک برای شوک‌دادن به پای حیوان استفاده شد. برای اعمال تحریک به محفظه تاریک، از دستگاه استیمولاتور خاص (بهبودپرداز، تهران) استفاده گردید. بدین منظور، تک تحریکی به شدت یک میلی‌آمپر و به مدت یک ثانیه اعمال گردید. در این مطالعه، روش بررسی رفتار اجتنابی (احترازی) غیرفعال پس از بررسی به شرح زیر بود:

سازش: در این مرحله، قبل از شروع آزمایش، هر حیوان برای ۲ روز متوالی حداقل به مدت ۵ دقیقه در داخل دستگاه قرار داده شد.

اكتساب: در این مرحله (روز سوم) حیوان در محفظه روشن قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه، این محفظه تاریک نگه داشته شد. در این مدت، درب



نمودار ۱. میزان تأخیر اولیه و میزان تأخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیرفعال در گروه‌های شم، شم تیمار شده با متفورمین، آلزایمری (Ab) و آلزایمری تیمار شده با متفورمین در هفته چهارم پس از جراحی  $p < 0.01$  (\*\* در مقایسه با گروه شم)، #  $p > 0.05$  (در مقایسه با گروه آلزایمری (Ab)).

#### نتایج حاصل از آزمون ماز Y

آزمون ماز Y که شاخصی از حافظه فضایی در جوندگانی نظیر موش صحرائی می‌باشد، نشان داد که میانگین درصد رفتار تناوبی در حیوانات گروه آلزایمری شده با  $\text{A}\beta$  (۲۵-۳۵) به طور معنی‌دار کمتر از گروه شم بود ( $p < 0.01$ ). میزان درصد رفتار تناوبی در گروه آلزایمری تیمار شده با متفورمین، تفاوت معنی‌دار با گروه آلزایمری نشان نداد؛ هرچند میزان کاهش آن نسبت به گروه آلزایمری کمتر بود و همچنین تجویز متفورمین به موش‌های صحرائی گروه شم نیز تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه شم ایجاد نکرد (نمودار ۲).

#### نتایج

##### نتایج حاصل از آزمون اجتنابی غیرفعال

موش‌های صحرائی که با تزریق ۲ میکرولیتر از ماده  $\text{A}\beta$  (۲۵-۳۵) (با دوز  $10\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) به درون ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی به صورت دوطرفه آلزایمری شده بودند، نسبت به گروه شم دارای میانگین میزان تأخیر اولیه کمتری بودند که این کاهش معنی‌دار نبود. در موش‌های صحرائی آلزایمری شده‌ای که از یک هفته قبل از جراحی استریوتاکسی و تزریق  $\text{A}\beta$  به آنها، به طور روزانه تا یک ساعت قبل از جراحی و به فرم داخل صفاقی به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با متفورمین تیمار شدند. افزایش غیرمعنی‌دار میانگین میزان تأخیر اولیه، در مقایسه با گروه آلزایمری وجود داشت.

در مورد گروه شم نیز که همان میزان متفورمین را با روش مذکور دریافت کرده بودند نیز کاهش غیرمعنی‌دار زمان تأخیر اولیه در مقایسه با گروه شم به دست آمد (نمودار ۱).

در مرحله بعدی آزمون اجتنابی غیرفعال که تأخیر در حین عبور را در موش‌های صحرائی بررسی می‌کرد، کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور در گروه آلزایمری نسبت به گروه شم در پایان کار به خوبی مشاهده گردید ( $p < 0.01$ ), هرچند این کاهش به طور غیرمعنی‌دار در گروه آلزایمری که قبل از عمل جراحی تحت تیمار با متفورمین قرار گرفته بودند نیز نسبت به گروه شم وجود داشت. به علاوه، تفاوت بین دو گروه آلزایمری و آلزایمری تیمار شده از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

همچنین، تیمار موش‌های صحرائی گروه شم با متفورمین نیز کاهش غیرمعنی‌دار تأخیر در حین عبور را در مقایسه با گروه شم به دنبال داشت ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۱).

