اثرات تزریق داخل بطنی دوزهای مختلف انسولین بر حافظه فضایی در رتهای نر سالم نژاد ویستار

وحید حاج علی[۱و۲]، گیسو محدث*[۱و۲]، شیرین ببری[۱و۲]

[۱]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۲]دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۹ ، تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۲۱

Effects of intracerebroventricular injection of different doses of insulin on spatial memory in healthy male Wistar rats

Haj-Ali V.[1, 2], *Mohaddes G.[1, 2], Babri Sh.[1, 2]

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

Received: 2007/12/30, Accepted: 2008/2/10

Objective: As one of the best known protein hormones, insulin has been recognized to play key roles in a variety of important biological process. Insulin acts on peripheral target tissues such as the adipocyte, muscle and liver to regulate glucose homeostasis. In addition to its peripheral functions, insulin and its receptor have been detected in central nervous system (CNS). Some of its effects on cognitive behaviors especially on learning and memory have been reported. **Methods:** Sixty male Wistar rats were divided into 6 groups randomly (n=10). All groups underwent a stereotaxic surgery and a canula was implanted in their third ventricle. Saline and different doses of Insulin (2, 4,8,16 and 32 mU) were injected intracerebroventricularly. Behavioral tests carried out in Morris water maze 30 min and 24 h after injections. **Results:** Our results demonstrated that the low and intermediate doses of insulin (2, 4, 8, 16 mU) showed no significant differences in escape latency and distance traveled to find hidden platform, while higher dose (32 mU) decreased these two parameters significantly. In the probe trial also those groups that received higher doses of insulin (16, 32 mu) spent more time in the target quadrant comparing with sham group. **Conclusion:** The present study suggests that intracerebroventricular administration of insulin affect memory dose dependently and higher doses improve spatial learning and memory.

Key words: *Spatial memory; Insulin; ICV injection; rat.*

زمینه و هدف: انسولین به عنوان یکی از معروفترین هورمو نهای پپتیدی که در بسیاری از فرآیندهای مهم بیولوژیکی شرکت می کند شناخته شده است.انسولین بر روی بافتهای هدف محیطی از قبیل بافت چربی، عضله و کبد جهت برقراری هومئوستاز گلوکز عمل می کند. علاوه بر این انسولین وگیرنده آن در سیستم عصبی مرکزی یافت شده است. بسیاری از محققین متوجه اثرات آن بر رفتارهای شناختی به ویژه یادگیری و حافظه شده اند. **روشها:** تعداد شصت رت نر نژاد ویستار بطور تصادفی به شش گروه ده تایی تقسیم شدند (n=۱۰). همه گروهها تحت جراحی استریو تاکسی قرار گرفتند و یک کانول در ناحیه بطن سوم آنها کار گذاشته شد. سالین و دوزهای ۳۲ و۲،٤،۸،۱٦ میلی واحد انسولین به صورت داخل بطنی تزریق شدند. آزمایشات رفتاری در ماز آبی موریس ۳۰ دقیقه و ۲٤ ساعت پس از تزریقات انجام گرفت. **یافته ها:** نتایج ما نشان داد که دوزهای پایین و متوسط انسولین (۱٦و۸ ،۲،٤ میلی واحد) تغییر معنی داری در مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده تا یافتن سکوی پنهان ایجاد نکرد، در صورتیکه دوز بالاتر آن (۳۲ میلی واحد) این دوپارامتر را بصورت معنی داری کاهش داد. در آزمون فراخوانی حافظه (پروب) نیز گروههایی که دوزهای بالاتر (۳۲و۱٦ میلی واحد) انسولین را دریافت کرده بودند، مدت زمان بیشتری را در ربع دایره هدف نسبت به گروه شم سپری کردند. **نتیجه گیری:** بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می رسد که اثرات تزریق داخل بطنی انسولین بر حافظه وابسته به دوز است، بطوریکه دوزهای بالاتر آن میتواند باعث تقویت حافظه فضایی شود.

واژه های کلیدی: *حافظه فضایی، انسولین، تزریق داخل بطنی مغزی، رت.*

*نویسنده مسئول: دکتر گیسو محدث، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰٤۱۱-۳۳٦٤٦٦٤ ، نمابر: ۰٤۱۱-۳۳٦٤٦٦٤،

**Corresponding Author: Dr. Gisou Mohaddes, Assistant professor, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411 3364664; Fax: 0411 3364664; E-mail: gmohades@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

در حیطه متابولیسم محیطی بدن انسولین را اغلب در ارتباط با اثرات آنابولیک آن بر تحریک جذب سلولی گلوکز، اسیدهای آمینه و تشکیل گلیکوژن می شناسیم. مطالعات اولیه ای که در زمینه متابولیسم گلوکز در مغز صورت گرفته حاکی از آن است که جذب سلولی گلوکز در سیستم اعصاب مرکزی وابسته به انسولین نیست و لذا مغز در زمره بافتهایی قرار می گیرد که اصطلاحا غیر حساس به انسولین هستند (۱و۲). این برداشت منجر به این شده که نقش های بالقوه انسولین در سیستم اعصاب مرکزی کمتر مورد توجه واقع شود ولی اخیرا با اثبات حضور انسولین و گیرنده های آن در نواحی گوناگونی از مغز بخصوص در قشر مغز، هیپوکمپ و بطن سوم، این موضوع بیشتر مورد بحث و بررسی قرار گفته است (۷-۳).

همچنین علاوه بر تحقیقات فراوانی که درحوزه اثرات انسولین برفیزیولوژی مغز، اعمال شناختی و شکل پذیری سیناپسی انجام گرفته است، مطالعات زیادی هم نقش اختلال درمتابولیسم گلوکز و انسولین را بر آسیب شناسی بیماری های تحلیل برنده مغزی از قبیل آلزایمر مورد بررسی قرار داده اند (۸ و۹). در همین راستا مطالعات زیادی کاهش انسولین و گیرنده های آن را در نقاط خاصی از مغز بیماران آلزایمری به اثبات رسانده اند (۱۰و۱۱). علاوه بر این مشخص شده است که تجویز محیطی انسولین در شرایط قند خون نرمال و افزایش یافته موجب بهبود عملکرد حافظه ای این بیماران می شود در صورتیکه افزایش قند خون به تنهایی قادر به چنین تسهیلی نمی باشد (۱۲و۱۳). واتسون و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که افزایش غلظت محیطی انسولین می تواند غلظت نوراپی نفرین را در سیستم اعصاب مرکزی این بیماران تغییر دهد و لذا از این طریق بر عملکردهای شناختی آنها تاثیر بگذارد (۱٤).

