Archive of SID

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.3, Jun 2017
Pages: 206-221

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۶
صفحه: ۲۲۱-۲۰۶

مقایسه اثرات حاد و مزمن متفورمین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سرم رت‌های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین

نیلوفر دربندی*[۱]، سمیرا مقدسی[۲]، حمیدرضا مومنی[۳]

چکیده

مقدمه: مطالعات نشان داده که متفورمین اثرات متفاوتی بر یادگیری و حافظه دارد. در این مطالعه اثرات درمانی مصرف حاد و مزمن متفورمین بر به خاطر آوری حافظه و برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم در رت‌های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۸ سر رت به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه سالین-سالین، گروه استرپتوزوتوسین - سالین و گروه‌های تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین (یک نوبته، یک هفته، سه هفته و یازده هفته). تزریقات داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) در روز اول و سوم پس از جراحی انجام شد. تزریقات داخل صفاقی سالین (ml/kg) یا متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی شروع و تا پایان دوره تیمار ادامه داشت. حافظه حیوانات با یادگیری اجتنابی غیرفعال ارزیابی و سرم‌های خون جهت سنجش سطح مالون‌دی‌آلدهید، سنجش سطح آنتی‌اکسیدانی کل، سنجش سطح آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج: استرپتوزوتوسین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش بازخوانی حافظه و سطح آنتی‌اکسیدان کل، سطح آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز و افزایش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدهید نسبت به گروه کنترل شد ($p<۰/۰۰۱$) و تزریق متفورمین(یک‌نوبته، یک هفته و سه هفته) منجر به بهبود بازخوانی حافظه و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم نسبت به گروه استرپتوزوتوسین شد ($p<۰/۰۰۱$). درحالی‌که تزریق متفورمین در گروه یازده هفته اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه استرپتوزوتوسین نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که مصرف حاد و مزمن متفورمین اثرات متفاوتی بر بازخوانی حافظه دارد که احتمالاً ناشی از اثر مصرف مزمن متفورمین در افزایش سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو در سرم است.

واژه‌های کلیدی: متفورمین حاد و مزمن، شاخص‌های استرس اکسیداتیو سرم، استرپتوزوتوسین.

۱،۲،۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک
***(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۸۶۳۴۱۷۳۳۱۷، پست الکترونیکی:** N-Darbandi@araku.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری آلزایمر به‌وسیله تغییرات پیش‌رونده تحلیل نورونی توصیف می‌شود که نتیجه آن کاهش میزان توانایی‌های شناختی و عملکردی بیماران است (۱،۲). گرچه مکانیسم بیولوژیکی آلزایمر کاملاً شناخته نشده است اما شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند چندین ریسک فاکتور از جمله برخی جهش‌های ژنتیکی، افزایش سن، چاقی، مقاومت به انسولین، فاکتورهای عروقی، دیس لیپیدمی، فشارخون و مارکرهای التهابی در پاتوفیزیولوژی آلزایمر شرکت دارند (۳،۴). علاوه بر آن نظریه رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو پیشنهاد می‌دهد که آسیب‌های حاصل از اکسیداسیون نقش اصلی در آسیب‌های نورونی بازی می‌کند و بررسی‌ها نشان داده است که استرس اکسیداتیو اولین رویداد در بیماری آلزایمر است(۵). استرس اکسیداتیو نه تنها در بافت‌های مغزی و محیطی بیماران آلزایمری مشاهده می‌شود، بلکه در دیگر بیماری‌های نورودژنره شامل بیماری پارکینسون، هانتینگتون و ALS نیز گزارش شده است (۶).

در یک سلول سالم تعادل مناسبی بین پراکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد. با افزایش پراکسیدان‌ها و یا کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها استرس اکسیداتیو اتفاق می‌افتد که در صورت طولانی‌شدن، آسیب‌های جدی در سلول رخ می‌دهد (۷). گونه‌های فعال اکسیژن به همه مولکول‌های زیستی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک حمله می‌کند. نقش اختلال در لیپوپروتئین‌های پلاسما و متابولیسم چربی‌ها در بیماری‌های نورودژنره بسیار با اهمیت است (۸). در بدن موجودات زنده سیستم‌های دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی جهت جلوگیری از استرس اکسیداتیو وجود دارند. از سیستم‌های دفاع آنزیمی می‌توان به گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) کاتالاز (Catalase) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase) اشاره نمود (۹). سیستم دفاع غیر آنزیمی هم شامل ویتامین E، اسید آسکوربیک، کارتنوئیدها، فلاونوئیدها و اسید اوریک است (۱۰).

استرپتوزوتوسین ترکیبی طبیعی است که توسط باکتری استرپتومایسز آکروموژنز تولید می‌شود. این ساختار سمی مشتق از گلوکزآمین بوده و از طریق انتقال‌دهنده گلوکز جذب سلول می‌شود. استرپتوزوتوسین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد بر ساختار کروموزومی سلول‌های پستانداران اثر گذاشته و منجر به مرگ سلولی می‌شود. استرپتوزوتوسین سبب تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در بعضی از نواحی مغز از جمله هیپوکامپ شده (۱۱)، همچنین با ایجاد مقاومت انسولینی در مغز ویژگی‌های اختصاصی بیماری آلزایمر تک گیر را نشان می‌دهد (۱۲). تزریق استرپتوزوتوسین اثراتی از جمله آسیب‌های نورونی، کاهش حجم هیپوکامپ، التهاب نورونی و نقص پیش‌رونده حافظه و یادگیری ایجاد می‌کند که مشابه با بیماری آلزایمر در انسان هست (۱۳).

متفورمین مهم‌ترین دارویی است که در درمان دیابت نوع ۲ به‌تنهایی و یا همراه با سایر داروهای پایین آورنده قند خون، همچنین در درمان سندروم تخمدان پلی کیستیک (Polyctstic Ovary Syndrome) و نیز درمان سندروم لیپودیستروفی ناشی از ویروس ایدز کاربرد دارد (۱۴). بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است که متفورمین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو منجر به کاهش اثرات استرپتوزوتوسین شده و بدین ترتیب داده‌های حاصل از آزمون‌های حافظه‌ای را بهبود می‌بخشد (۱۵). در تحقیق دیگری متفورمین منجر به کاهش وزن شده و قابلیت زیست سلول‌ها را افزایش داد (۱۶). بررسی‌های صورت گرفته همچنین نشان داده است که کشت نورونی در محیط حاوی متفورمین باعث بهبود نورون‌زایی می‌شود (۱۷). تزریق درون صفاقی متفورمین می‌تواند فاکتورهای موجود در خون ازجمله مالون‌دی‌آلدهید، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سطح گلوکز، کلسترول و انسولین خون، وزن بدن و داده‌های حافظه‌ای را بهبود ببخشد (۲۱-۱۸).

