مقايسه تاثير تزريق داخل هيپوكامپ انسولين بر تثبيت حافظه در موش هاي سفيـــد بزرگ نر سالم و ديابتي

شيرين ببري[٢*و١]، حميد غلامي پور بديع[٢]، سعيد خامنه[٢و١]، مهدي اورديخاني سيدلر[٢] و هادي ابراهيمي[٢]

[١] مركز تحقيقات كاربردي داروئي، آزمايشگاه فيزيولوژي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز، [٢] دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز

تاريخ دريافت:٨۶/٩/٨ ، تاريخ پذيرش: ٨۶/۶/٢١

Comparison of intrahippocampal insulin injection on memory consolidation in normal and diabetic male rats

Babri Sh. *[1,2], Gholamipour Badie H. [2], Khameneh S.[1,2], Ordikhani Seydlar M.[2], Ebrahimi H.[2]

[1]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, [2] Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2007/9/11 , Accepted: 2007/11/29

Objectives: Diabetes mellitus is one of the most prevalent diseases in the world. High incidence of some impairment in cognitive tasks and memory formation in diabetics has resulted in many studies on the effect of insulin on central nervous system in recent years. There are evidences that indicate presence of numerous insulin receptors in some areas of central nervous system including cerebral cortex, olfactory bulb, hippocampus, cerebellum, and hypothalamus. Nevertheless, reports on the effects of insulin on memory formation are inconsistent and require more investigation to be clarified. Because, hippocampus is an important area for memory formation, the present study is scheduled to investigate the effect of insulin injection in CA1region of hippocampus on memory formation. **Methods:** Fifty male Wistar rats were divided into 5 equal groups. 1. Control 2. Sham operation 3. Insulin 4. diabetic/saline 5.diabetic/insulin. Groups 4 and 5 were made diabetic by treatment with streptozotocine (STZ) (50 mg/kg) intrapritoneally. In all but the control group, two canulae were stereotaxically implanted in CA1 region of hippocampus. Learning was tested and compared between groups through passive avoidance test. **Results:** Results showed that in the insulin group the latency increased and the time for staying in the dark compartment decreased as compared to control and sham groups ($p< 0.05$). Compared to diabetic/insulin group no significant difference was found with diabetic/saline group. **Conclusion:** In conclusion, according to the results obtained in this study, insulin facilitates memory in intact rats but not in diabetic animals. Increased latency in diabetic rats shows that probably their reaction to new environment or their sensitivity to pain has exaggerated.

Key word: *Diabetes, Insulin, Memory, Hippocampus*

زمينه و هدف: ديابت قندي يكي از شايعترين بيماريها در جهان است. بروز بالاي برخي اختلالات در اعمال شناختي و حافظه در بيماران ديابتي سبب شده است كه در سالهاي اخير مطالعات بيشتري در زمينه تاثير انسولين بر سيستم عصبي صورت بگيرد. برخي شواهد حاكي از اين است كه گيرنده هاي انسولين با تراكم زياد در برخي نواحي از سيستم عصبي شامل قشر مغز، پياز بويايي، هيپوكامپ، مخچه و هسته هاي هيپوتالاموس وجود دارند. اما موارد گزارش شده در ارتباط با تاثير انسولين بر حافظه تا حدودي ضد و نقيض بوده و نياز به مطالعه بيشتر در اين زمينه است . با توجه به اينكه هيپوكامپ ناحيه اي مهم در مغز براي تشكيل حافظه است از اينرو در اين مطالعه سعي بر اين است كه با تزريق موضعي انسولين در ناحيه CA1 هيپوكامپ اثر آنرا در تشكيل حافظه بررسي شود. **روشها:** پنجاه رت نر نژاد ويستار به ۵ گروه برابر تقسيم شدند.١.گروه كنترل ٢.گروه شاهد ٣. گروه انسولين ۴.گروه ديابتي- سالين۵.گروه ديابتي-انسولين. در گروه ۴ و ۵ رتها با تزريق ۵٠ mg/kg استروپتوزوسين ديابتي شده ودر دو گروه ده تايي مطالعه شدند. در تمام گروهها بجز گروه كنترل دو كانول بصورت دوطرفه در ناحيه CA1 هيپوكامپ توسط دستگاه استريوتاكسي كاشته شد. يادگيري با استفاده از اجتناب غير فعال تست ومابين گروهها مقايسه شد.**يافته ها:** نتايج بدست آمده نشان مي دهد كه گروه انسولين نسبت به گروه كنترل وشاهد ميزان تاخير بيشتر و زمان ماندگاري كمتر در محفظه تاريک داشت($p< 0.05$) . گروه ديابتي-انسولين نسبت به گروه ديابتي-سالين تفاوت معني داري از نظر ميزان تاخير نداشت. **نتيجه گيري:** نتايج اين مطالعه نشان مي دهد كه انسولين در رتهاي سالم باعث تسهيل حافظه مي شود. اما در رتهاي ديابتي فاقد چنين اثري است. افزايش اجتناب در رتهاي ديابتي نسبت به رتهاي سالم نشان مي دهد كه احتمالاً واكنش موشهاي سفيد بزرگ ديابتي نسبت به محيط جديد تشديد شده است و يا حساسيت به درد ناشي از شوک الكتريكي در اين حيوانات افزايش يافته است.

واژه هاي كليدي: ديابت، انسولين، حافظه، هيپوكامپ.

*نويسنده مسئول: دكتر شيرين ببري، استاديار دانشكده پزشكي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ٣٣۶۴۶۶۴- ٠۴١١، نمابر: ٣٣۶۴۶۶۴-٠۴١١

**Corresponding Author: Dr Shirin Babri, Assistant Professor, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tel0411- 3364664; Fax:0411- 3364664; E-mail: shirinb46@yahoo.com*