هیپوکمپ یکی از مهمترین ساختارهای مغزی است که در حافظه و یادگیری های فضائی نقش اساسی دارد (۱۵). در واقع گزارش شده که میزان بیان ژن و سطح پروتئین گیرنده انسولین در ناحیه CA_1 هیپوکمپ مغز رت متعاقب یادگیری فضائی که منجر به شکل گیری حافظه کوتاه مدت می شود، دستخوش تنظیم افزایشی (Up regulation) می گردد (۱٦). همچنین مشخص شده که بدنبال تثبیت حافظه طولانی مدت به طور مشابهی میزان بیان ژن گیرنده انسولین در ناحیه CA_1 تنظیم افزایشی و بر عکس در ناحیه CA_3 تنظیم کاهشی (Down regulation) پیدا کرده است (۱۷). مطالعات مختلفی که تا کنون در مورد اثرات تجویز انسولین بر حافظه انجام شده اند نتایج متناقضی در پی داشته اند. به عنوان مثال چندین مطالعه گزارش کرده اند که تجویز انسولین به صورت محیطی در رت موجب تخریب حافظه می شود (۲۱-۱۸). همچنین شوارتزبرگ و همکارانش در سال ۱۹۸۹ اثرات تخریبی تزریق داخل بطنی انسولین را ۲۳ ساعت پس از آموزش بر حافظه اجتنابی غیر فعال به اثبات رسانیدند (۲۲). در صورتیکه در مطالعه ای مشابه ثابت شد که اگر انسولین بلافاصله پس از آموزش تزریق شود می تواند باعث بهبود چنین حافظه ای گردد (۲۳).

جالب اینکه در دو مطالعه اخیر اثرات تقویتی تزریق داخل هیپوکمپی انسولین بر حافظه فضائی (۲٤) و حافظه اجتنابی غیرفعال گزارش شده است (۲۵). لذا بر پایه نتایج متغایری که تاکنون در مورد اثرات انسولین بر حافظه بدست آمده است، در این مطالعه اثرات تزریق داخل بطنی دوزها ی مختلف انسولین را قبل از آموزش در رتهای نر مورد بررسی قرار داده ایم.

۲- مواد و روشها

۲-۱: حیوانات

جهت انجام این آزمایشات از شصت رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و متوسط سنی ٤-۳ ماهه که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری شده بودند، استفاده گردید. حیوانات به صورت گروه های پنج تایی در داخل قفسهایی نگهداری می شدند و به آب و غذا دسترسی آزادانه داشتند. دمای اتاق بطور ثابت به میزان ۱±۲۳ درجه سانتیگراد و دوره های روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (خارتی در ساعت ۷ بعد از ظهر) در نظر گرفته شد. حیوانات بصورت تصادفی در گروههای ده تائی تقسیم شدند و تمامی آزمایشات در فواصل ساعات ۲ تا ۷ بعد ازظهر انجام گرفت. گروههای مورد آزمایش عبارت بودند از: شم و حیواناتی که یکی از دوزهای ۳۲ و ۱٦، ۸، ٤، ۲ میلی واحد انسولین را دریافت کردند. دوزهای انسولین مورد استفاده در این آزمایش مطابق مطالعه ای که در آن تزریق انسولین در هیپوکمپ انجام شده ، انتخاب گردیده است (۲٤). انسولین مورد استفاده از شرکت داروسازی اکسیر (بروجرد) خریداری و با محلول نرمال سالین٪ ۰/۹ رقیق گردید.

۲-۲: عمل جراحی و کاشت کانولها

یک کانول در بطن سوم مغزی رتها یک هفته قبل از شروع آزمایشات رفتاری طی جراحی استریوتاکسی و به روشی که در ذیل به آن اشاره می شود، کاشته شد. قبل از جراحی حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوط دو داروی کتامین و زایلزین به ترتیب با دوزهای mg/kg ۱۰۰و mg/kg ۱۰ (۲٤) بیهوش شدند و پس از تراشیدن موهای سر و ضد عفونی با بتادین ٪۱۰ و الکل ٪۷۰ در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از محورهای مختصات بطن سوم (DV = -٤/۲ mm و

Archive of SID

www.SID.ir

L =۰mm و AP = −٤/٢ mm) یک کانول (سر سوزن شماره ۲۳) به طول ۵ mm بعنوان کانول راهنما در ناحیه بطن سوم آنها قرار گرفت. محورهای مختصاتی مورد استفاده در استریوتاکسی جهت دسترسی به بطن سوم از اطلس مغزی انتخاب گردید (۲٦). جهت ثابت شدن کانول راهنما بر روی جمجمه حیوان از دو پیچ عینک بعنوان پایه و سیمان دندان پزشکی (مخلوط آکریل خود پخت و منومر) استفاده شد. همچنین به منظور جلوگیری ازجریان برگشتی مایع مغزی نخایی (CSF) یا خون از طریق کانون راهنما، یک قطعه سیم نازک مسی در داخل کانون جاگذاری گردید.

۳-۲: ماز آبی موریس جهت آزمایش حافظه فضایی

مازآبی موریس به شکل یک حوضچه دایره‌ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۰ cm بود که تا عمق ٦۰ cm با آب با دمای۱±۲۰ درجه سانتیگراد پر می شد. محیط این حوضچه از نظر جغرافیائی به چهار ربع دایره کاملا مساوی تقسیم می‌شود که در هر کدام از ربعهای شمال، جنوب، شرق و یا غرب آن یک نقطه برای آزاد کردن حیوان در نظر گرفته شده است.در نقطه مرکزی یکی از این ربعهای چهارگانه که اصطلاحا ربع دایره هدف نامیده می‌شود سکویی مربعی شکل و تیره رنگ با قطر ۱۰cm، حدودا ۱/۵cm زیر سطح آب به صورت مخفی تعبیه شده است تا حیوان پس از پیدا کردن آن بر رویش استراحت کند. بر روی دیوارهای اتاق در اطراف حوضچه نیز اشکال مختلف هندسی به صورت ثابت نصب شده تا حیوان از آنها به عنوان سرنخ‌های فضائی جهت پیدا کردن سکو استفاده نماید. از یک سیستم ردیاب کامپیوتری هم جهت اندازه‌گیری مدت زمان طی شده، مسافت پیموده شده تا پیدا کردن سکو و سرعت شنا کردن حیوان استفاده می شود. بعلاوه اینکه مسیر حرکت حیوان در حوضچه بر روی صفحه مانیتور آشکار بود.