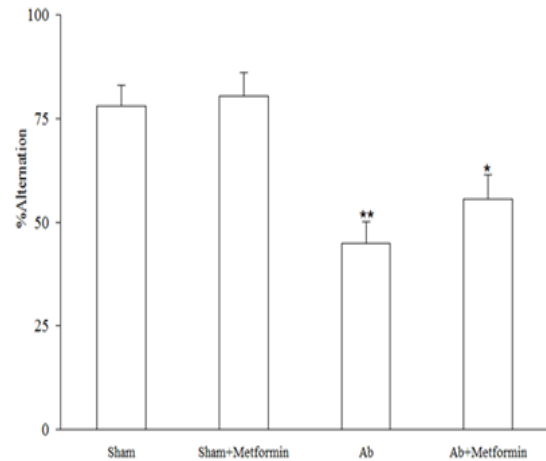
### بحث

آمیلوئید بتا طی فرایندی پروتئولیتیک از پروتئین پیش‌ساز خود که یک گلیکوپروتئین عرض غشایی است و APP نام دارد، شکل می‌گیرد. APP توسط ۳ آنزیم پروتئولیتیک شکسته می‌شود. آنزیم‌های آلفا، بتا و گاما سکرناز، به ترتیب پروتئین را در اسیدهای آمینه ۶۷۸، ۶۷۱ و ۷۱۱ برش می‌دهند.  $\beta$  سکرناز آنزیم آغازگر است که روی APP اثر کرده و محل اثر آن، انتهای N ناحیه پپتید آمیلوئید بتا می‌باشد و ۲ قطعه تشکیل می‌شود، سپس آنزیم  $\gamma$  سکرناز وارد عمل شده و بر انتهای C که حاوی پپتید آمیلوئید بتا است اثر کرده و ۲ قطعه پپتیدی تشکیل می‌شود که به ترتیب پپتیدهای به نام آمیلوئید بتا ۴۰ (دارای ۴۰ آمینواسید) و آمیلوئید بتا ۴۲ می‌باشند (۱۰).

در حالت عادی مقدار این قطعات در سلول کم است و به سرعت تجزیه می‌شود؛ اما اگر در پروتئوم سلول‌های عصبی این تعادل بر هم بخورد و مقدار این قطعات افزایش یابد، ساختارهای پروتئینی کروی و در نتیجه آلزایمر ایجاد می‌شود (۶). به دلیل مشاهده آسیب‌رسانی بیشتر توالی ۴۲ واحدی آمیلوئید بتا، مطالعات درمانی بیشتر بر روی این توالی متمرکز شده است (۱۱). سطوح نسبی  $A\beta_{42}$  زمینه‌ساز اختلال نورونی و زوال عقل است (۱۲).

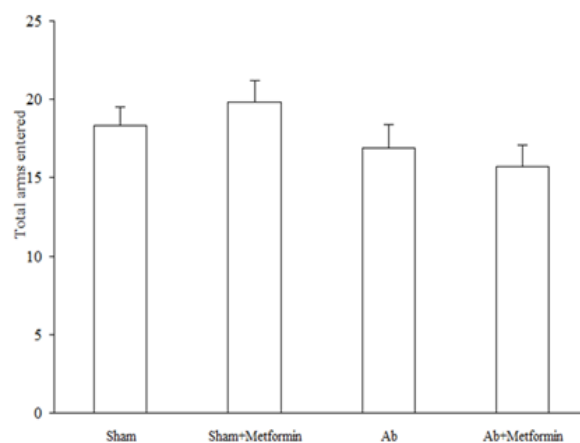
علاوه بر این، نشان داده شده که  $A\beta_{42}$  به صورت فیبریل‌های آمیلوئید به علاوه میانجی‌های محلول، بسیار آسان‌تر از  $A\beta_{40}$  تجمع می‌یابد (۱۳). فیبریل‌های  $\beta A$  موجب دیسترونی نورونی (۱۴) و تولید رادیکال‌های آزاد (۱۵) و شکل‌های مختلفی از آسیب پیش‌اکسایشی می‌شوند (۱۶).

پروتئین  $A\beta_{42}$  هم در آستروسیت‌ها و هم در نورون‌ها، موجب ایجاد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive Oxygen Species) از طریق NADPH اکسیداز می‌شود (۱۷). فشار اکسایشی هنگامی اتفاق می‌افتد که تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) بر توانایی پاک‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها غالب شوند (۱۸). افزایش فشار اکسایشی در پاتولوژی چندین بیماری مانند



نمودار ۲. میزان درصد تفاوت در آزمون ماز Y در گروه‌های شام، شام تیمار شده با متفورمین، آلزایمری (A $\beta$ ) و آلزایمری تیمار شده با متفورمین در هفته چهارم پس از جراحی. (\*P<۰/۰۵، \*\*P<۰/۰۱ (در مقایسه با گروه شام))

نمودار ۳. نتایج مربوط به میزان تحرک حیوان را در آزمون Y maze در موش‌های گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. برای این منظور، تعداد کل بازوهای وارد شده در هر جلسه به عنوان شاخصی از میزان تحرک حیوان لحاظ شد. از این نظر عملاً تفاوت معنادار و در حد چشمگیر بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد که خود به خوبی نشان‌دهنده آن است که اعمال انجام شده در مورد آن‌ها به طور محسوسی بر رفتار حرکتی حیوان تأثیر نداشته است.