باوجود اثرات حفاظت نورونی که برای متفورمین شناخته شده است، مصرف بلندمدت این دارو در برخی بیماران با خطر ابتلا به اسیدوز لاکتیک همراه است. متفورمین با ممانعت از زنجیره تنفسی میتوکندریایی در سلول‌های کبدی لاکتات خون

www.SID.ir

Archive of SID

را افزایش می‌دهد. در افراد با نارسایی‌های کلیه‌ای متفورمین دفع نمی‌شود و به همین دلیل غلظت آن در بدن افزایش یافته و می‌تواند سطح بالاتری از لاکتات را در بدن تولید کند. لذا مصرف متفورمین در افراد مسن و یا افراد با نارسایی‌های کلیه‌ای، کبدی و ناراحتی‌های قلبی با خطر بالای اسیدوز لاکتیک همراه است. اسیدوز لاکتیک می‌تواند باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو شود (۲۲).

در مجموع علیرغم مطالعاتی که بیانگر اثرات مفید مصرف حاد متفورمین بر حافظه و یادگیری است (۲۶-۲۳، ۱۵)، برخی پژوهش‌ها نیز بر افزایش سطح استرس اکسیداتیو به دنبال مصرف مزمن متفورمین تأکید دارد (۱۴،۴۴) که خود می‌تواند زمینه را برای ابتلا به بیماری‌های نورودژنره از جمله آلزایمر فراهم نماید. با توجه به اثرات دوگانه‌ای که برای متفورمین گزارش شده است، در مطالعه حاضر به طور هم‌زمان به بررسی اثرات تزریق حاد و مزمن متفورمین بر بازخوانی حافظه و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم از جمله سطح مالون‌دی‌آلدهید (Malondialdehyde)، سطح آنتی‌اکسیدانی کل (Ferric Reducing Ability of Plasma)، سطح آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در رت‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شده است.

روش بررسی

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر رت نر نژاد ویستار (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. در این راستای کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفت. حیوانات به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری و برای عادت کردن به محیط جدید حدود یک هفته قبل از شروع آزمایش، به حیوان‌خانه دانشگاه اراک منتقل شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی هفت صبح) و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد بوده و کلیه آزمایش‌ها در زمان معینی از روز انجام می‌گرفت. هشت حیوان در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یک بار آزمایش می‌شد.

داروها: کتامین هیدروکلراید و زایلزین (ساخت شرکت Alfasan) به صورت درون صفاقی جهت بی‌هوش کردن حیوان مورد استفاده قرار گرفت. پودر استرپتوزوتوسین (ساخت شرکت سیگما-آمریکا) به صورت محلول در نرمال سالین با غلظت مشخص (۳mg/kg) به صورت درون بطن مغزی (Intracerebroventricular) جهت القای آلزایمر بکار برده شد. متفورمین (ساخت شرکت آریا دارو- تهران) با غلظت ۲۰۰mg/kg به صورت محلول در نرمال سالین، به‌صورت تزریق درون صفاقی در دوره تیمارهای مختلف استفاده شد.

روش جراحی و کانول گذاری در بطن‌های جانبی: جهت جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه بطن‌های جانبی ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلزین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شد. مختصات بطن‌های جانبی عبارت بود از: ۰/۸ میلی‌متر از برگما به سمت عقب، ۱/۴ میلی‌متر در طرفین شکاف ساژیتال و ۳/۵ میلی‌متر به طرف پایین از سطح جمجمه که بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون به دست آمد (۲۷). در سطح جمجمه محل کانول‌گذاری توسط مته دندانپزشکی تا پرده مننژ سوراخ شد. کانول‌های راهنما به طول ۸ میلی‌متر از سر سوزن ۲۲ گیج تهیه شده و به صورت دو طرفه در محل‌های سوراخ شده، حدود ۱ میلی‌متر بالاتر از ناحیه مورد نظر به کمک آکریل دندانپزشکی ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما قبل از تزریق، سر سوزن‌های دندانپزشکی به شماره ۳۰ گیج که به اندازه طول کانول راهنما بریده می‌شد، در داخل آن قرار گرفت (۲۸).

تزریق درون بطن‌مغزی: برای تزریق دارو، حیوان به آرامی توسط دست گرفته شده، سر سوزن ۳۰ گیج از کانول راهنما خارج و به کمک سر سوزن دندانپزشکی ۲۷ گیج (که ۱ میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بریده شده بود)، رابط پلی اتیلن و سرنگ هامیلتون ۲۵ میکرو لیتری تزریقات مرکزی انجام شد. تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و با حجم ۱۰ میکرو لیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی صورت گرفت. برای اطمینان از جذب کامل

www.SID.ir

Archive of SID

دارو از طریق کانول تزریق به داخل ناحیه مغزی مورد نظر، کانول تزریق با تأخیر ۳۰ تا ۶۰ ثانیه‌ای پس از تزریق خارج می‌شد. در پایان آزمایش برای ارزیابی صحت عملیات و درستی مختصات محل جراحی و تزریق، مقدار ۱۰ میکرو لیتر از محلول ۱ درصد آبی متیلن بلو به صورت دو طرفه تزریق، مغز حیوان از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱ روز ثابت شد. سپس مغز حیوانات در محل تزریق به کمک اسکالپل برش‌گیری شده و به کمک چشم غیرمسلح بررسی شد. در صورت عدم وجود رنگ در ناحیه بطن‌های جانبی که نشان دهنده کانول‌گذاری ناصحیح بود، داده‌های حاصل از این حیوانات از آنالیزها حذف می‌شد.

گروه‌های آزمایشی در این تحقیق:

۱) گروه کنترل: در این گروه تزریق درون بطن‌مغزی سالین به میزان ۱۰ میکرو لیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی و تزریق درون صفاقی سالین (ml/kg) از یک روز قبل از جراحی تا پایان دوره تیمار (۲۱ روز) صورت گرفت.