۱- مقدمه

ديابت قندي يكي از شايعترين بيماريها در جهان است. وجه مشخصه اين بيماري هيپرگليسمي ناشي از فقدان ترشح انسولين از سلولهاي بتا ي جزاير لانگرهانس يا مقاومت محيطي نسبت به انسولين مي باشد. اين بيماري در دراز مدت علاوه بر تاثير در عملكرد ارگانهايي نظير چشمها، كليه ها و سيستم قلبي عروقي، سيستم عصبي را نيز درگير مي سازد. بيماران ديابتي دچار اختلالات الكتروفيزيولوژيكي بوده و از برخي مشكلات مربوط به اعمال شناختي رنج مي برند (۱). آناليزهاي رفتاري و الكتروفيزيولوژيكي نشان داده اند كه ديابت منجر به نقص LTP (Long Term Potentiation) در هيپوكامپ شده و متعاقباً اختلالات شناختي را ايجاد مي كند (۲) .هيپوكامپ يكي از نواحي مهم سيستم عصبي مركزي در روند يادگيري و حافظه است (۳ ,۴)و اخيراً مشخص شده كه اين ناحيه نسبت به تغييرات بوجود آمده در غلظت گلوكز و انسولين حساس مي باشد (۶،۵،۲). گيرنده هاي انسولين در سطح وسيعي از مغز پراكنده شده اند و تراكم اين گيرنده ها در برخي نواحي از قبيل قشر مغزي، پياز بويايي، مخچه و هيپوتالاموس و به خصوص هيپو كامپ بيشتر است (۷). مطالعات صورت گرفته در خصوص نقش انسولين در سيستم عصبي مركزي حاكي از اين است كه انسولين نقش مهمي در اختلالات شناختي دارا است(۸). بر اساس چندين گزارش تجويز انسولين بصورت محيطي در جوندگان تاثير منفي بر روي حافظه داشته است(۹ ،۱۰، ۱۱). كرن و همكارانش نيز گزارش كردند كه انفوزيون محيطي انسولين تحت شرايط گليسمي نرمال (گلوكز خون در حد نرمال نگه داشته شده است) تقويت معني داري را در حافظه كلامي و توجه انتخابي ايجاد نمود (۱۲).

نتايج حاصل از برخي مطالعات ديگر حاكي از اين است كه تجويز داخل بيني انسولين مي تواند پردازش حافظه كاري را در انسانها تسهيل كند(۱۳ ،۱۴). همچنين برخي شواهد نيز بيانگر ارتباط بالقوه بين بيماري آلزايمر، غلظت گلوكز، فعاليت انسولين و عملكرد حافظه مي باشد و هيپرگليسمي و هيپرانسولينمي فراخواني حافظه را در بيماران مبتلا به آلزايمر اما نه در افراد سالم بهبود بخشيـده است (۱۱-۹). گزارشات موجود در زمينه تاثير تزريق موضعي انسولين بر حافظه در مطالعات حيواني متناقض مي باشد. Park و همكارانش گزارش كردند كه تجويز انسولين بداخل بطن سوم موشهاي صحرايي بلافاصله بعد از آموزش اجتنابي غير فعال اثر مثبت بر حافظه دارد (۱۵). در مقابل شوارزبرگ و همكارانش اعلام نمودند كه تجويز داخل بطني انسولين ۲۳ ساعت بعد از آموزش اثر منفي بر حافظه اجتنابي غير فعال دارد (۱۶). تزريق داخل هيپو كامپ انسولين تثبيت حافظه را در موشهاي صحرايي سالم بهبود مي بخشد (۱۷). با توجه به اينكه در بيماران ديابتي اختلال در عملكرد انسولين و يا گيـــــرنده هاي انسولين بوجود مي آيد (۱۸) مي توان گفت كه احتمالاً فقدان انسولين يكي از عوامل موثر در اختلال حافظه در اين بيماران مي باشد. بر همين اساس با توجه به گزارشات موجود در زمينه تاثير انسولين بر حافظه در حيوانات سالم اين تحقيق طرح ريزي شد تا اثر تجويز داخل هيپوكامپ انسولين به صورت حاد بر تثبيت حافظه در موشهاي صحرايي سالم وديابتي مقايسه شود. انتخاب هيپوكامپ به دليل كثرت رسپتورهاي انسولين در حوزه دندريتي سلولهاي پيراميدال ناحيه CA1 بود.

۲- مواد و روشها

۲-۱:حيوانات

جهت انجام آزمايشات از۵۰ موش صحرايي نر سفيد نژاد ويستار با وزن متوسط ۳۰۰-۲۵۰ گرم و سن۴-۳ ماه استفاده شد. موشها از مركز پرورش و نگهداري حيوانات آزمايشگاهي دانشگاه علوم پزشكي تبريز خريداري گرديده و پس از عمل استريوتاكسي، در حيوانخانه مركز تحقيقات كاربردي داروئي، در قفسهاي انفرادي و در شرايط استاندارد درجه حرارت ۲± ۲۲ ^{o}c و رطوبت ۷۰% و سيكل روشنايي تاريكي ۱۲ ساعته نگهداري شدند. حيوانات دسترسي آزادانه به آب و غذا داشته و از غذاي فشرده جهت تغذيه آنها استفاده شد. زمان انجام آزمايشات رفتاري بين ساعات ۸:۰۰ صبح تا ۱۴ :۰۰ بعد از ظهر بود.

۲-۲:ايجاد ديابت

داروي استريتوزوتوسين (STZ) ساخت شركت سيگما در نرمال سالين حل شده و بلافاصله بصورت تك دوز(۵۰mg/kg) در ناحيه صفاقي تزريق شد(۱۹). بعد از ۳ روز رتها به مدت ۱۲ ساعت ناشتا شدند و سپس نمونه خوني تحت بيهوشي بصورت داخل قلبي جمع آوري گرديد. نمونه هاي خوني به مدت ۱۰ دقيقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقيقه (rpm) سانتريفوژ شده و به روش آنزيماتيک با استفاده از كيت آزمايشگاهي پارس آزمون غلظت پلاسمايي گلوكز اندازه گيري شد. معيار ديابتي شدن قند خون بالاتر از mg/dl ۲۵۰بود (۲۰).

۲-۳:جراحي

موشهاي صحرايي بلافاصله پس از بيهوش شدن (كلرال هيدرات ۴۰۰mg/kg بصورت داخل صفاقي) در دستگاه استريوتاكسي قرار گرفتند تا عمل كاشت كانولها بصورت دو طرفي در ناحية CA1 هيپوكامپ بر روي آنها انجام گيرد. محلهاي قرار گيري كانولها با استفاده از مختصاتي كه از روي اطلس پاكسينو-واتسون تعيين شده بود (AP=-4.3mm، Lat=±4mm، VD=3.4mm) كه از مبدا برگما علامتگذاري شدند(۲۱). حيوانات پس از عمل جراحي، تا انتهاي دوره بهبودي و انجام آزمايشات رفتاري در قفس هاي انفرادي نگهداري شدند.