نمودار ۳. تعداد کل ورود به بازوها در آزمون ماز Y در گروه‌های شام، شام تیمار شده با متفورمین، آلزایمری (A $\beta$ ) و آلزایمری تیمار شده با متفورمین در هفته چهارم پس از جراحی.

مکانیسم‌های پاتولوژیک در روند بیماری نیز سودمند می‌باشند. باتوجه‌به عدم درک کامل دلیل بیماری آلزایمر، باید در هنگام استفاده از مدل‌های حیوانی، به محدودیت‌های هر کدام دقت داشت. در مطالعه ما نیز در بررسی‌ها و نتایج از مدل حیوانی استفاده گردیده است.

همان‌طور که در نتایج ما نشان داده شد که در آزمون شاتل باکس در گروه آلزایمری در موش‌هایی آلزایمری با تزریق داخل بطنی بتا آمیلوئید، کاهش تأخیر در حین عبور داشتیم که باتوجه‌به مدل ایجادشده قابل انتظار است. درمان با متفورمین به‌طور معناداری مانع کاهش تأخیر در حین عبور در موش‌های آلزایمری گردید. به‌عبارت‌دیگر، موش‌های آلزایمری تیمارشده با متفورمین میزان تأخیر حین عبوری بالاتری نسبت به موش‌های آلزایمری بدون تیمار داشتند.

در آزمون حافظه فضایی به‌طور مشابهی در موش‌های آلزایمری‌شده با تزریق داخل بطنی بتا آمیلوئید، میزان درصد تناوب در مقایسه با موش‌های کنترل به‌طور معناداری کاهش یافته بود. در موش‌های آلزایمری تیمارشده با متفورمین، درصد تناوب نسبت به گروه کنترل کاهش یافت؛ ولی این میزان درصد تناوب گرچه بالاتر از گروه تیمارنشده با متفورمین بود، ولی تفاوت با گروه تیمارشده و نشده معنادار نبود.

براساس مطالعات فارماکولوژیک، متفورمین می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کرده و اثرات ویژه‌ای بر سیستم اعصاب مرکزی اعمال نماید، گرچه مکانیسم دقیق و محل اثر آن مشخص نشده است. به‌علاوه، اطلاعات متناقضی درباره اثرات مفید و اثرات مضر متفورمین بر بافت مغز موجود است. مطالعات خارج از بدن موجود زنده (in vitro) اخیراً نشان داده است که متفورمین تولید آمیلوئید بتا و هیپرفسفریلاسیون پروتئین تائو، یافته‌های مشابه بیماری آلزایمر، در یک رده سلول عصبی تمایز یافته که تحت هیپر انسولینمی مزمن قرار گرفته‌اند را کاهش می‌دهد (۷). کیک اشتین و همکاران، با استفاده از سلول‌های عصبی نوع وحشی و موش‌های ترنس ژنیک انسانی گزارش کردند که

دیابت و آلزایمر نشان داده شده است (۱۹). افزایش قند خون از طریق افزایش تولید ROS با فشار اکسایشی مرتبط است (۲۰).

تغییرات در هموستاز انسولین و گلوکز در سطح محیطی بدن ممکن است انسولین مغز و عملکرد گیرنده‌اش را تحت تأثیر قرار دهد و سبب افزایش الیگومریزاسیون آمیلوئید بتا و هایپرفسفریلاسیون تائو شود (۲۱).