۲) گروه استرپتوزوتوسین: در این گروه تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) به میزان ۱۰ میکرو لیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی و تزریق درون صفاقی سالین (ml/kg) از یک روز قبل از جراحی تا پایان دوره تیمار (۲۱ روز) انجام شد.

۳) گروه‌های دریافت‌کننده متفورمین: در این گروه‌ها تزریق درون بطن‌مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) به میزان ۱۰ میکرو لیتر در هر بطن در روزهای اول و سوم پس از جراحی صورت گرفت و تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) در گروه یک نوبته، تزریق یک‌بار پس از فرآیند آموزش و در گروه‌های یک هفته، سه هفته و یازده هفته به ترتیب از یک روز قبل از جراحی شروع و به مدت یک هفته، سه هفته و یا یازده هفته ادامه داشت.

روش ارزیابی حافظه:

دستگاه سنجش حافظه از جنس پلکسی گلاس (ساخت شرکت برج صنعت-تهران) و دارای دو سمت مجزا یکی به رنگ سیاه و دیگری به رنگ سفید است که توسط یک درب گیوتینی واقع در دیواره میانی این دو بخش به یکدیگر راه دارند. در کف بخش سیاه رنگ، میله‌های فلزی قرارگرفته است. هنگامی که دستگاه روشن می‌شود یک جریان الکتریکی به مدت ۳ ثانیه و شدت ۱ میلی‌آمپر در میله‌های فلزی برقرار می‌شود.

یادگیری اجتنابی غیرفعال به روش "گذر از یک بخش دستگاه به بخش دیگر (Step through)" برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه است، روز دوم یا روز آزمون شامل بررسی میزان حافظه حیوانات آموزش دیده است.

۱- در روز آموزش هر موش با احتیاط در درون بخش سفید دستگاه قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی بالا رفت. مدت زمانی که طی شد تا موش وارد خانه سیاه شود، ثبت گردید. حیواناتی که بیش از ۱۰۰ ثانیه در خانه سفید باقی می‌ماندند از آزمایش حذف شدند. زمانی که حیوان با ۴ پا وارد خانه سیاه شد درب گیوتینی پایین آمده و حیوان به قفس خود برگردانیده می‌شد. سی دقیقه بعد دوباره حیوان در خانه سفید قرار می‌گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی بالا رفته و مدت‌زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد خانه سیاه شود ثبت می‌گردید؛ اما این بار بلافاصله پس از ورود کامل حیوان به خانه سیاه و پایین آوردن درب گیوتینی با روشن کردن استیمولاتور، تحریک الکتریکی به مدت ۳ ثانیه به پاهای موش وارد می‌شد. با توجه به بسته بودن سقف این بخش، موش نمی‌تواند از شوک الکتریکی اجتناب کند (شوک اجتناب‌ناپذیر). پس از ۲۰ ثانیه موش از این محیط خارج و به قفس نگهداری منتقل می‌گردید. دو دقیقه بعد این مراحل تکرار می‌شد. اگر حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه وارد خانه سیاه می‌شد برای بار دوم تحریک الکتریکی (با شدت کمتر) دریافت می‌کرد، در غیر این صورت یادگیری اجتنابی غیرفعال در حافظه موش شکل گرفته بود. لذا حیوان به قفس مربوطه منتقل می‌شد.

۲- آزمون حافظه ۲۴ ساعت بعد از جلسه آموزش انجام می‌شد. به این ترتیب که موش‌ها به صورت جداگانه و به ترتیب در خانه سفید قرار می‌گرفتند، پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی بالا

www.SID.ir

Archive of SID

می‌رفت و مدت‌زمان تأخیر حیوانات در ورود به خانه سیاه STL (Step Through Latency) و کل مدت زمانی که در خانه سیاه سپری می‌شد TDC (Time Dark Chamber) اندازه‌گیری و ثبت شد. در این مرحله هیچ‌گونه شوک الکتریکی به حیوان وارد نمی‌شد و حداکثر زمان برای توقف موش در خانه سفید یا زمان سقف (Cut off) ۳۰۰ ثانیه بود (۲۹).

خون‌گیری و تهیه سرم: پس از پایان دوره تیمار، حیوانات توسط دی‌اتیل‌اتر بی‌هوش و با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی خون‌گیری از بطن راست قلب انجام گرفت. خون به کمک دستگاه سانتریفوژ (مدل universal ساخت کشور آلمان) با دور ۱۳۳۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از سمپلر سرم خون جدا و مجدداً با دور ۱۳۳۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سرم حاصل بر حسب مقادیر مورد نیاز تقسیم‌بندی و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. جهت اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد اساس این روش بر مبنای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است. به منظور سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی کل از روش بنزیک و همکاران استفاده شد در این روش توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک Fe^{+3} اندازه‌گیری می‌شود. با احیای یون‌های فریک و تبدیل آن به یون‌های فرو Fe^{+2} در PH اسیدی و با حضور معرف‌های اختصاصی کمپلکس آبی‌رنگی ایجاد می‌شود که در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر و به‌صورت اسپکتروفتومتریک قابل اندازه‌گیری است (۳۰). اندازه‌گیری سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به کمک ترکیبی به نام پیروگالول اندازه‌گیری شد که در محلول آبی یا قلیایی به‌سرعت اتواکسیداسیون می‌شود. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از اتواکسیداسیون پیروگالول جلوگیری می‌کند از این اصل برای اندازه‌گیری سطح این آنزیم در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده می‌شود (۳۱). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم خون از روش Aebi استفاده شد. این روش بر اساس سنجش اسپکتروفتومتری تجزیه H_2O_2 است که مستقیماً با کاهش جذب آن در ۲۴۰ نانومتر در واحد زمان و در فواصل زمانی صفر و سه دقیقه همراه است (۳۲).

آنالیزهای آماری: از نظر آماری، همه نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار استاندارد (SEM) بیان شدند. در تمام آزمایش‌های رفتاری میزان تأخیر ورود حیوان به خانه سیاه در روز آزمون ملاک حافظه محسوب گردید. با توجه به توزیع نرمال داده‌ها جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش رفتاری و آنالیزهای سرم خون از روش آنالیز واریانس (Anova) یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey-test) استفاده گردید. در این بررسی سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

جهت حصول اطمینان از آلزایمری شدن حیوانات توسط استرپتوزوتوسین داده‌های حاصل از آزمون رفتاری توسط دستگاه سنجش حافظه مدل Step through در تمامی گروه‌ها سنجیده شد.