۲-۴:دستگاه شاتل باكس و حافظه اجتنابي غير فعال

براي تشكيل حافظه اجتنابي غير فعال در موشهاي صحرايي از دستگاه شاتل باكس استفاده شد. اين دستگاه شامل دو بخش محفظه و كنترل كننده مي‌باشد. محفظه از دو اتاقك مجزا تشكيل شده است كه توسط يك درب گيوتيني به ابعاد ۸×۸ سانتي‌متر از هم جدا شده است. در كف هر كدام از اين دو اتاقك ميله‌هايي به قطر ۳mm با فاصله ۱cm از هم قرار گرفته اند. ابعاد هر اتاقك ۲۰×۲۱×۳۰cm بوده و در بالاي محفظه روشن يك لامپ ۱۲ ولت ۱۰ وات قرار گرفته است. كنترل كننده دستگاه مدت، فركانس و شدت شوك را تعيين مي نمايد.

در مرحله عادت كردن موشها با فاصله ۳۰ دقيقه دو بار در دستگاه قرار گرفتند. در بار اول، موش در محفظة روشن قرار گرفته و درب گيوتيني پس از ۱۰ ثانيه باز شد و زمان وارد شدن موش به داخل محفظة تاريک ثبت گرديد. پس از وارد شدن موش به محفظة تاريک درب گيوتيني بسته شده و موش از محفظة تاريک خارج شد. اين مراحل ۳۰ دقيقه بعد دوباره تكرار گرديد. آموزش ۳۰ دقيقه پس از عادت مرحله دوم انجام گرفت. براي آموزش ابتدا موش صحرايي در قسمت روشن دستگاه قرار گرفته و ۱۰ ثانيه بعد درب گيوتيني بالا كشيده شد. زمان وارد شدن حيوان به محفظه تاريك ثبت گرديد (Initial Latency). پس از ورود حيوان، درب بسته شده و جريان الكتريكي با شدت ۱ ميلي آمپر و فركانس ۵۰ هرتز بمدت ۲ ثانيه از پاهاي حيوان عبور كرد (۲۲). بلافاصله پس از اعمال شوك، موش از محفظه تاريک برداشته شده ودر قفس انفرادي خود قرار داده شد .بعد از ۱۲۰ ثانيه موش مجدداً در قسمت روشن قرار گرفته و ۱۰ ثانيه بعد درب گيوتيني بالا كشيده شد، در صورتي كه در طول مدت۱۲۰ ثانيه موش وارد محفظه تاريک نمي شد آزمايش متوقف شده و موش به قفس انفرادي خود انتقال داده مي شد. در صورت وارد شدن موشها به محفظه تاريک شوک دوباره دريافت مي كردند و بعد از سه بار تكرار آزمايش اگر موش قادر به فراگيري وظيفه نمي شد، از دور آزمايشات حذف مي شد. لازم به ذكر است حيواناتيكه در آنها طول مدت تاخير اوليـه از ۱۲۰ ثانيه تجاوز مي كرد از دور آزمايشات حذف مي شدند.

بلافاصله بعد از آموزش تزريقات به ناحيه CA1 انجام شد. تزريق انسولين با دوز۴mU و سالين با استفاده از سرنگ هاميلتون ۵ ميكروليتري از راه كانولهاي هدايتي در ناحيه Dorsal hippocampus CA1 انجام گرفت. حجـــم داروي تزريق شده در هر طرف ۲ميكروليتر بود كه درمدت زمان ۲ دقيقه انجام مي شد. ۲۴ ساعت پس از آموزش جهت بررسي ميزان تثبيت حافظه اجتنابي غير فعال حيوانات مورد تست قرار گرفتند. در اين مرحله حيوانات در محفظه روشن قرار گرفته و ۱۰ ثانيه بعد، درب گيوتيني باز شد. پارامترهايي كه در اين مطالعه جهت بررسي حافظه اجتنابي غير فعال مورد ارزيابي قرار گرفتند عبارتند از: ۱- ميزان تاخير اوليه (Initial Latency) ۲- ميزان تاخير در زمان تـست (Step Through Latency) ۳- كل مدت زمان سپري شده در محفظه تاريک دستگاه در مدت ۱۰ دقيقه (Time in Dark Compartment).

۲-۵:آزمايشات

آزمايش ۱: هدف از اين آزمايش تعيين اثر تزريق بعد از آموزش انسولين بداخل هيپوكامپ روي تثبيت حافظه اجتنابي غير فعال در رتهاي سالم بود. به همين منظور ۳۰ رت در سه گروه ده تايي قرار داده شدند. گروه كنترل (CNTL) در دستگاه شاتل باكس آموزش يافته و ۲۴ ساعت بعد تست شدند. گروه شاهد (Sham) بلافاصله بعد از آموزش ۲µl سالين دريافت كرده و ۲۴ ساعت بعد تست شدند. گروه انسولين بلافاصله بعد از آموزش ۴mU انسولين دريافت كرده و ۲۴ ساعت بعد تست شدند.

آزمايش ۲: هدف از اين آزمايش تعيين اثر تزريق بعد از آموزش انسولين بداخل هيپوكامپ روي تثبيت حافظه اجتنابي غير فعال در رتهاي ديابتي بود. به همين منظور ۲۰ رت در دو گروه ده تايي قرار گرفتند. گروه ديابتي- سالينيDS) يک هفته بعد از القاء ديابت آموزش ديده و بلافاصله بعد از آموزش ۲µl سالين دريافت كرده و ۲۴ ساعت بعد تست شدند. گروه ديابتي- انسوليني (DI) يک هفته بعد از القاء ديابت آموزش ديده و بلافاصله بعد از آموزش ۴mU انسولين دريافت كرده و ۲۴ ساعت بعد تست شدند.