مطابق نظریه آمیلوئید، این پروتئین با تشکیل توده‌های فیبری نامحلول و توده‌های تجمع‌یافته محلول که با تغییر ساختار ثانویه ماریچ آلفا به صفحات بتا همراه است، به سلول‌های عصبی، پایانه‌های سیناپسی و دیواره عروق خونی آسیب وارد می‌کند (۲۲). توده‌های فیبری نامحلول با ته‌نشین شدن در محیط برون‌سلولی سیستم اعصاب مرکزی، ارتباط سیناپسی سلول‌های عصبی را قطع کرده و از تشکیل و یا انتقال پتانسیل عمل جلوگیری می‌کند که در نهایت باعث مرگ سلول عصبی می‌شود (۲۳). توده‌های محلول نیز علاوه بر اینکه همانند توده‌های نامحلول با حمله به پایانه‌های سیناپسی و قطع ارتباط سلول‌های عصبی، باعث آسیب‌رساندن به سیستم اعصاب مرکزی می‌شوند (۲۳)، با حمله به غشای سلول عصبی و ایجاد حفره در سطح غشاء، تعادل یونی داخل و خارج سلول عصبی را برهم می‌زنند و با تأخیر در ایجاد پتانسیل عمل، از شکل‌گیری و انتقال پتانسیل عمل مناسب جلوگیری می‌کنند (۲۴-۲۶). برای ایجاد مدل تجربی بیماری آلزایمر در جوندگان از تزریق داخل بطنی یا داخل هیپوکمپی بتا آمیلوئید استفاده می‌شود که بعد از گذشت یک هفته با اختلال یادگیری و حافظه همراه می‌باشد (۲۷).

موش‌های صحرایی به‌طور مؤثری به‌عنوان یک مدل در تحقیقات در زمینه علوم اعصاب به‌کار گرفته می‌شوند. همچنین درمورد مدل آلزایمر یکی از پرتعدادترین مدل‌ها می‌باشند. مدل‌های حیوانی همان‌طور که برای ارزیابی روش‌های درمانی برای بیماری در انسان سودمند هستند، برای شناخت

امر، نیاز به بررسی بیشتر و دقیق‌تر در این زمینه دارد. به‌طور خلاصه، نتایج مطالعه کنونی نشان‌دهنده این است که احتمالاً در موش‌های صحرایی که تحت مدل‌سازی بیماری آلزایمر قرار گرفته‌اند، درمان مزمن با متفورمین باعث افزایش حافظه در آزمون اجتنابی غیرفعال و درون شاتل باکس شده؛ ولی این درمان به‌طور مزمن اثری بر مدل حافظه فضایی در موش صحرایی نر ندارد. براساس این یافته‌ها و همچنین یافته‌های قبلی، احتمال دارد که داروی ضد دیابتی متفورمین به‌عنوان درمان بیماری آلزایمر و انواع بیماری‌های زوال عقل در انسان کاندید مناسبی باشد و بتوان با پیشرفت تحقیقات و همچنین افزایش داده‌ها در مورد نحوه پاتوفیزیولوژی، از آن به‌عنوان دارویی مؤثر بهره برد.

#### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجوی پزشکی مهدی نصیری، مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۳ می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه به‌انجام رسیده است که بدین وسیله تشکر می‌گردد.

#### منابع

1. Budson AE, Solomon PR. New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician. *Neurology* 2012; 18 (6): 356-63.
2. Green RC, Cupples LA, Go R, Benke KS, Edeki T, Griffith PA, et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2002; 2(87): 329-336.
3. Budson AE, Solomon PR. New diagnostic criteria for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment for the practical neurologist. *Practical Neurology* 2012; 12:88-96.
4. Holtzman DM, Mandelkew E, Selkoe DJ. Alzheimer disease in 2020. *Cold Spring Harb Perspect Medicine* 2012 1; 2(11): 136-140.

داروی ضد دیابتی متفورمین باعث القای فعالیت پروتئین فسفاتاز 2A (PP2A) و کاهش فسفوریلاسیون پروتئین تائو به‌صورت وابسته به اپی‌توپ‌های PP2A گردید (۲۸).

چندین مطالعه حیوانی از اثرات مثبت متفورمین حمایت می‌کنند. قبلاً نشان داده شده است که متفورمین باعث القای نورونز و افزایش حافظه فضایی در موش‌های صحرایی، کاهش استرس اکسیداتیو در مغز موش‌های صحرایی و مانع کاهش تکثیر سلولی و تمایز نوروبلاست‌ها در ناحیه ساب‌گرانولار شیار دندریت هیپوکامپ در موش‌های چاق دیابتی شده است (۲۹-۳۱). همچنین پیش‌درمانی حاد با متفورمین باعث نوروپروتکشن علیه ایسکمی مغزی متعاقب آن شده و درمان مزمن با متفورمین باعث بهبودی در دوره پس از حمله مغزی به‌وسیله افزایش آنژیوژنز گردید. این اثرات با واسطه AMPK فعال‌شده رخ می‌دهند (۳۲).