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد مدت‌زمان STL در گروه آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P<۰/۰۰۱$) که نشان‌دهنده تخریب حافظه در گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین است. مدت‌زمان STL در گروه‌های دریافت کننده متفورمین در دوره تیمارهای یک‌بار، یک هفته و سه هفته در مقایسه با گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P<۰/۰۰۱$) که به معنای بهبود به خاطر آوری حافظه است. درحالی‌که در گروه تیمار با متفورمین به مدت یازده هفته تفاوت معنی‌داری در مدت‌زمان STL در مقایسه با گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین دیده نشد ($P>۰/۰۵$) (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

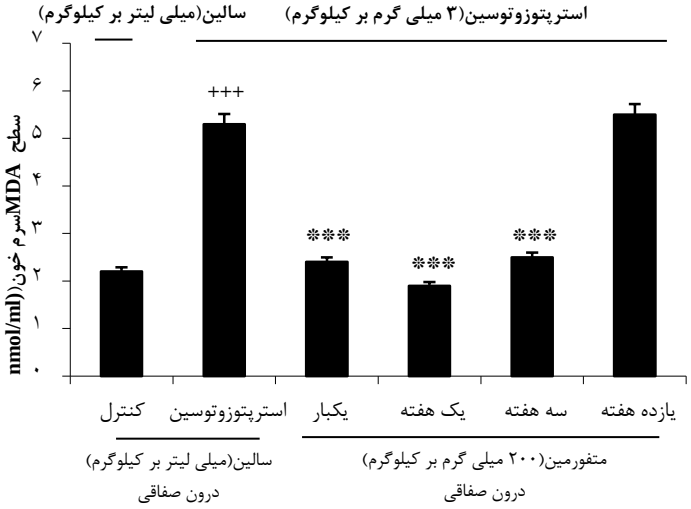
جدول ۱: مقایسه داده‌های حاصل از آزمون رفتاری و حافظه در گروه‌های آزمایشی

گروه‌های آزمایشی	Step Through Latency (sec)
کنترل	۲۹۰ ±۱۲[a]
استرپتوزوتوسین	۹ ±۴ [b]
استرپتوزوتوسین+ متفورمین(یک نوبته)	۲۴۰± ۲۳[a]
استرپتوزوتوسین+ متفورمین(یک هفته)	۲۷۳ ± ۸[a]
استرپتوزوتوسین+ متفورمین(سه هفته)	۲۱۱ ± ۱۴[a]
استرپتوزوتوسین+ متفورمین(یازده هفته)	۸۷ ± ۲۶[b]

زمان تأخیر برای ورود به اتاق تاریک در گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. همچنین تأخیر برای ورود به خانه تاریک در گروه‌های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین (یک‌بار، یک هفته و سه هفته) نسبت به گروه STZ افزایش معنی‌داری را نشان داد. این تأخیر در گروه دریافت کننده متفورمین به مدت یازده هفته نسبت به گروه STZ معنی‌دار نبود. مقادیر به صورت (Mean±SEM) برای هشت سر حیوان بیان شده و میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر است.

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید (MDA) سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین- سنجش سطح مالون‌دی‌آلدهید

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از آنالیزهای سرم خون نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در روزهای اول و سوم پس از جراحی سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم خون نسبت به گروه کنترل را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۰۱). تجویز متفورمین (۲۰۰mg/kg) به‌صورت درون صفاقی در دوره تیمارهای مختلف به همراه تزریق استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) به‌صورت داخل بطن مغزی، استرس اکسیداتیو را با نسبت‌های مختلف در مقایسه با گروه STZ بهبود بخشید. آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی STZ به همراه متفورمین نشان داد که تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) در طول تیمارهای مختلف یک‌بار، یک هفته و سه هفته منجر به کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم نسبت به گروه STZ می‌شود (P<۰/۰۰۱). تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت ۱۱ هفته تأثیر معنی‌داری بر سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم نسبت به گروه STZ نداشت (P>۰/۰۵) [f(5,29)=35/898] (جدول ۲) و (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپید سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین

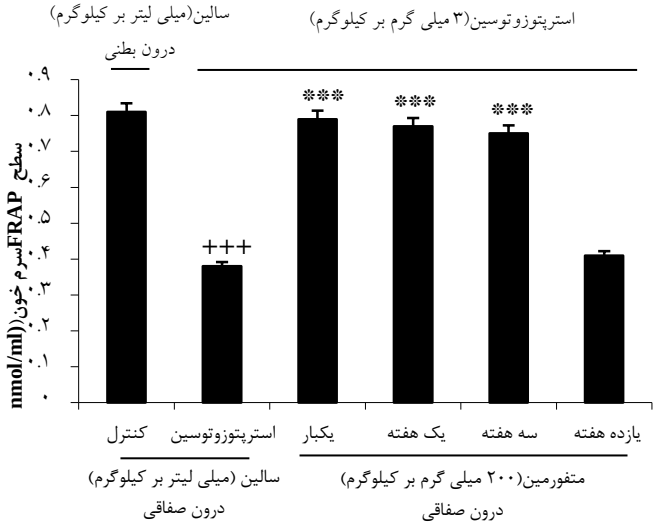
www.SID.ir

Archive of SID

تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg)، میزان پراکسیداسیون لیپید سرم را نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در گروه‌های دریافت کننده STZ به همراه متفورمین در دوره تیمارهای یک نوبته، یک هفته و سه هفته میزان پراکسیداسیون لیپید سرم نسبت به گروه STZ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری بر میزان پراکسیداسیون لیپید سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد. نتایج به‌صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مکمل توکی برای هشت سر حیوان انجام شد. ($p<۰/۰۰۱^{+++}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و ($p<۰/۰۰۱^{***}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و گروه‌های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین.

ارزیابی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم (FRAP) در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین- سنجش توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از آنالیزهای سرم خون نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در روزهای اول و سوم پس از جراحی قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم خون نسبت به گروه کنترل را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی STZ به همراه متفورمین نشان داد که تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) در طول تیمارهای مختلف یک‌بار، یک هفته و سه هفته منجر به افزایش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم نسبت به گروه STZ می‌شود ($P<۰/۰۰۱$). در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری در قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد. ($P>۰/۰۵$) [$f(5,21)=19/279$] (نمودار ۲) و (جدول ۲).