۲-۶:مطالعه بافتي

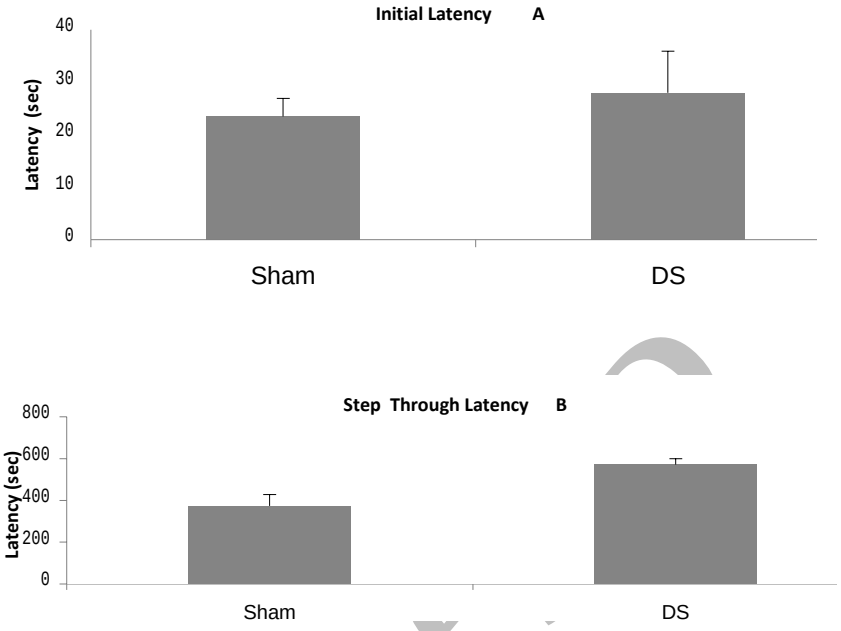
پس از اتمام هر آزمايش، حيوانات توسط دوز بالاي هيدرات كلرال كشته شدند و مغز آنها به مدت يک هفته در محلول فرمالين ۱۰ در صد قرار داده شد. سپس برشهايي با ضخامت ۱۰۰ ميكرومتر تهيه گشته و پس از رنگ آميزي، تحت مطالعه بافت شناسي قرار گرفتند و صحت محل ورود كانولها از روي اطلس پاكسينوس تاييد شد و در صورت عدم تطابق داده هاي هر حيوان حذف مي گرديد.

۲-۷:آناليز دادها

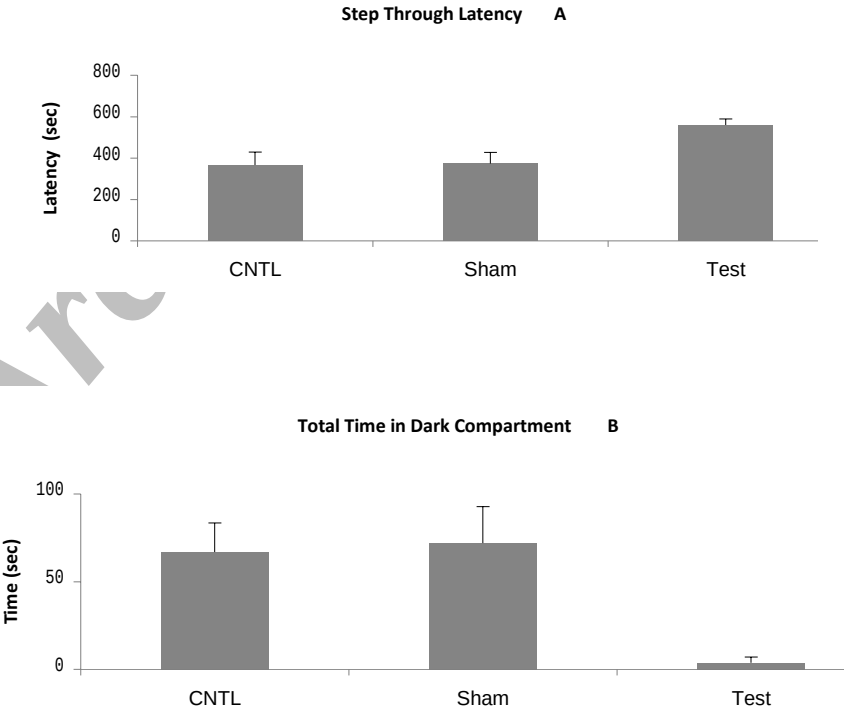
جهت مقايسه گروهها با همديگر و تشخيص معني‌دار بودن تفاوت بيـــن گروه هاي مورد آزمايش از روش آناليز واريانس يک طرفه (one way ANOVA) استفاده گرديد و در صورت وجود تفاوت معني دار جهت مقايسه داخل گروهي آناليز (post-hoc) Tukey multiple comparison به كار رفت. در مواردي كه لازم بودمقايسه دو گروه با همديگر صورت گيرد از روشT-TEST independent-samples استفاده شد. در كليه آزمايشات براي معني دار بودن نتايج، ميزان p كمتر از ۰/۰۵ لحاظ شده و داده ها به صورت mean ± SEM بيان شدند.