٤-۲: روش تزریق داخل بطنی

جهت تزریق داخلی بطنی ابتدا حیوان به آرامی توسط دست نگه داشته می شد، سپس سیم نازک مسی از داخل کانول راهنما بیرون کشیده شده، با سوزن تزریقی (سر سوزن دندانپزشکی شماره ۷) که از طریق یک قطعه کوتاه تیوپ پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون (۲۵ میکرو لیتر) متصل بود، جایگزین می‌گردید. سپس محلول سالین و یا دوزهای مختلف انسولین (۳۲ و٤،۸،۱٦، ۲ میلی واحد) با حجم یکسان چهار میکرو لیتر در مدت دو دقیقه به آرامی تزریق می شد. به منظور جلوگیری از بازگشت موئینگی محلول سالین یا انسولین از داخل کانول راهنما نوک سوزن تزریق ۰/۵ mm بلندتر از کانول راهنما بود. بعلاوه اینکه پس از تزریق، سوزن تزریق بمدت یک دقیقه در داخل کانول باقی می‌ماند. سی دقیقه پس از تزریق داخل بطنی محلول انسولین و یا سالین تستهای رفتاری درمان آبی موریس شروع می‌شد.

۵-۲: آزمایشات رفتاری

آزمایشات رفتاری در دو روز متوالی و در ساعات شروع یکسان انجام گرفت (۲٤). در روز اول آزمایشها بصورت سکوی پنهان (Hidden platform) طی دو بلوک متوالی با فاصله زمانی پنج دقیقه صورت گرفت. درهر بلوک، چهار ترایال پی در پی از چهار نقطه شروع مختلف (شمال، جنوب، شرق ویا غرب) که بطور تصادفی توسط رایانه انتخاب می شد، انجام گرفت. بلوک اول سی دقیقه پس از تزریق محلول سالین و یا انسولین شروع شد و به حیوان فرصت داده می شد تا پس از رها شدن به داخل حوضچه با استفاده از علامت‌های فضائی تعبیه شده در اطراف اتاق در مدت شصت ثانیه سکوی پنهان را بیابد و برروی آن استراحت نماید. اگر حیوان در مدت این شصت ثانیه موفق به پیدا کردن سکو می شد، بیست ثانیه برروی آن قرار می‌گرفت و پس از آن تا شروع ترایال بعدی به مدت سی ثانیه به داخل قفس منتقل می شد. اما اگر حیوان در این شصت ثانیه موفق به پیدا کردن سکو نمی‌شد با دست به سمت سکو هدایت می‌شد و به همان ترتیب بیست ثانیه بر روی آن و سی ثانیه هم در داخل قفس استراحت می‌کرد. بلوک دوم هم به همین ترتیب پنج دقیقه پس از پایان بلوک اول انجام می‌شد. پس از پایان بلوکهای اول و دوم حیوانات کاملا خشک شده و به داخل قفسهایشان منتقل می‌شدند. پارامترهای مدت زمان سپری شده (Escape latency) و مسافت پیموده شده برای پیدا کردن سکوی هدف ثبت و سپس آنالیز می‌شد.

در روز دوم ابتدا آزمایش پروب (probe test) و پنج دقیقه بعد آزمایش سکوی آشکار (Visible platform) انجام گرفت. در آزمایش پروب که به منظور بررسی اثر انسولین یا سالین بر میزان فراخوانی حافظه انجام گرفت، حیوان فرصت داشت تا در هر ترایال در حوضچه ی بدون سکو به مدت شصت ثانیه شنا کرده و سپس تا شروع ترایال بعدی پنجاه ثانیه در داخل قفس استراحت کند. لذا متغیر مورد بررسی در این آزمایش درصد زمان و مسافتی بود که رت در ربع دایره هدف گذرانده است.

نهایتا آزمایش سکوی آشکار به منظور بررسی عوامل حسی-انگیزشی حیوان انجام گرفت، برای اینکار سکو با کاغذ آلومنیومی پوشیده و بالاتر از سطح آب در ربع دایره جنوب شرقی گذاشته می شد تا حیوان پس از رها شدن در آب آن را پیدا کرده و بر روی آن قرار گیرد (۲۷).

٦-۲: بافت شناسی

پس از پایان آزمایشات رفتاری حیوانات بوسیله کلرال هیدرات به بیهوشی عمیق فرو رفته و سپس بوسیله فرمالین ۱۰٪ از طریق قلب پرفیوژن می‌شدند. پس از آن سرحیوان جدا می شد،

Archive of SID

www.SID.ir

مغز شان درآورده شده و در محلول فرمالین ۱۰٪ نگهداری می‌شد. بعد از گذشت حداقل دو روز با تهیه برشهای کرونال از مغز، محل نوک کانول راهنما در بطن سوم بررسی می‌شد.

۷-۲: آنالیز آماری

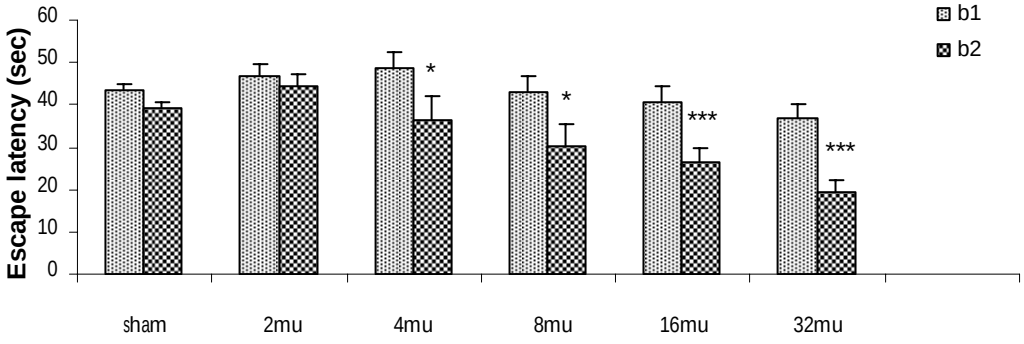
از پارامترهای مدت زمان و مسافت سپری شده در بلوک‌های اول و دوم و در آزمون پروب از پارامتر مدت زمان حضور در ربع دایره هدف برای مقایسه درون گروهی و برون گروهی استفاده شد. جهت مقایسه داده های بین گروهی از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و جهت مقایسه بلوک ۱ و ۲ در داخل هرگروه از آزمون t-Test استفاده شد. نتایج به صورت Means ± S.E.M بیان شده‌اند و P<0/05 معنی دار تلقی شده است.