نمودار ۲: مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین

تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین(۳mg/kg)، میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد. در گروه‌های دریافت کننده STZ به همراه متفورمین در دوره تیمارهای یک نوبته، یک هفته و سه هفته قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم نسبت به گروه STZ به طور معنی‌داری افزایش یافت. در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری بر قدرت آنتی‌اکسیدانی کل سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد. نتایج به‌صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل توکی برای هشت سر حیوان انجام شد.

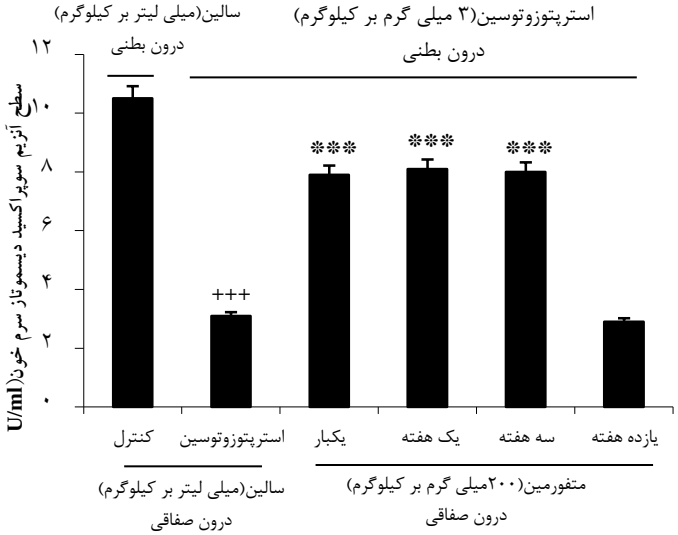
www.SID.ir

Archive of SID

($p<۰/۰۰۱^{+++}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و ($p<۰/۰۰۱^{***}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و گروه‌های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از آنالیزهای سرم خون نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در روزهای اول و سوم پس از جراحی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم خون نسبت به گروه کنترل را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی STZ به همراه متفورمین نشان داد که تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) در طول تیمارهای مختلف یک‌بار، یک هفته و سه هفته منجر به افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم نسبت به گروه STZ می‌شود ($P<۰/۰۰۱$). در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز کل سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد ($P>۰/۰۵$) [$f(5,21)=34/261$] (جدول ۲) و (نمودار ۳).



نمودار ۳. مقایسه میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین.

تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg)، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد. در گروه‌های دریافت کننده STZ به همراه متفورمین در دوره تیمارهای یک نوبته، یک هفته و سه هفته میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم نسبت به گروه STZ به طور معنی‌داری افزایش یافت. در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد. نتایج به‌صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل توکی برای هشت سر حیوان انجام شد. ($p<۰/۰۰۱^{+++}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و ($p<۰/۰۰۱^{***}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و گروه‌های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین.

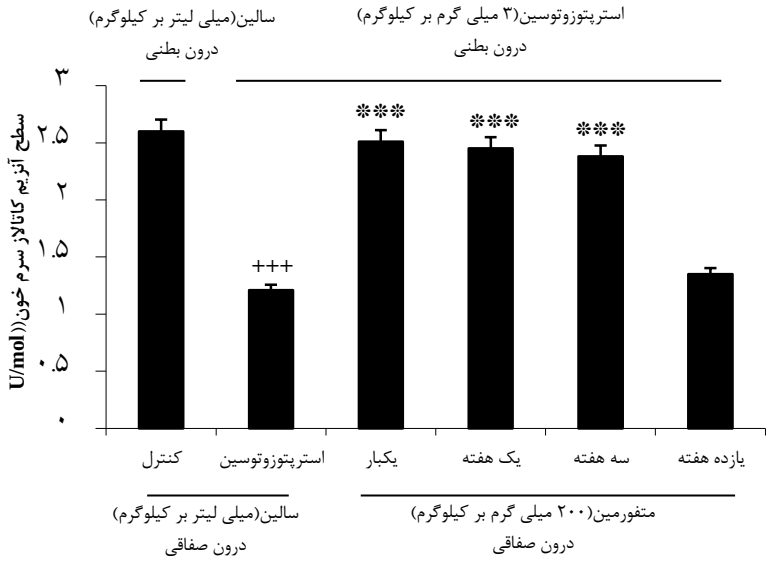
ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از آنالیزهای سرم خون نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در روزهای اول و سوم پس از جراحی میزان

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم کاتالاز سرم خون نسبت به گروه کنترل را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۰۱). آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی STZ به همراه متفورمین نشان داد که تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) در طول تیمارهای مختلف یک‌بار، یک هفته و سه هفته منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سرم نسبت به گروه STZ می‌شود (P<۰/۰۰۱). در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز کل سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد (P>۰/۰۵) [f(5,21)=29/763] (جدول ۲) و (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سرم در گروه‌های تیمار شده با استرپتوزوتوسین و متفورمین

تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سرم را نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در گروه‌های دریافت کننده STZ به همراه متفورمین در دوره تیمارهای یک نوبته، یک هفته و سه هفته میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سرم نسبت به گروه STZ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در گروه دریافت کننده STZ به همراه متفورمین به مدت ۱۱ هفته تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سرم نسبت به گروه STZ دیده نشد. نتایج به‌صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل توکی برای هشت سر حیوان انجام شد. ($p<۰/۰۰۱^{+++}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین و ($p<۰/۰۰۱^{***}$) تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین و گروه‌های دریافت کننده استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg) در روزهای اول و سوم پس از جراحی سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم خون را نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش داد و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز سرم را نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد.

مطالعات گذشته نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می‌کند (۲۰-۱۹، ۳۵-۳۳) استرپتوزوتوسین با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید اما کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی کل، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (۳۶). علاوه بر آن استرپتوزوتوسین با ایجاد رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون

www.SID.ir

Archive of SID

لیپیدی، کربونیله شدن پروتئین‌ها، کاهش سطح گلوتاتیون و اختلال در عملکرد میتوکندری شده که نتیجه آن استرس ردوکس، افزایش سطح آپاپتوز در نورون‌ها و سرانجام توسعه بیماری‌های نورودژنره است (۳۷). تحقیقات نشان داده است تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث تخریب حافظه، افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۳۳). در تحقیق دیگری تزریق استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل بطن مغزی باعث کاهش معنی‌دار سطح آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۳۸).