٣-نتايج

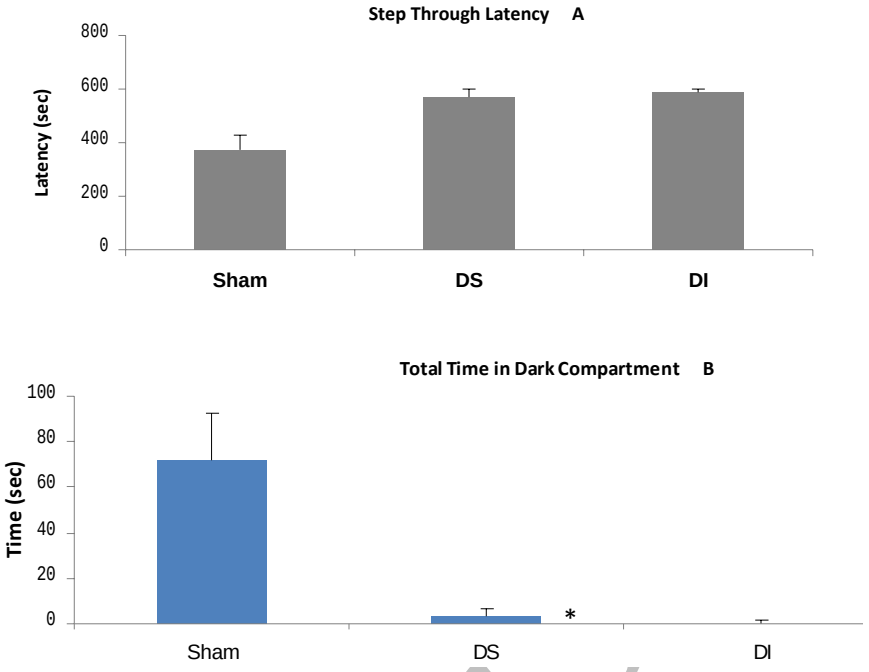
آناليز آماري نشان داد كه با تزريق استرپتوزوتوسين و ايجاد ديابت در گروه ديابتي افزايش معني داري$P < 0.001$ در سطح پلاسمايي گلوكز (١٢± ٢٩٩/٨ ميلي گرم در دسي ليتر) نسبت به گروه سالم (٥ ± ٤ / ١٠٤ ميلي گرم در دسي ليتر) ايجاد شد كه نشان دهنده بروز ديابت در گروه ديابتي بود. مقايسه بين گروهي اختلاف معني داري را در ميزان تاخير اوليه يا تاخير قبل از اكتساب آزمايش بين دو گروه ديابتي- سالينيDS) و گروه شاهد نشان نداد (نمودار ١A). گروه ديابتي- سالينيافزايش تاخير معني داري را در زمان تست نسبت به گروه شاهد داشت ($p<0.05$) كه نشانگر تاثير ديابت بر زمان تاخير براي ورود به محفظه تاريک است (نمودار ١B). مقايسه بين گروهي نشان داد كه تفاوت معني داري بين گروهها در مورد ميزان تاخير در زمان تست و كل مدت زمان سپري شده در محفظه تاريک وجود دارد ($P<0.001$) (نمودار ٢). مقايسه داخل گروهي نشان داد كه بين گروه كنترل (٦٢/٧ ± ٣٦٦/٦ ثانيه) وگروه شم (٥٤/١± ٥ /٣٧٣ ثانيه) اختلاف معني داري وجود ندارد. اين عدم اختلاف معني دار نشان مي دهد كه تزريق سالين در ناحيه CA1 هيپوكامپ اثري بر ميزان تاخير نداشته است. مقايسه گروه تست با گروه كنترل و گروه شم نشان داد كه بين گروه تست (٢٩ ± ٥٦٠/١ ثانيه) با گروه كنـــــترل (٧ /٦٢± ٣٦٦/٦ ثانيه) و گروه شم (٥٤/١± ٥ /٣٧٣ ثانيه) اختلاف معني داري ($p<0.05$) وجود دارد كه حاكي از افزايش ميزان تاخير توسط انسولين است (نمودار٢A). مقايسه داخل گروهي نشان داد كه گروه كنترل (١٦/٦ ± ٦٦/٩ ثانيه) و گروه شاهد (٢٠/٨ ± ٧٢ ثانيه) اختلاف معني داري را نسبت به هم نشان ندادند. اين نتيجه نشان دهنده اين است كه تزريق سالين در ناحيه CA1 هيپوكامپ اثري بر ميزان تاخير نداشته است. البته بين گروه تست (٣/٢ ± ٣/٨ ثانيه) با گروه كنترل و گروه شم اختلاف معني داري ($p<0.01$) وجود داشت. به اين ترتيب نتايج به دست آمده در اين بخش كاهش ميزان زمان سپري شده در منطقه تاريک در گروهي كه انسولين دريافت كرده است را نـــــشان مي دهد (نمودار ٢B). آناليز نتايج بدست آمده در مورد موشهاي ديابتي شده تفاوت معني داري را بين گروهها نشان داد $P<0.001$). مقايسه داخل گروهي حاكي از اين بود كه بين گروه شم (٥٤/١ ± ٣٧٣/٥ ثانيه) با گروه ديابتي-سالينيي (٢٩/٩± ٥٧٠/١ ثانيه) و گروه ديابتي-انسولينيي (١٢ ± ٥٨٨ ثانيه) اختلاف معني داري به ترتيب $p<0.05$ و $p<0.01$ وجود داشته كه نشان دهنده افزايش ميزان تاخير در حيوانات ديابتي نسبت به حيوانات سالم است (نمودار ٣A). تفاوت معني داري در زمان تاخير بين گروه ديابتي-سالينيي و گروه ديابتي-انسولينيي مشاهده نشد (نمودار ٣A) كه حاكي ازعدم تاثير انسولين بر حافظه اجتنابي در موشهاي ديابتي است. مقايسه بين گروهي در رابطه با كل زمان سپري شده در ناحيه تاريک دستگاه شاتل باكس (time in dark compartment) حاكي از اين بود كه اختلاف بين گروهي معني داري ($P<0.001$) ميان گروهها وجود داشت (نمودار ٣B). مقايسه داخل گروهي نشان داد كه بين گروه شم (٢٠/٨± ٧٢ ثانيه) با گروه ديابتي-سالينيي (٣/٣ ± ٣/٣ ثانيه) وبا گروه ديابتي- انسولينيي (٠/٣ ± ٠/٣ ثانيه) اختلاف معني داري ($p<0.01$) وجود داشته است. اين نتايج نشان مي دهند كه زمان سپري شده در محفظه تاريک در گروه ديابتي اعم از آنهايي كه سالين يا انسولين دريافت كرده اند، كاهش يافته است كه سازگار با تسهيل اجتناب از محل اعمال شوک در موشهاي ديابتي است. مقايسه زمان سپري شده در محفظه تاريک بين دو گروه ديابتي- سالينيي و ديابتي-انسولينيي حاكي از اين بود كه گروه ديابتي- انسولينيي كاهش بيشتري دراين زمان نسبت به گروه ديابتي- سالينيي داشته است، اما اين كاهش در حد معني دار نبود. اين پديده نشان مي دهد كه ظاهراً انسولين قادر به افزايش اين زمان در گروه آزمايشي ديابت نيست و در نتيجه فاقد اثر بر حافظه اجتنابي است (نمودار٣B).



نمودار ١: مقايسه زمان تاخير اوليه (A) و تاخير در زمان تست (B) بين گروه شاهد و گروه ديابتي كه به آنها سالين تجويز شده است. Sham: گروه شاهد، DS: گروه ديابتي-سالينى.* نشاندهنده تفات معني دار بين گروه شاهد و ديابتي سالينى است ($p<0.05$)



نمودار٢: اثر تزريق داخل هيپوكامپ انسولين بر ميزان تاخير (A) و زمان سپري شده در منطقه تاريک (B) در مرحله تست در گروه تست (Test) در مقايسه با گروههاي كنترل(CNTL) وشاهد (Sham) .* تفاوت معني دار بين گروه تست با گروههاي كنترل وشاهد است ($P<0.05$). داده ها به صورت mean ± SEM بيان شده اند($n=١٠$).