۳- نتایج

در آزمایشات انجام گرفته، مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده تا پیدا کردن سکوی هدف در بلوک دوم نسبت به بلوک اول تمام گروهها بجز گروه آزمایشی ۲ میلی واحد انسولین کاهش پیدا کرده است (شکلهای ۲و۱). مقایسه داخل گروهی مدت زمان سپری شده تا پیدا کردن سکوی هدف بین بلوک‌های ۱ و ۲ در دوزهای ٤ (p = ۰/۰۱۲)، ۸ (p = ۰/۰۰۲)، ۱٦ (p = ۰/۰۰۰)، ۳۲ (p = ۰/۰۰۰) میلی واحد انسولین نشاندهنده کاهش معنی دار این پارامتر می باشد. مسافت پیموده شده تا پیدا کردن سکوی هدف نیز در گروههایی که دوزهای صفر (p =۰/۰۱۵)، ٤ (p =۰/۰٤٦)، ۸ (p =۰/۰۱۸)، ۱٦ (p =۰/۰۰۰) و ۳۲ (p =۰/۰۰۰) میلی واحد انسولین را دریافت کرده بودند، بطور معنی‌داری کاهش یافت. در مرحله اکتساب حافظه، مقایسه بلوک دوم گروههای ۱٦ و ۸، ٤، ۲ میلی واحد انسولین با گروه شم از نظر مدت زمان و مسافت طی شده اختلاف معنی داری را نشان نداد. این عدم اختلاف حاکی از آن است که انسولین با این دوزها تاثیری بر مرحله اکتساب حافظه فضائی رتها نداشته است. اما مقایسه بین گروهی بلوک دوم گروه ۳۲ میلی واحد انسولین با بلوک دوم شم هم از نظر مدت زمان سپری شده (p =۰/۰۱٤) و هم مسافت پیموده شده (p =۰/۰۰۱) نشانگر کاهش معنی‌دار پارامترهای مذکورمی‌باشد (شکلهای ۲و۱). بنابراین حیواناتی که دوز بالاتر انسولین (۳۲ میلی واحد) را دریافت کردند در مقایسه با گروه شم مرحله اکتساب بهتری در حافظه فضائی داشتند. بررسی نتایج مشخص کرد که انسولین تاثیر معنی‌داری بر سرعت شناکردن حیوانات نداشته است (داده‌ها نمایش داده نشده‌اند).

نتایج مربوط به آزمایش فراخوانی حافظه (تست پروب) در شکل ۳ نمایش داده شده است. آنالیز واریانس یکطرفه تفاوتهای معنی‌داری را بین گروهها نشان می‌دهد. در این آزمایش حیواناتی که دوزهای ۸ و ۲، ٤ میلی واحد انسولین را دریافت کردند در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند در حالیکه اختلاف بین گروههای ۳۲ (p = ۰/ ۰۰۰) و ۱٦ (p =۰/۰۱۸) میلی واحد انسولین با گروه شم معنی‌دار و حاکی از بهبود فراخوانی حافظه فضائی در این گروهها می‌باشد.

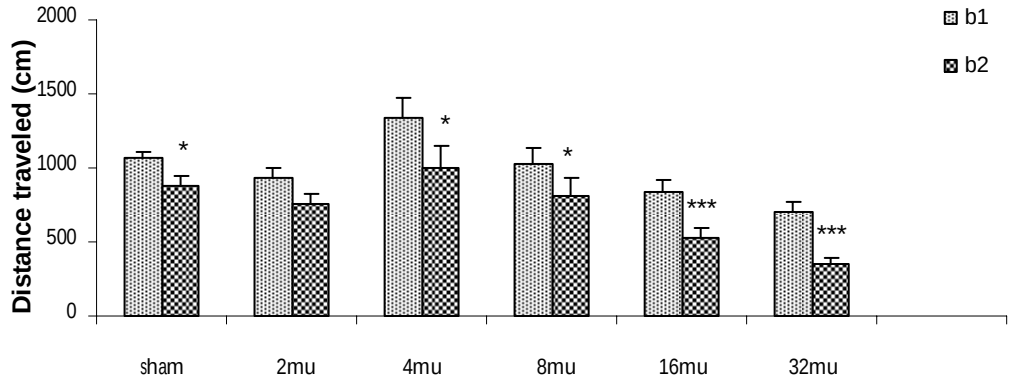
مقایسه نتایج مربوط به آزمایش سکوی آشکار هم هیچ تفاوت معنی‌داری را بین گروهها از نظر مدت زمان سپری شده تا پیدا کردن سکو نشان نمی‌دهد (شکل ٤). لذا مداخلات جراحی و یا تزریقی بر عوامل حسی- انگیزشی و حرکتی حیوانات تاثیری نداشته است.



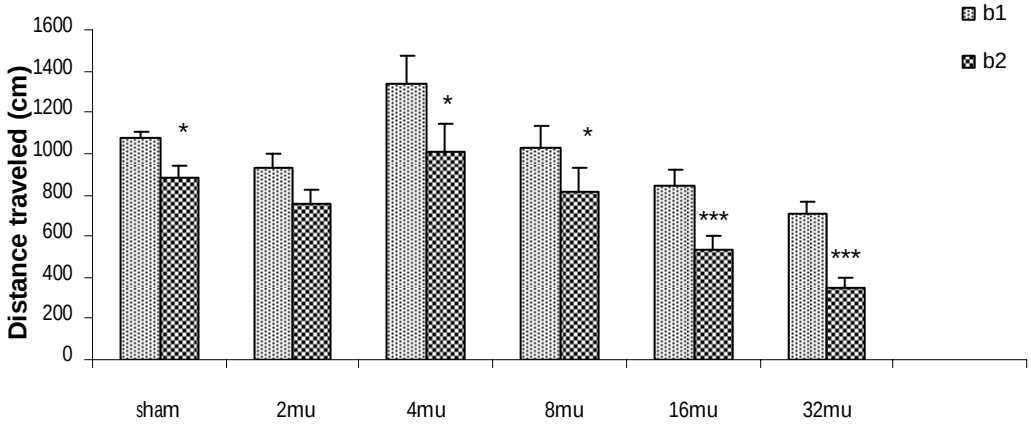
شکل۱: مقایسه مدت زمان پیدا کردن سکو (Escape latency) بین گروه شم با گروههایی که دوزهای مختلف انسولین را دریافت کرده اند. هر بلوک نمایانگر میانگین مدت زمان پیدا کردن سکو در چهار ترایال متوالی است. (p*<0.05) و(p<0/001) *** حاکی از اختلاف معنی دار بین بلوکهای ۱و۲ (b2 و b1) در داخل هر گروه و (p<0.05) • حاکی از اختلاف معنی دار بین بلوک ۲ هر یک از گروهها با بلوک مشابه آن در گروه شم می باشد. مقادیر بر حسب Mean±S.E.M نمایش داده شده اند. تعداد نمونه ها در هر گروه، ۱۰ موش می باشد.