استرپتوزوتوسین با اثر بر سلول‌های گلیال و فعال‌سازی آن‌ها فاکتورهای التهابی از جمله سیتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها، اینترفرون‌ها، نیتریک‌اکساید و سوپراکساید را آزاد کرده و با افزایش سطح استرس اکسیداتیو باعث آسیب نورونی خواهند شد. این ترکیبات تولید شده در فرایندهای التهابی به واسطه آزاد سازی ترکیبات سمی باعث تغییر در عملکرد نورون‌ها می‌شود (۳۷). علاوه بر این استرپتوزوتوسین با تولید نیتریک اکساید باعث آسیب به DNA می‌شود. استرپتوزوتوسین فعالیت گوانیل‌سیکلاز را افزایش می‌دهد که معیار عمل نیتریک‌اکساید است. سلول‌هایی که دارای سطح پائینی از پاک‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد هستند در برابر نیتریک‌اکساید و رادیکال‌های آزاد حاصل از آن به شدت آسیب‌پذیر هستند (۳۷). تولید رادیکال‌های آزاد با واکنش‌های التهابی در بدن همراه است، این فرایندها در کنار استرس اکسیداتیو و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باعث پیشبرد ایجاد استرس اکسیداتیو خواهد شد.

در پژوهش حاضر تزریق متفورمین (۲۰۰mg/kg) به‌صورت درون صفاقی در دوره تیمارهای یک نوبته، یک هفته و سه هفته توانست اثرات سوء STZ را بر بازخوانی حافظه و شاخص‌های استرس اکسیداتیو بهبود ببخشد. در این دوره تیمارها متفورمین توانست منجر به کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدهید و افزایش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانی کل شده و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده STZ بهبود ببخشد.

پژوهش‌های گذشته نیز در جهت تایید نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد (۱۵، ۲۶- ۲۳). در پژوهشی که توسط شفیع زاد و همکاران (۱۳۹۴) انجام شد مصرف متفورمین (۱۵۰mg/kg) از طریق گاواژ در رت‌های با رژیم غذایی پرچرب و مستعد آلزایمر به مدت ۲۱ روز باعث بهبود حافظه و عملکرد حیوانات آزمایشگاهی در آزمون ماز آبی موریس شد. هم‌چنین متفورمین وزن بدن، سطح گلوکز خون، سطح کلسترول، سطح انسولین خون و سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم خون و بافت مغز را بهبود بخشیده و استرس اکسیداتیو میتوکندریایی و میزان رادیکال‌های آزاد را کاهش داد (۳۹). در تحقیق دیگری تزریق درون صفاقی متفورمین در دوزهای ۵۰،۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت سه روز باعث بهبود معنی‌دار سطح گلوکز، مالون‌دی‌آلدهید و آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز سرم خون شد (۲۰). بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است کشت سلول‌های $pc1_2$ در محیط کشت حاوی متفورمین به مدت ۶۰ دقیقه قبل از ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌ها به کمک H_2O_2 باعث بهبود سطح آنزیم کاتالاز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های تیمار شده با متفورمین نسبت به گروه کنترل می‌شود (۴۱).

متفورمین خواص آنتی‌اکسیدانی دارد که مکانیسم عمل آن به‌طور کامل شناخته نشده است. به نظر می‌رسد متفورمین با جلوگیری از کمپلکس ۱ میتوکندریایی، سطح ATP را کاهش داده و مسیر کاتابولیک وابسته به پروتئین کیناز وابسته به AMP را فعال می‌کند، به این ترتیب ساخت گلوکز از منابع جدید کاهش می‌یابد (۱۸). مسیر دیگر کاهش گلوکونئوژنز کاهش تولید فروکتوز ۱ و ۶- بیس فسفات است. بررسی‌ها نشان داده است سطح بالای گلوکز خون زمینه‌ساز افزایش سطح تولید گونه‌های اکسیژن فعال است. متفورمین همچنین با اثر بر میزان فعالیت پروتئین کیناز C قادر به کاهش سطح استرس اکسیداتیو است (۲۲). علاوه بر آن متفورمین قادر به کاهش لیپوژنز و کاهش سطح سرمی لیپیدهاست. متفورمین با فعال کردن آدنوزین مونوفسفات پروتئین کیناز (AMPK) نقش مهمی در

www.SID.ir

Archive of SID

سیگنال‌دهی انسولین، تعادل انرژی کل بدن، متابولیسم گلوکز و چربی‌ها دارد. متفورمین AMPK را فعال کرده و به‌دنبال آن فسفوریلاسیون استیل کوآکربوکسیلاز مهار و سطح مالونیل کوآ که پیش‌ساز مهم ساخت اسیدهای چرب است کاهش می‌یابد. از سوی دیگر متفورمین باعث فعال شدن لیپوپروتئین لیپاز شده و لیپوپروتئین VLDL به اسیدچرب تجزیه شده و امکان اکسیداسیون اسیدهای چرب را فراهم می‌کند. متفورمین سطح کلسترول را نیز کاهش می‌دهد. متفورمین با فعال کردن AMPK آنزیم سیتوزولی بیوسنتز کلسترول (۳- هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز) را فسفریله و مهار می‌کند، درنتیجه بیوسنتز کلسترول کاهش می‌یابد. هم‌چنین AMPK با کاهش بیوسنتز تری‌آسیل‌گلیسرول در کبد سطح تری گلیسرید را کاهش می‌دهد. با کاهش کلسترول و تری گلیسیرید در سرم خون سطح استرس اکسیدتیو نیز کاهش می‌یابد (۴۲).

در پژوهش حاضر همچنین مشخص شد تجویز درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت یازده هفته نتوانست به‌طور معنی‌داری اثرات ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین را بر بازخوانی حافظه و شاخص‌های استرس اکسیداتیو بهبود دهد. در این دوره تیمار اختلاف معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدهید، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین دیده نشد.