نمودار ٣: اثر انسولين بر ميزان تاخير (A) و زمان سپري شده در منطقه تاريک (B) در مرحله تست در گروه شاهد (Sham) در مقايسه با گروههاي ديابتي- سالينی(DS) وديابتي- انسولينی (DI). * تفاوت معني دار بين گروه شاهد با گروههاي ديابتي- سالينی و ديابتي- انسولينی ($p<0.01$) است. داده ها به صورت mean ± SEM بيان شده اند.(n=١٠)

۴- بحث

نتايج به دست آمده از اين مطالعه حاكي از اين است كه حيواناتي كه بعد از اعمال شوك بر آنها، انسولين دريافت كردند ميزان تاخير بيشتري در روز تست براي وارد شدن به محفظه تاريك شاتل باكس نسبت به حيوانات دريافت كننده سالين و حيوانات گروه كنترل (كه هيچ تزريقي در آنها صورت نگرفته) داشته اند. پس مي توان اذعان نمود كه انسولين قادر به تسهيل حافظه اجتنابي غير فعال در موشهاي صحرايي سالم مي باشد. اين اثر ظاهراً ناشي از اثر غير اختصاصي تزريقهاي داخل هيپوكامپي نيست، بخاطر اينكه هيچ اثري از تزريق سالين ديده نشد. بعلاوه اثر نمي‌تواند به نقص حسي يا حركتي مربوط به انسولين نسبت داده شود، بخاطر اينكه انسولين در طي آزمايش اجتنابي وجود ندارد، همچنين اثر نمي‌تواند به افزايش در واكنش پذيري ناشي از افزايش در حساسيت به درد (ناشي از انسولين) ربط داده شود بخاطر اينكه هورمون بعد از اعمال شوك به حيوان داده شد. بعلاوه با استناد بر مطالعه Park (١٥) اين اثر تزريق بعد از آموزش (Post training) پيشنهاد مي‌كند كه انسولين ممكن است تثبيت حافظه را براي اين نوع از آموزش تحت تاثير قرار دهد. بطور كلي بهبود عملكرد ديده شده در اين مطالعه با چندين مطالعه مطابقت داشته در حاليكه با برخي ديگر عدم تطابق دارد.

Barrati و kopf گزارش كرده‌اند كه تزريق داخل صفاقي انسولين حافظه اجتنابي غير فعال را در موشها مختل مي‌سازد (٩) و شوارزبرگ گزارش داده كه تزريق انسولين داخل بطن مغزي حافظه اجتنابي غير فعال را دچار نقص مي‌كند (١۶).

Blanchard و Duncan گزارش كرده‌اند كه تزريق داخل صفاقي انسولين اثري بر فراگيري وظيفه در ماز بازويي شعايي ندارد (٢٣). البته دوز انسولين بكار رفته در اين مطالعه اثري بر مقدار گلوكز خون نداشته است و بنابراين ممكن است سطح انسولين پلاسما را بقدر كافي جهت افزايش بارز مقدار انسولين در سيستم عصبي مركزي بالا نبرده باشد. Palovick و همكارانش افزايش خفيفي در ميزان تخليه سلولهاي CA1 هيپوكامپي را زماني كه يك برش هيپوكامپي در غلظت بالايي از انسولين غوطه ور مي شود، گزارش كردند در حاليكه ميزان تخليه در غلظتهاي پائينتر انسولين كاهش يافته بود (٢۴). بطور مشابه، غلظتهاي متفاوت انسولين ممكن است فرايندهاي اثر گذارنده بر حافظه را در جهات مختلف تنظيم كنند، كه سازگار با اثرات مختلف فيزيولوژيكي به دست آمده است. از اينرو سمت يا جهت اثر انسولين بر حافظه ممكن است به مقدار عبور آن از سد خوني مغز بستگي داشته باشد. بر اساس يک بررسي كه اخيرا صورت گرفته گزارش شده كه تزريق داخل هيپوكامپ انسولين در دوزهاي متفاوت اثرات متفاوت بر حافظه فضايي داشته است (٢۵).

در اينجا توصيف هر مكانيسم كه انسولين ممكن است عمل حافظه را از آن طريق تنظيم كند كاملاً جنبه فرضي دارد. البته بديهي است كه روشهاي چندي وجود دارد كه در آن هيپوكامپ مي‌تواند تحت تاثير انسولين قرار گيرد. گلوكز منبع عمده انرژي براي سلولهاي عصبي بوده و نقش كليدي در اعمال شناختي مغز دارد (۲۶) ولي برداشت، انتقال واستفاده از آن در در بخش عمده اي از مغز وابسته به انسولين نيست (۱۸). احتمال اينكه بهبود حافظه توسط انسولين از اثر مستقيم بر متابوليسم گلوكز در مغز ناشي شود ضعيف است اما اخيرا گزارش شده كه علاوه بر دو انتقال دهنده (Glucose Transporter) اصلي گلوكز در مغز كهGluT1 و GluT3 هستند وهر دو بصورت غير وابسته به انسولين گلوكز را بداخل سلول انتقال مي دهند (۲۷) دو انتقال دهنده ديگر كه حساس به انسولين مي باشند GLUT4 وGLUT8 در چندين ناحيه از مغز به خصوص مناطقي كه داراي گيرنده هاي مربوط به انسولين هستند از جمله هيپوكامپ يافت شده اند (۲۸). احتمال داده مي شود كه در شرايط فيزيولوژيک فعال شدن گيـــــرنده هاي انسوليني در سلولهاي عصبي موجب تحريک GLUT4 و GLUT8 در سلولهاي هيپوكامپ شود واز اين طريق اثرات انسولين بر روندهاي شناختي اعمال گردد (۲۹و۳۰) و در بيماران ديابتي انتقال ناقل هاي فوق به غشا سلولي در سلولهاي هيپو كامپ كاهش يافته و دچار اختـــلال مي گردد و احتمالاً بخشي از نقص مربوط به روندهاي شناختي وحافظه ناشي از اين عامل مي باشد (۳۰-۲۸). مكانيسمهاي احتمالي ديگري كه انسولين از طريق آنها در روند تشكيل حافظه موثـــــر مي باشد عبارتند از: ۱- اثر بر رسپتورهاي NMDA و AMPA (۱۸) ۲- اثر بر رسپتورهاي GABA (۱۸) ۳- ازطريق فعاليت مولكولهايي كه در مسير آبشار داخل سلولي ناشي از فعال شدن رسپتور انسولين شركت مي كنند از قبيل MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ، PKC (Protein Kinase C)، PKB (Protein Kinase B)، NO، (۳۲) ۴- اثر بر فعاليت آدرنرژيک (۳۲) ۵- اثر بر فعاليت كولينرژيک (۳۳).

در آزمايشات حيوانات ديابتي بر اساس نتايج بدست آمده، تجويز انسولين بعد از اعمال شوك، ميزان تاخير براي وارد شدن به محفظه تاريك دستگاه را نسبت به حيوانات غير ديابتي كه بعد از اعمال شوك سالين دريافت كرده‌اند افزايش داده است. درمقايسه دو گروه ديابتي كه سالين و انسولين دريافت كرده‌اند، اين نكته مكشوف است كه بين دو گروه اختلاف معني داري وجود ندارد و انسولين نتوانسته است كه در گروه ديابتي حافظه را افزايش دهد. همچنين با مقايسه گروه ديابتي كه سالين دريافت كرده‌اند با گروه سالم كه سالين دريافت كرده‌اند پي مي بريم كه ديابت حافظه را تسهيل كرده است كه با مطالعات قبلي سازگاري و ناسازگاريهايي را نشان مي‌دهد.