Archive of SID

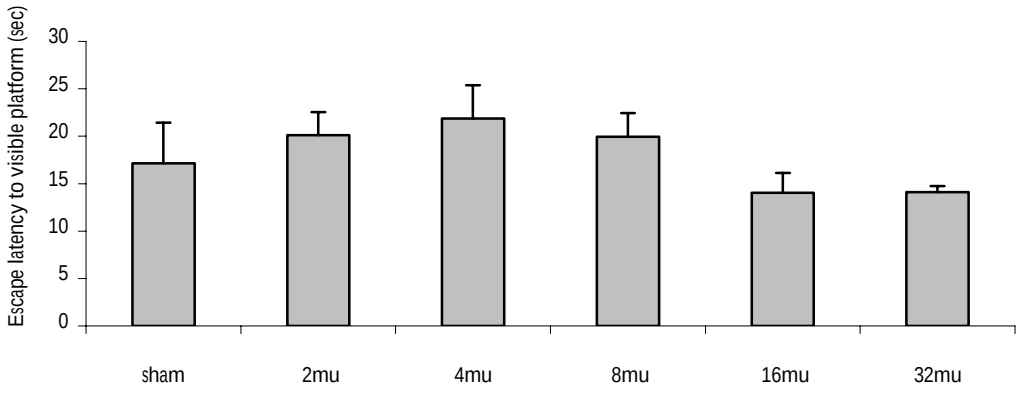
www.SID.ir



شکل ۲: مقایسه مسافت پیموده شده تا پیدا کردن سکو (Distance traveled) بین گروه شم با گروههایی که دوزهای مختلف انسولین را دریافت کرده اند. هر بلوک نمایانگر میانگین مسافت پیموده شده تا پیدا کردن سکودر چهار ترایال متوالی میباشد ($p<0.05$) * ($p<0.001$) *** حاکی از اختلاف معنی دار بین بلوکهای ۱و۲ (b1وb2) در داخل هر گروه و •• ($p<0.01$) حاکی از اختلاف معنی دار بین بلوکهای ۲ هر گروه با بلوک مشابه آن در گروه شم می باشد. مقادیر بر حسب Mean±S.E.M نمایش داده شده اند. تعداد نمونه ها در هر گروه ۱۰ موش می باشد.



شکل۳: مقایسه مدت زمان حضور در ربع دایره هدف در آزمون پروب بین گروه شم با گروههایی که دوزهای مختلف انسولین را دریافت کرده اند. ($p<0.05$) * ($p<0.001$) *** حاکی از اختلاف معنی دار بین گروههای مورد آزمایش با گروه شم است. مقادیر بر حسب Mean± S.E.M نمایش داده شده اند. تعداد نمونه ها در هر گروه ۱۰رت می باشد.



شکل ٤: مقایسه مدت زمان پیدا کردن سکوی آشکار بین گروه شم با گروههایی که دوزهای مختلف انسولین را دریافت کرده اند. تفاوتها بین هیچ یک از گروهها معنی دار نمی باشد. تعداد نمونه ها ۱۰ موش در هر گروه می باشد.

www.SID.ir

٤- بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق داخل بطنی انسولین می تواند باعث تسهیل و بهبود حافظه فضایی در رتها شود. براین اساس که دوزهای پائین انسولین تاثیر معنی‌داری بر مرحله اکتساب در حافظه فضایی رتها نداشته در صورتیکه دوز بالای انسولین این مرحله را در حافظه آنها بطور معنی‌داری بهبود بخشیده است. در بررسی فراخوانی حافظه نیز مشخص شد که دوزهای بالای انسولین می تواند باعث بهبود و تقویت این مرحله از حافظه شود. چنین اثر تسهیلی انسولین به نظر نمی رسد که بدلیل اثرات غیر اختصاصی تزریق داخل بطنی انسولین باشد چون تزریق داخل بطنی سالین چنین اثری را به دنبال نداشت. همچنین با توجه به غیر معنی دار بودن نتایج آزمون سکوی نمایان، انسولین تاثیری بر افزایش میزان حرکت حیوانات نداشته است، لذا نمی توان کاهش مدت زمان پیدا کردن سکو را به چنین اثری نسبت داد. بلکه بنظر می رسد انسولین با اثر بر مراکز درگیر حافظه از جمله هیپوکمپ باعث بهبود تثبیت حافظه فضایی شده است.

انسولین هورمون پروتئینی است که به مقدار قابل توجهی از سلولهای بتای پانکراس در پاسخ به افزایش قند خون ترشح شده و باعث تنظیم غلظت آن می شود (۲۸). بر پایه اثبات حضور انسولین و گیرنده آن در نواحی مختلفی از مغز بویژه هیپوکمپ، مطالعات بسیاری بر روی اثرات مرکزی آن بر حافظه انجام شده است (۲۸). نتایج حاصل از تزریق مرکزی انسولین در حیوانات سالم با قند خون نرمال اثرات تقویتی آن را بر انواع مختلف حافظه به اثبات رسانده اند (۲۹).

در مورد منشا حضور انسولین در مغز دو دیدگاه مطرح است: (۱) انتقال انسولین پانکراس به مغز، (۲) تولید موضعی انسولین در بافت مغزی (۲۹). انتقال انسولین محیطی از پلاسما به مایع مغزی نخاعی در چندین گونه حیوانی گزارش شده است (۳۰و۳۱). بطوریکه بنظر می رسد چنین انتقالی بواسطه یک فرآیند انتقال فعال ترانس اندوتلیال و از طریق ناقل خاصی از عرض سد خوئی- مغزی (BBB) صورت می‌گیرد (۳۲و۳۳). برخی مطالعات هم به سنتز موضعی انسولین در بافت مغزی اشاره کرده اند (۳۲). با این وجود منشاء انسولین موجود در مغز هنوز کاملا مشخص نیست (۲۸).