مطالعات قبلی نتایج متفاوتی را در این زمینه گزارش نموده است. در تحقیقی تزریق درون صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) به مدت ۱۸ هفته در موش‌های دیابتی منجر به کاهش سطح پروتئین سیناپتوفیزین و بهبود نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس شد (۲۸). این در حالی است که اضافه نمودن متفورمین به میزان ۱ درصد از وزن بدن به آب آشامیدنی حیوانات دارای رژیم غذایی پر چرب به مدت ۶ ماه تاثیری بر میزان حافظه، یادگیری و توانایی‌های شناختی حیوانات نداشت (۴۳). در مطالعه دیگری مصرف روزانه متفورمین (۱۰۰۰ mg/kg) به مدت سه ماه در افراد مبتلا به دیابت سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کل (FRAP) را به طور معنی‌داری افزایش داد (۴۰). این در حالی است که تحقیقات دیگر نشان می‌دهد در رت‌های تیمار شده با متفورمین (۱۵۰mg/kg سه بار در روز) جهت درمان سندروم تخمدان پلی کیستیک، سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم خون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان نمی‌دهد (۱۴). همچنین در پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده شد که مصرف مزمن متفورمین باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو می‌شود (۴۵-۴۴). تحقیقات نشان داده است که مصرف طولانی مدت متفورمین در افراد مسن و یا افراد با نارسایی‌های کلیوی، کبدی و قلبی با خطر بالای اسیدوز لاکتیک و به دنبال آن افزایش سطح استرس اکسیداتیو همراه است (۲۲). متفورمین احتمالاً از طریق افزایش سطح هموسیستئین که با افزایش آنیون سوپر اکسید و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه است استرس اکسیداتیو را بالا می‌برد (۱۴). در تحقیق حاضر نیز تجویز درون‌صفاقی متفورمین (۲۰۰mg/kg) به مدت یازده هفته نتوانست سطح استرس اکسیداتیو را در مقایسه با گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین کاهش دهد.

لذا به نظر می‌رسد که در تیمار حاد متفورمین این دارو قادر است از طریق کاهش تنفس میتوکندریایی و دارا بودن خاصیت کاهنده گلوکز خون، همچنین کاهش تولید رادیکال‌های آزاد از طریق کاهش سطح اسیدهای چرب و کلسترول، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. درحالی‌که مصرف مزمن متفورمین از طریق افزایش اسیدوز لاکتیک، استرس اکسیداتیو را افزایش داده و منجر به ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌ها می‌شود.

علی‌رغم نتایج به دست آمده جهت تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود تا به‌دنبال تزریقات حاد و مزمن متفورمین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شاخص استرس اکسیداتیو به‌طور موضعی در نورون‌های هیپوکامپ نیز مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با کمک مالی دانشگاه اراک انجام شده است. از زحمات کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1-Mecocci P, Polidori M. ***Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.*** Biochim Biophys Acta 2012; 1822: 631-38.

2-Parsa N. ***Alzheimer's disease: A medical challenge of 21st century.*** AMUJ 2011; 14(55): 100-108.

3-Khan J, Parsa N, Harada T, Meltzer P, Carter N. ***Detection of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization.*** Cancer Genet Cytogenet 1998; 103(2): 95-100.

4-Roriz-Filho J, Sá-Roriz T, Rosset I, Camozzato A, Santos A, Chaves M. ***(Pre) diabetes, brain aging, and cognition.*** Biochim Biophys Acta 2009; 1792(5): 432-43.

5-Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, et al. ***Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cogniive impairment.*** Ageing Res Rev 2009; 285-305.

6-Babaei Abraki SH, Chavoshi-Nezhad S. ***Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Alzheimer Disease.*** Shefa Neurosci Res Cen 2014; 2: 1.

7-Rukmini MS, Benedicta DS, Vivian DS. ***Superoxide Dismutase and Catalase Activitis and Their Colleration with Malondialdehyde in Schizophrenic Patients.*** Indian J Clin Biochem 2004; 19 (2): 114-18.

8-Kolhe SM, Khanwelkar C. ***Oxidative Status and Effect of Metformin on Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus Patients.*** Journal of Medical Education & Research 2012; 2: 2.

9-Agarwal A, Anandh Prabakaran S. ***Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance.*** Iranian J of rep med 2005; 3(1): 1-8.

10-Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakivic M, Mazur M. ***Free radicals, metals and antioxidant in oxidative stress – induced cancer.*** Chemo-biological interactions, 160(1): 1-40.

11-Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. ***Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult rats.*** Brain Res 2006; 532: 95-100.

12-Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. ***What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer`s disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer`s research.*** J Neural Transm 2013; 120(1): 233-52.

13-Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. ***Central insulin resistanceas a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach.*** J Neural Transm Suppl 2007; 72: 217-33.

14-Cheraghi E, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh MA, Nasr Esfahani MH, Ebrahimi Z. ***Co-Administration of Metformin and N-Acetyl Cysteine Fails to Improve Clinical Manifestations in PCOS Individual Undergoing ICSI.*** Int J Fertil Steril 2014; 8(2): 119-28.

15-Esmaeili MH, Mafe-Esmaeili M. ***The effect of metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin-induced rat model of alzheimer's disease.*** J of Kashan Uni of Med Sci 2014;

www.SID.ir

Archive of SID

19(1): 1-7.

16-Kim HJ, Jin BY, Oh MJ, Shin KH, Choi SH, Kim DH. ***The effect of metformin on neuronal activity in the appetite-regulating brain regions of mice fed a high-fat diet during an anorectic period.*** Physiol Behav 2016; 54: 184-190.

17-Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S, et al. ***Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke.*** Brain Behav Immun 2014; 40: 131-142.

18-Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn S. ***Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats.*** Life Sci 2012; 91: 409-14.

19-Ma J, Yu H, Liu J, Chen Y, Wang Q, Xiang L. ***Metformin attenuates hyperalgesia and allodyniain rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin.*** Eur J Pharmacol 2015; 764: 599-606.

20-Da Silva D, Zancan P, Santos Coelho W, Sales Gomez L, Sola-Penna M. ***Metformin reverses hexokinase and 6-phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse.*** Arch Biochem Biophys 2010; 496: 53-60.

21-Zhao R, Xu X, Xu F, Zhang W, Zhang W, Liu L, et al. ***Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazole-induced kindling in mice.*** Biochem Biophys Res Commun 2014; 448: 414-17.

22-Rojas LB, Gomes MB. ***Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes.*** Diabetol Metab Syndr 2013; 5: 6.

23-Ghasemi Abhari L, Esmaeili MH, Benanaj M. ***Effects of metformin intra ventricular injection on learning and spatial memory in streptozotocin rat model of alzheimer's disease.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(1): 1764-75 [persian].

24-Haghdost H, Esmaeili MH, Sofiabadi M, Rastak S, Heydari B, Charmchi Z, et al. ***Effects of Metformin Microinjection into Lateral Ventricles on Memory Retention of Streptozotocin Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease.*** J Rafsanjan Univ Med Sci 2014; 14(3): 222-211 [persian].