در مورد اثر ديابت بر روي حافظه اجتنابي غير فعال نتايج متناقضي از مطالعات گذشته بدست آمده است. در سال ۲۰۰۳ توسط Baydas و همكارانش گزارش شده است كه ديابت ميزان تاخير را درموشهاي ديابتي نسبت به موشهاي سالم كاهش داده است كه نشان دهنده نقص حافظه اجتنابي است (۳۴).

مطالعات چندي هم وجود دارند كه عنوان كرده‌اند حافظه اجتنابي غير فعال در رتها و موشهاي ديابتي تسهيل مي‌شود نتايج بدست آمده از مطالعه ما سازگار با چندين مطالعه است (۳۷-۳۵). تفاوت در نتايج مي‌تواند به علت اختلاف در طول مدت ديابتي شدن و در نوع گونه‌اي باشد اگرچه يك عامل كليدي مي‌تواند ماهيت محركي باشد كه در اين مطالعات بكار گرفته شده است. شواهدي وجود دارند كه نشان مي دهند محركهاي استرس‌زا كه اغلب بخشي از الگوهاي يادگيري هستند، پاسخهاي فيزيولوژيك بزرگتري را در موشهاي ديابتي شده باSTZ نسبت به جوندگان غير ديابتي ايجاد مي‌كنند (۳۷). در موشهاي ديابتي پارامترهاي نوروفيزيولوژيكي گوناگوني نظير انسان مبتلا به ديابت مختل مي‌شوند. تغييرات ديناميك در قدرت سيناپسي احتمالاً اساس سلولي را براي ذخيره اطلاعات در مغز ايجاد مي‌كند. الگوي پيچيده‌اي از تغييرات در شكل پذيري سيناپسي در برشهاي هيپوكامپي از موشهاي ديابتي STZ مشاهده شده است. نقصي در بيان LTP وابسته به NMDA در حوزه CA1 بتدريج پيشرفت و ۱۰ هفته بعد از القا ديابت به ماكزيمم خود مي‌رسد (۳۸). بر عكس LTP بيان LTD (Long Term Depression) در حوزه CA1 بعد از تحريك با فركانس كم برشهاي هيپوكامپي از موشهاي ديابتي افزايش مي‌يابد (۳۹). در برشهاي هيپوكامپي موشهاي ديابتي عمل پيش سيناپسي ظاهراً به ميزان زيادي حفظ مي‌شود بنابراين نقص در شكل پذيري سيناپسي احتمالاً ماهيت پس سيناپسي دارد كه تحريك پذيري سيناپسي يا آبشار سيگنالينگ داخل سلولي دخيل در القاء LTP و LTD يا هر دو را در گير مي‌سازد (۴۰). موريسون و همكارانش گزارش كردند كه مدت كوتاهي بعد از درمان موشها با STZ حساسيت برش هيپوكامپي به آدنوزين، به علت فقدان فرايند برداشت نوكلئوزيد، به ميزان زيادي افزايش مي يابد كه اختلالي در اعمال تنظيمي آدنوزين آندوژن بر روي دامنه بيان LTP ايجاد مي كند (۴۱). بنابراين اگر تغيير در حساسيت به آدنوزين براي ماهها به جاي روزها ادامه يابد ممكن است نقشي را در نقص LTP در اين حيوانات ايفا كند. بعد از سه ماه از ديابت كاهش مشخصي (حدود۴۰%) در ساب يونيت NR2A رسپتور NMDA ايجاد مي شود (۴۲). بعلاوه فسفريلاسيون NR2A/B توسط پروتئين كيناز II وابسته به كالمودولين- كلسيم ناشي از ديابت كاهش مي‌يابد (۴۲). پيشنهاد شده است كه اين تغييرات مربوط به رسپتور NMDA اساس اختلالات LTP است.

انسولين درماني مي‌تواند از پيشرفت تغييرات LTP جلوگيري كند. بدين طريق بر يادگيري اثر بگذارد (۴۳).

۵- نتيجه گيري

انسولين نقش مهمي را در روند يادگيري وحافظه دارا است. نتايج حاصل از اين تحقيق حاكي از تاثير مثبت انسولين بر تثبيت حافظه در هيپوكامپ موشهاي صحرايي سالم مي باشد. همچنين مطالعاتي كه توسط ديگران برحافظه فضايي در هيپوكامپ صورت گرفته مؤيد تاثير انسولين بر حافظه در اين ناحيه است (۲۵). اما بر اساس شواهد حاصل از اين تحقيق تجويز حاد انسولين در ناحيه هيپوكامپ در موشهاي صحرايي ديابتي شده با استريتوزوتوسين تاثيري بر حافظه نداشت. اين مسئله احتمالاً ناشي از اختلال در مكانيسمهاي داخل سلولي مربوط به انسولين در موشهاي ديابتي و يا اختلال در گيـــرنده هاي انسولين در سيستم عصبي مركزي اين حيوانات است. تحقيقات بيشتر در مورد مكانيسم هاي درگير در اين مورد به ابداع روشهاي درماني جديد جهت جلوگيري ازاختلال حافظه در افراد ديابتي و همچنين بيماران مبتلا به آلزايمركمک خواهد نمود.

۶- تقدير وتشكر

نويسندگان اين مقاله از همكاري هاي صميمانه پرسنل محترم آزمايشگاه فيزيولوژي و مسوولين محترم مركز تحقيقات كاربردي- داروئي دانشگاه علوم پزشكي تبريز در انجام اين طرح تحقيقاتي، نهايت سپاس را دارند.