متفورمین یک داروی بسیار مؤثر ضد دیابتی بوده که گرچه مکانیسم‌هایی برای آن در نظر گرفته شده است؛ ولی مکانیسم اصلی آن هنوز مشخص نشده است. به‌علاوه در مطالعه ما مشخص نیست که متفورمین با چه مکانیسمی مانع کاهش حافظه در آزمون شاتل باکس در موش‌های آلزایمری شد. مشخص شدن این

5. Raffie E, Salemi Z, Ghaffari MA, Goodarzi MT. The effect of metformin, acarbose and their combination on visfatin level in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Daneshvar Journal* 2014; 22(113):53-62.
6. Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annual of Internal Medicine* 2004; 140: 627-638.
7. Labuzek K1, Liber S, Gabryel B, Adamczyk J, Okopień B. Metformin increases phagocytosis and acidifies lysosomal/endosomal compartments in AMPK-dependent manner in rat primary microglia. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2010; 381(2):171-86.



8. Abd-Elsameea AA, Moustaf AA, Mohamed AM. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/reperfusion. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2014; 18(16):2387-92.
9. Shafizadeh A, Rezaei A, Rahbani Nobar M, Mohajeri D, Rahmani J. The effect of metformin on serum glucose and lipid profiles and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Comparative Pathology* 1392, 10: 865-872.
10. Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, et al. Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A $\beta$ ) production under near-native conditions. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289 (3): 1540-1550.
11. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1992; 248:1122-1124.
12. Younkin SG. The role of A Beta 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology (Paris)* 1998; 92:289-292.
13. Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM, et al. Anti-A beta42- and anti-A beta40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116 (1): 193-201.
14. Zhang CE, Wei W, Liu YH, Peng JH, Tian Q, Liu GP, et al. Hyperhomocysteinemia Increases  $\beta$ -Amyloid by Enhancing Expression of  $\gamma$ -Secretase and Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein in Rat Brain. *The Australian Journal of Pharmacy* 2009; 174:4.
15. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free Radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease grain: Mechanisms and consequences. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10: 2651-2659.
16. Schubert D, Behl C, Lesley R, Brack A, Dargusch R, Sagara Y, et al. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92: 1989-1993.
17. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 2008; 106(1): 45-55.
18. Delmastro MM, Piganelli JD. Oxidative Stress and Redox Modulation Potential in Type 1 Diabetes. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 593863:1-15.
19. Moreira PI, Santos MS, Seiça R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *Journal of the Neurological Sciences* 2007; 257: 206-214.
20. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg HJ, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp 1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 1222-1226.
21. Roriz-Filho JS, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves MFL, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1792: 432-443.
22. Tay W, Huang D, Rosenberry T, Paravastu A. The Alzheimer's Amyloid- $\beta$ (1-42) Peptide Forms Off-Pathway Oligomers and Fibrils That Are Distinguished Structurally by Intermolecular Organization. *Journal of Molecular Biology* 2013; 425:2494-2508.
23. Pozueta J, Lefort R, Shelanski M. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* 2013; 251:51-65.
24. Vetrivel K, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010; 1801: 860-867.
25. Lal R, Lin H, Quist A. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* 2007; 1768: 1966-1975.
26. Grösgen S, Grimm M, Frieß P, Hartmann T. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010; 1801:966-974.
27. Kang EB, Cho JY. Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and  $\beta$ -amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2014; 18(1):89-96.

28. Wang J, Gallagher D, DeVito LM, Cancino GI, Tsui D, He L, et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell* 2012; 11:23-35.
29. Correia S, Carvalho C, Santos MS, Proença T, Nunes E, Duarte AI, et al. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Medicinal Chemistry* 2008; 4:358-64.
30. Hwang IK, Kim IY, Joo EJ, Shin JH, Choi JW, Won MH, et al. Metformin normalizes type 2 diabetes-induced decreases in cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat dentate gyrus. *Neurochemical Research* 2010; 35:645-50.
31. Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Shin JH, Choi JW, Won MH, et al. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171:3146-57.
32. Venna VR, Li J, Hammond MD, McCullough LD. Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke. *European Journal of Neuroscience* 2014; 39:2129-38.

Archive of SID