بیان ژن گیرنده انسولین دربسیاری از نواحی مغزی از جمله پیاز بویائی، هیپوتالاس، قشر مغز و هیپوکمپ به اثبات رسیده است (۳٤و۳۵). گیرنده‌های انسولین موجود در مغز ظاهرا در مقایسه با انواع محیطی خود خصوصیات متفاوتی نشان می‌دهند. بعنوان مثال مواجهه گیرنده‌های محیطی با غلظتهای بالای انسولین باعث تنظیم کاهشی آنها شده در صورتیکه چنین اثری در مورد گیرنده‌های مرکزی انسولین مشاهده نمی‌شود (۳٦و۳۷).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که دوزهای بالای انسولین (۳۲ و ١٦ میلی واحد) می‌تواند باعث بهبود حافظه و یادگیری فضائی در رتها شود. عدم تاثیر دوزهای پایین انسولین احتمالا به این علت است که انسولین با چنین دوزهایی قادر به انتقال کافی و موثر به هیپوکمپ نیست.

تشکیلات هیپوکمپ در فرآیند تشکیل و تثبیت حافظه فضایی نقش دارند (١٦) ثابت شده است که سلولهای عصبی ناحیه cA_1 هیپوکمپ نسبت به انواع محرکهای فیزیولوژیک از قبیل یادگیری (٤٠-۳۸) و محرکهای پاتولوژیک از قبیل ایسکمی، هایپوکسی (٤۳-٤١) و یا هایپرگلایسمی (۱۷) حساسترین سلولهای مغزی هستند. علاوه بر این نقش تسهیلی هیپوکمپ در شکل‌گیری حافظه فضائی جوندگان هم به اثبات رسیده است (٤٤). مشخص شده است که یادگیری فضائی باعث القاء تغییرات بیوشیمیایی در بیان ژن گیرنده انسولین می‌شود (۱۷).

Zhao و همکارانش نشان دادند که یادگیری فضائی در رت منجر به تنظیم افزایشی قابل توجهی در میزانmRNA پروتئین گیرنده انسولین در ناحیه CA_1 و ژیروس دندانه‌ای هیپوکمپ آنها می‌شود (١٦). بنظر می‌رسد که انسولین و گیرنده آن در مغز غالبا یک عملکرد تنظیم کننده نورونی داشته باشند. بعنوان مثال نقش تنظیمی انسولین در فعالیت‌های سیناپسی هم به صورت پیش سیناپسی و هم بصورت پس سیناپسی به اثبات رسیده است (٤٥). در بخش پیش سیناپسی مشخص شده است که انسولین بازجذب نوراپی نفرین به پایانه‌های پیش سیناپسی را در سلولهای جدا شده مغز رت مهار می‌کند (٤٦) و یا کینتیک کاتکول آمینها را در سلولهای هیپوتالاموس دستخوش تغییر می‌کند (٤۷). علاوه بر این انسولین باعث افزایش فعالیت گیرنده های آلفا۱- آدرنرژیک در سلول های هیپوکمپ رت می شود (٤۸). لذا با توجه به حضور گیرنده انسولین در سیناپتوزومهای هیپوکمپ مشخص می شود که انسولین با اثر بر جایگاههای سیناپسی هیپوکمپ باعث افزایش فعالیت آنها شده و به این ترتیب فعالیت نورونهای آن را افزایش میدهد (٤۹). همچنین ثابت شده است که انسولین با اثر بر مغز میتواند باعث افزایش سطح نوراپی نفرین شده و از این طریق توجه و تمرکز را که بواسطه فعالیت سیستم نورآدرنرژیک در قشر پره فرونتال شکل می گیرد، افزایش دهد (۵۰).

همچنین در گزارشی آمده است که تزریق داخلی بطنی انسولین در رت موجب افزایش چشمگیری در غلظت استیل کولین و سروتونین پایانه‌های پیش سیناپسی می‌شود در صورتیکه غلظت دوپامین را کاهش می‌دهد (۵۱). این در حالی است که سیستم عصبی کولینرژیک در پردازش و شکل گیری حافظه نقش اساسی دارد (۲۹) و نیز یکی از خصوصیات پاتولوژیک اصلی

Archive of SID

www.SID.ir

در بیماران آلزایمر کاهش چشمگیری در حجم و فعالیت نورونهای کولینرژیک ناحیه مغز قدامی مغز آنهاست (۵۲).
انسولین در بخش پس سیناپسی بر روی گیرنده‌های NMDA گلوتامات اثر می کند (٤٥) و به این ترتیب باعث القای تقویت طولانی مدت (Long Term Potentiation) در هیپوکمپ می شود (۵۳). نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داد که انسولین می‌تواند کمی بعد از مواجهه با قطعات جدا شده هیپوکمپ، فعالیت گیرنده‌های NMDA را در سلولهای آن افزایش دهد (٥٤ و٥٥). چنین اثر تسهیل کننده انسولین ظاهرا بواسطه فسفریلاسیون هر دو زیر واحد (NR2A و NR2B) گیرنده NMDA می باشد (٥٤). همچنین انسولین باعث تنظیم جریان خروجی گیرنده های NMDA در اووسیت ها و نیز سلولهای هیپوکمپ قورباغه می‌شود (٥٦). در مطالعه دیگری نیز ثابت شده است که انسولین قادر است فعالیت گیرنده‌های NMDA را بواسطه بسیج (Recruitment) آنها به سطح سلول افزایش دهد (۵۷). چنین اثر تقویتی انسولین برLTP بواسطه گیرنده های NMDA بوسیله مهار کننده های تیروزین پروتئین کیناز از قبیل Genistein یا Staurosporine بلوک می شود. لذا این حاکی از آن است که فسفریلاسیون تیروزین و آبشارهای مولکولی سرین/تره اونین پروتئین کینازها مثل پروتئین کیناز c در عملکرد انسولین در این زمینه نقش دارند(۵۸).
مکانیسم احتمالی دیگری که بواسطه آن انسولین می‌تواند اثرات تسهیلی خودش را بر حافظه و یادگیری اعمال کند اثر مستقیم آن بر حامل های حساس به انسولین گلوکز ($GLUT_8$ و $GLUT_4$) در مغز است (۵۹). جالب اینکه توزیع و پراکندگی چنین حاملهائی در مغز منطبق با تراکم مکانی گیرندهای انسولین در نواحی از مغز (مثل هیپوکمپ) که در شکل‌گیری حافظه نقش اساسی دارند، است (٦٠). در کل بدلیل نقش مهمی که گیرنده‌های NMDA در شکل پذیری سیناپسی و تشکیل حافظه دارند (٦١ و٦٢) بنظر می‌رسد که اثر تسهیل کنندگی انسولین بر حافظه عمدتا از طریق این گیرنده‌ها میانجگیری می شود.
مطابق با یافته‌های این مطالعه، مطالعات دیگری انجام شده‌اند که اثرات تسهیلی تزریق داخل بطنی (۲۳) و یا داخل هیپوکمپی (۲۵) انسولین را بر حافظه اجتنایی غیرفعال به اثبات رسانیده‌اند. همچنین در مطالعه دیگر مشخص شد که تزریق داخل هیپوکمپی انسولین باعث بهبود حافظه فضائی در رتها می‌شود (٢٤). به همین ترتیب در مطالعات انسانی هم اثرات تقویتی انسولین بر حافظه تائید شده است. بعنوان مثال در مطالعه‌ای انسانی معلوم شد که انفوزیون انسولین به صورت محیطی در شرایط قند خون نرمال موجب بهبود قابل توجهی در حافظه کلامی و توجه انتخابی افراد مورد مطالعه می‌شود (۵۳). یا استعمال انسولین از طریق بینی باعث تقویت حافظه و بهبود خلق می‌شود (٦٣).