7-Reference:

1. Di Mario U., Morano S., Valle E., Pozzesser G. Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus. Diabetes / Metabolism Rev., 1995, 11: 259–278.
2. Gispen W.H., Biessels G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends in Neurosci., 2000, 23 : 542–549.
3. Bliss T. V. P., Collingridge G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 1993, 361: 31–39.
4. Samsonovich A. V., Ascoli G. A. Simple neural network model of the hippocampus suggesting its pathfinding role in episodic memory retrieval. Learning and Memory, 2005, 12:193–208.
5. McNay E. C., McCarty R. C., Gold P. E. Fluctuation in brain glucose concentration during behavioral testing: dissociation between brain areas and between brain and blood. Neurobio. Learn. Mem., 2001, 75: 325–337.
6. McNay E. C., Gold P. E. Food for thought: Fluctuation in the brain extracellular glucose provides insight into mechanisms of memory modulation. Behavior and Cognition Neuroscience Reviews, 2002, 1: 264–280.
7. Unger J.W., Livingston J.N., Moss A.M. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signaling mechanisms and functional aspects. Prog Neurob., 1991, 36: 343-62.
8. Park C. R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. Neurosci. Biobehav. Reviews, 2001, 25: 311–323.
9. Kopf S.R., Baratti C.M. Memory modulation by post-training glucose or insulin remains evident at long retention intervals. Neurobiol Learn Mem., 1996, 65:189–191.
10. Kopf S.R., Boccia M.M., Baratti C.M. AF-DX 116, a presynaptic muscarinic receptor antagonist, potentiates the effects of glucose and reverses the effects of insulin on memory. Neurobiol. Learn. Mem., 1998, 70: 305–313.
11. Santucci A.C., Schroeder H., Riccio D.C., Homeostatic disruption and memory: effect of insulin administration in rats. Behavioral & Neural Biology, 1990, 53: 321–333.
12. Kern W., Peters A., Fruehwald-Schultes B., Deininger E., Born J., Fehm H.L., Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. Neuroendocrinology, 2001, 74: 270– 280.
13. Benedict C., Hallschmid M., Hatke A., Fehm H.L., Born J., Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. Psychoneuroendocrinology,2004, 29: 1326–1334.
14. Stockhors U., Fries D., Steingrueber H. J., Scherbaum W. A. Insulin and the CNS: effects on food uptake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in human. Physiol. Behav., 2004, 83: 47–54.
15. Park C., Seeley R.J., Craft S., Woods S.C. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. Physiol. Behav., 2000, 68: 509–514.
16. Schwarzberg H., Bernstein H.G., Reiser M., Gunther O. Intracerebroventricular
administration of insulin attenuates retrieval of a passive avoidance response in rats. Neuropeptides, 1989, 13:79–81.
17. Babri S., Gholamipour Badie H., Khamenei S., Ordikhani Seyedlar M. Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats.Brain & Cognition,2007,64:86-91.
18. Zhao W.Q., Chen H., Quon M.J., Alkon D.L. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. Eur. J. Pharmacol., 2004, 490: 71–81.
19. Basnet P., Kadota S., Shimizu M., Namba T., Bellidifolin. A potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from Swertia japonica. Planta Med., 1994, 60: 507–511.
20. Banskota A.H., Nguyen N.T., Tezuka Y., Nobukawa T., Kadota S. Hypoglycemic effects of the wood of Taxus yunnanensis on streptozotocin-induced diabetic rats and its active components. Phytomedicine, 2006, 13: 109–114.
21. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Vol.2, Acad. Press, New York, (1986).
22. Birge S.J. Is there a role for estrogen replacement therapy in the prevention and treatment of dementia? J of the American Geriatric Society, 1996, 44:865-870.
23. Blanchard J.G., Duncan P.M. Effect of combinations of insulin, glucose and scopolamine on radial arm maze performance. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1997, 58: 209–14.

24. Phillips M.I., Palovcik R.A. Dose–response testing of peptides by hippocampal
brain slice recording. Methods in Enzymology, 1989, 168: 129–44.
25. Moosavi M., Naghdi N., Maghsoodi N., Zahedi Asl S. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. Hormones and Behavior, 2006, 50: 748–752.
26. McNay E. C., Gold P. E. Food for thought: Fluctuation in the brain extracellular glucose provides insight into mechanisms of memory modulation. Behavior and Cognition Neuroscience Reviews, 2002, 1: 264–280.
27. Duelli R., Kuschinsky W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. News in Physiological Sciences, 2001, 16: 71–76.
28. McEwen B. S., Reagan L. P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur. J. Pharmacol., 2004, 90: 13–24.
29. Piroli G. C., Grillo C. A., Hoskin E. K., Znamensky V., Katz E. B., Milner
T. A. Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUT8 glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. Journal of Comparative Neurology, 2002, 452: 103–114.
30. Piroli G. C., Grillo C. A., Charron M. J., McEwen B. S., Reagan L. P.Biphasic effects of stress upon GLUT8 glucose transporter expression and trafficking in the diabetic rat hippocampus. Brain Research, 2004, 1006: 28–35.
31. Liao G.Y., Leonard J.P. Insulin modulation of cloned mouseNMDA receptor currents in Xenopus oocytes. Journal of Neurochemistry, 1999, 73: 1510–1519.
32. Watson G.S., Bernhardt T., Reger M.A., Cholerton B.A., Baker L.D., Peskind E.R., Asthana S., Plymate S.R., Fr¨olich L., Craft S. Insulin effects on CSF norepinephrine and cognition in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging, 2006, 27: 38–41.
33. Ragozzino M.E., Unick K.E., Gold P.E. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. Proceeding of the National Academy of Sciences U. S. A., 1996, 93: 4693–4698.
34. Baydas G., Nedzvetskii V.S., Nerush P.A. ,Kirichenko S.V., Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Life science, 2003, 29: 1907-16.
35. Bellush L.L., Rowland N.E. Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: biochemical correlates of passive avoidance learning. Behavioral Neurosci., 1989,103: 144–150.
36. Flood J.F., Mooradian A.D., Morley J.E. Characteristics of learning and memory in streptozocin-induced diabetic mice. Diabetes, 1990, 39: 1391–1398.
37. Rowland N.E., Bellush L.L. Diabetes mellitus: stress, neurochemistry and behavior. Neurosci. Biobehav. Reviews, 1989, 13:199–206.
38. Biessels G.J., Kamal A., Ramakers G.M., Urban I.J., Spruijt B.M., Erkelens D.W.,Gispen W.H. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes, 1996, 45:1259–1266.
39. Kamal A., Biessels G.J., Urban I.J.A., Gispen W.H. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. Neurosci., 1999, 90:737–745.
40. Chabot C., Massicotte G., Milot M., Trudeau F., Gange J. Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. Brain research, 1997, 768: 249-256.
41. Morrison P.D., Mackinnon M.W., Bartrup J.T., Skett P.G., Stone T.W. Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. British J Pharmacol., 1992,105:1004–1008.
42. Di Luca M., Ruts L., Gardoni F., Cattabeni F., Biessels G.J., Gispen W.H. NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia, 1999, 42: 693–701.
43. Biessels G.J., Cristino N.A., Rutten G.J., Hamers F.P.T., Erkelens D.W., Gispen W.H. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats: course of development and effects of insulin treatment. Brain, 1999, 122: 757–768.