25-Oliveira AV, Vilaça R, Santos CN. ***Exploring the power of yeast to model aging and age-related neurodegenerative disorders.*** Biogerontology 2016: 1-32.

26-Lennox R, Porter D, Flatt P, Holscher C, Irwin N, Gault V. ***Comparison of the independent and combined effects of sub-chronic therapy with metformin and a stable GLP-1 receptor agonist on cognitive function, hippocampal synaptic plasticity and metabolic control in high-fat fed mice.*** Neuropharmacology 2014; 86, 22-30.

27-Paxinos G, Watson C. ***The rat brain in stereotaxic***. 4th ed, San Diago: Academic Press 1998: 21.

www.SID.ir

Archive of SID

28-Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. ***Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice.*** Pharmacol Biochem Behav 2012; 101: 564-74.

29-Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. ***Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats.*** J Psychopharmacol 2002; 16(4): 313-19.

30-Gohari AR, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Ajani Y, Hadjiakhoondi A. ***Antioxidant Activity of some Medicinal Species using FRAP Assay.*** J of Med Plants 2011; 10(37): 54-59.

31-Marklund S, Marklund G. ***Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase.*** Eur J Biochem 1974; 47: 469-74.

32-Aebi H. In: ***Catalase in Vitro. Methods in Enzymology.*** Colowick SP, Kaplan. Florida: Acad 1984; 105: 114-21.

33-Vishwakarma S, Goyal R, Gupta V. ***GABAergic effect of valeric acid from Valeriana wallichii inamelioration of ICV STZ induced dementia in rats.*** Kanaya Lal Dhar Revista Brasileira de Farmacognosia 2016.

34-Beheshti S, Aghaie R. ***Therapeutic effect of frankincense in a rat model of Alzheimer's disease.*** Avicenna J Phytomed 2016; 6 (4): 468-75.

35-Bahramian A, Rastegar K, Namavar MR, Moosavi M. ***Insulin potentiates the therapeutic effect of memantine against central STZ-induced spatial learning and memory deficit.*** Behav Brain Res 2016; 311: 247-54.

36-Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, et al. ***Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial.*** Clin Nutr 2013; 32: 179-85.

37-Kamat P. ***Streptozotocin (ICV) induced neurotoxicity and brain insulin resistant: A therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD) like pathology.*** Mol Neurobiol 2016; 53(7): 4548-62.

38-Misra SH, Kuhad A, Chopra K. ***Neurobiological effect of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, in experimental paradigm of Alzheimer' disease.*** Indian J Exp Biol 2013; 51: 1086-93.

39-Shafi Zad A, Rezaei A, Rohbani Nobar M, Mohajeri D, Rahmani Kahnamoui J. ***The effects of metformin on serum glucose and lipid profiles and oxidative stress in diabetic rats with alloxan.*** Path comparison Res 2013; 10(1): 865-72 [Persian].

40-Mirmiranpour H, Mousavizadeh M, Noshad S, Ghavami M, Ebadi M, Ghasemiesfe M, et al. ***Comparative effects of pioglitazone and metformin on oxidative stress markers in newly diagnosed type 2 diabetes patients: A randomized clinical trial.*** J Diabetes Complications 2013; 27: 501-7.

41-Khallaghi B, Safarian F, Nasoohi S, Ahmadiani A, Dargahi L. ***Metformin-induced protection against oxidative stress is associatedwith AKT/mTOR restoration in PC12 cells.*** Life Sciences 2016; 148: 286-92.

42-Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. ***Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview.*** Clinical Science 2012; 122 (6): 253-70.

www.SID.ir

Archive of SID

43-Allard JS, Perezb EJ, Fukuic K, Carpentera P, Ingrame D, Cabod R. ***Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice.*** Behav Brain Res 2016; 301: 1-9.

44-Pavlovic D, Kocic R, Kocic G, Jevtovic T, Radenkovic S, Mikic D, et al. ***Effect of four week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes.*** Diabetes Obes Metab 2000; 2: 251-56.

45- Yilmaz M, Bukan N, Ayvaz G, Karakoç A, Törüner F, Çakir N, et al. ***The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome.*** Hum Reprod 2005; 20(12): 3333-40.

www.SID.ir

Archive of SID

Comparing the Acute and Chronic Effects of Metformin on Serum Oxidative Stress factors in Streptozotocin-Induced Alzheimeric Male Rats

Niloufar Darbandi [*1], Samira Moghadasi [2], Hamid Reza Momeni [3]

[1,2,3] Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Iran. Arak

Received: 21 Dec 2016 **Accepted:** 6 Apr 2017

Abstract

Introduction: Studies have indicated that metformine has different effects on learning and memory. In this study, both acute and chronic therapeutic effects of metformin on memory retrieval and some serum oxidative stress factors in Streptozotocin -induced Alzheimeric male rats were investigated.

Methods: In this experimental study, 48 rats were divided into six groups (n=8) as follows: saline - saline, streptozotocin - saline, and streptozotocin - metformine (once, one week, three weeks and eleven weeks). Intracerebroventricular administrations of streptozotocin (3mg/kg) were done at the first and third day of the surgery. Intraperitoneally administrations of saline (ml/kg) or metformin (200mg/kg) was started one day before the surgery and continued until the end of the care period. The animals' memory was evaluated through passive avoidance learning; blood serums were used to measure the levels of malondialdehyde, assessment of Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), levels of superoxide dismutase and catalase enzymes.

Results: Streptozotocin (STZ) significantly reduced the memory retrieval and the levels of FRAP, superoxide dismutase and catalase enzymes and it significantly increased the level of malondialdehyde compared to the control group ($p<0/001$). Administration of metformin (once, one week and three weeks) improved the memory retrieval and serum oxidative stress factors compared to the STZ group ($p<0/001$). While the administration of metformin in eleven weeks group did not have any significantly differences compared to the STZ group ($p>0/05$).

Conclusion: It seems that administration of acute and chronic metformin has different effects on the memory retrieval that it may be due to the effect of chronic metformin in increasing the level of oxidative stress factors in serum.

Key words: Acute and Chronic Metformin, Serum Oxidative Stress Factors, Streptozotocin.

This paper should be cited as:

Darbandi N, Moghadasi S, Momeni HR. **Comparing the Acute and Chronic Effects of Metformin on Serum Oxidative Stress factors in Streptozotocin-Induced Alzheimeric Male Rats.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(3): 206-21.

***Corresponding author: Tel: 086- 34173317, email: N-Darbandi@araku.ac.ir**

www.SID.ir