۵- نتیجه گیری

مطالعه حاضر ثابت می‌کند که تزریق دوزهای بالای انسولین به صورت داخل بطنی می‌تواند موجب تسهیل و تقویت یادگیری و حافظه فضائی در رتها شود. لذا یافته‌های حاصل از این مطالعه علاوه بر کاربرد در علوم اعصاب می تواند قابل تعمیم در زمینه‌های کلینیکی بیماریهایی همچون دمانس پیری و آلزایمر نیز می‌باشند.

٦- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری های صمیمانه مسئولین محترم و همچنین خدمات زحمتکش مرکز تحقیقات کاربردی- دارویی وآزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در انجام این طرح تحقیقاتی نهایت سپاس را دارند.

7- References:

1. Harrison T.R. Internal medicine. Insulin biosynthesis, secretion, and action, McGraw-Hill. USA, 2001, 2112.
2. Guyton Arthur C., Hall Johne E. Text book of medical physiology. Activation of target cell receptors by insulin, Elsevier Saunders., Philadelphia, 2006, 963.
3. Hill J.M., Lesniak M.A., Pert C.B., Roth J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. Neuroscience., 1986, 17: 1127-1138.
4. Jürgen W., Unger James N., Livingston and Anne M. Insulin receptors in the central nervous system: Localization, signalling mechanisms and functional aspects. Prog and Neurobiol., 1991, 36(5): 343-62.
5. Pansky B., Hatfield J.S. Cerebral localization of insulin by immunofluorescence. Am J Anat., 1978, 153(3): 459-467.
6. Winters B.D., Bussey TJ. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. J. Neurosci., 2005, 25(17): 4243–4251.
7. Wozniak M., Rydzewski B., Baker S.P., Raizada M.K. The cellular physiological actions of insulin in the central nervous system. Neurochem, Int., 1993, 22: 1–10.
8. Burns J.M., Donney J.F., Anderson H.S., Mayo M.S., Spencer-Gardner L., Thomas G., Cronk B.B., Haddad Z., Klima D., Hansen D., Brooks W.M. Peripheral insulin and brain structure in early Alzheimer disease. Neurology., 2007, 69(11): 1094-104.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Li Lin and Hölscher Christian. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. Brain Research Reviews., 2007, In Press, Corrected Proof, Available online 11 September 2007.
10. Frolich L., Blum-Degen D., Bernstein H.G., Engelsberger S., Humrich J., Laufer S., Muschner D., Thalheimer A., Turk A., Hoyer S., Zochling R., Boissl K.W., Jellinger K., Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. J. Neural Transm., 1998, 105: 423–428.
11. Hoyer s. The aging brain: Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late- onset sporadic Alzheimer disease (SAD). J Neural Transm., 2002,109(7-8): 991-1002.
12. Craft S., Zallen G., & Baker L. D. Glucose and memory in Mild senile dementia of the Alzheimer type. Jornal of Cinical Experimental Neuropsychological.1992, 14: 253-267.
13. Craft S., Asthana S., Schellenberg G., Baker L., Cherrier M., Boyt A.A., Martins R.N., Raskind M., Peskind E., Plymate S. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2000, 903: 222–228.
14. Watson G. S., Bernhardt T., Reger M. A., Cholerton B. A., Baker L. D., Peskind E. R., et al. Insulin effects on CSF norepinephrine and cognition in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. 2005, 27: 38-41.
15. Broadbent N.J., Squire L.R., Clark R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2004, 101: 14515–14520.
16. Zhao W.Q., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N., Quon M.J., Alkon D.C. Brain insulin receptors and spatial memory. J. Biol. Chem., 1999, 274: 34893–34902.
17. Dou J.T., Chen M., Dufour F., Alkon D.L., ZhaoW.Q. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. Learn. Mem., 2005, 12: 646–655.
18. Clayson S.J. Effect of hypoglycemia on T-maze learning in rats.Phys. Ther., 1971, 991–999.
19. 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.
20. 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.
21. Santucci A.C., Schroeder H., Riccio D.C. Homeostatic disruption and memory: effect of insulin administration in rats. Behav. Neural Biol., 1990, 53: 321–333.
22. Schwarzberg H., Bernstein H.G., Reiser M., Gunther O. Intracerebroventricular administration of insulin attenuates retrieval of a passive avoidance response in rats. Neuropathies. 1989, 13: 79–81.
23. Park C.R., Seeley R.J., Craft S., Woods S.C. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. Physiol. Behav., 2000, 68: 509–514.
24. Moosavi M., Naghdi N., Maghsoudi N., & Zahedi Asl S. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. Hormones and Behavior. 2006, 50:748-752.
25. Babri S., Gholamipour Badie H., Khamenei S. Intrahippocampal insulin mproves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. J. Brain and Cognition., 2007, 64: 86-91.
26. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Elsevier., 2005.
27. Moosavi M., Naghdi N., & Choopani S. Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. Peptides. 2007, 28(5): 1029-1034.
28. Lars P., Van der Heide., Geert M.j Ramakers. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. Progress in neurobiology. 2006, 79, 205-221.
29. Park C.R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. Neuroscience Biobehavior Reviews., 2001, 25: 311-323.
30. Steffens A.B., Scheurink A.J.W., Porte j.r.D., Woods S.C. peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. Am. J. Physiol., 1988, 255: 200- 204.
31. Schwartz M.W., Sipols A.J., Kahn S.E., Lattemann D.P., Taborsky J.R., Bergman R.N., Woods S.C., Porte D. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. Am. J. Physiol., 1990, 259: E378-383.
32. Woods S.C., Seeley R.J., Baskin D.G., Schwartz M.W. Insulin and the blood-brain barrier.Curr. Pharm., 2003, 9: 795-800.
33. Banks W.A. The source of cerebral insulin. Eur. J. Pharmacol., 2004, 490:5-12.
34. Havrankova J., Brownstein M., Roth J. Insulin and insulin- receptors in rodent brain. Diabetologia., 1981, 20: 268–273.
35. Plum L., Schubert M., Bruning J.C. The role of insulin receptor signaling in the brain. Trends Endocrinol. Metab., 2005, 16: 59–65.
36. Boyd Jr., F.T., Raizada M.K. Effects of insulin and tunicamycin on neuronal insulin receptors in culture. Am. J. Physiol., 1983, 245: C283– C287.
37. Zahniser N.R., Goens M.B., Hanway P.J., Vinych J.V. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. J. Neurochem., 1984, 42: 1354–1362.
38. Frank L.M., Stanley G.B., and Brown E.N. Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environment. J. Neurosci., 2004, 24: 7681 -7689.
39. Knafo S., Ariav G., Barkai E., and Libersat F. Olfactory learning-induced increase in spine density along the apical dendrites of CA1 hippocampal neurons. Hippocampus. 2004, 4: 819 -825.
40. Nolan M.F., Malleret G., Dudman J.T., Buhl D.L., Santoro B., Gibbs E., Vronskaya S., Buzsaki G., Siegelbaum S.A., Kandel E.R., et al. A behavioral role for dendritic integration: NCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. Cell. 2004, 119: 719 -732.
41. Englund M., Bjurling M., Edin F., Hyllienmark L., and Brismar T. Hypoxic excitability changes and sodium currents in hippocampal CA1 neurons. Cell Mol. Neurobio., 2004, 24: 685 - 694.
42. Lukyanetz E.A., Shkryl V.M., Kravchuk O.V., and Kostyuk P.G. Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal

Archive of SID

www.SID.ir

neurons. Biochim. Biophys, Acta. 2003, 1618: 33 -38.
43. Olson E.E. and McKeon R.J. Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. J. Neurol. Sci., 2004, 227: 7 -19.
44. Morris R. Spatial localization does not require the presence of local cues. Learn. Motive. 1981, 12: 239–261.
45. ZhaoW.Q., Alkon D.C. Role of insulin and insulin receptors in learning and memory. Mol. Cell. Endocrinol., 2001, 177: 125–134.
46. Raizada M.K., Shemer J.M., Judkins J.H., Clarke D.W., Masters B.A., LeRoith D.Insulin receptors in the brain: structural and physiological characterization. Neurochem. Res.,1988,13: 297–303.
47. Masters B.A., Shemer J., Judkins J.H., Clarke D.W., LeRoith D., Raizada M.K. Insulin receptors in the brain: structural and physiological characterization. Brain Res., 1987, 417: 247–256.
48. Figlewicz D.P., Szot P. Insulin stimulates membrane phospholipid metabolism by enhancing endogenous alpha 1-adrenergic activity in the rat hippocampus. Brain Res. 1991, 550: 101–107.
49. Matsumoto H., Rhoads D.E. Specific binding of insulin to membranes from dendrodendritic synaptosomes of rat olfactory bulb. J. Neurochem., 1990, 54: 347–350.
50. Jodo E., Chiang c., Aston-Jones G. Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. Neuroscience. 1998, 83(1): 63-79.
51. Bhattacharya S.K., Saraswati M. Effect of intracerebroventricularly administered insulin on brain monoamines and acetylcholine in euglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic rats. Indian J. Exp. Biol.,1991, 29: 1095–1100.
52. Satyabrata Kar., Stephen P.M., Slowikowski BS., David Westaway. Interactions between β-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. Psychiatry Neurosci., 2004, 29(60): 427-439.
53. 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.
54. Christie J.M., Wenthold R.J., Monaghan D.T. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. J. Neurochem., 1999, 72: 1523–1528.
55. Liu L., Brown J.C., Webster W.W., Morrisett R.A., Monaghan D.T. Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in Xenopus oocytes and rat hippocampus. Neurosci. Lett., 1995,192: 5–8.
56. Liao G.Y., Leonard J.P. Insulin modulation of cloned mouse NMDA Receptor currents in Xenopus oocytes. J. Neurochem., 1999, 73: 1510–1519.
57. Skeberdis V.A., Lan J., Zheng X., Zukin R.S., Bennett M.V. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2001, 98: 3561– 3566.
58. Zhao W.Q., Chen H., Quon M.J., Alkon D.L. Insulin and insulin receptor in experimental models of learning and memory. European journal of pharmacology. 2004, 490, 71-81.
59 Reagan L. P. Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. Neurobiology of Aging. 2006, 26S, S56- S59.
60. McEwen B. S., & Reagan L. P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. European journal of pharmacology. 2004, 90: 13-24.
61 Huerta P.T., Sun L.D., Wilson M.A., Tonegawa S. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. Neuron., 2000, 25: 473–480.
62. Nakazawa K., Quirk M.C., Chitwood R.A., Watanabe M., Yeckel M.F., Sun L.D., Kato A., Carr C.A., Johnston D.,Wilson M.A., Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. Science. 2002, 297: 211–218.
63. Benedict C., Hallschmid M., Hatke A., Schultes B., Fehm H.L., Born J., Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. Psychoneuroendocrinology. 2004, 29: 1326–1334.

Archive of SID

www.SID.ir