Original Article

Effects of Insulin and Ascorbic Acid on Inhibition of the Apoptosis in Hippocampus of STZ-Induced Diabetic Rats

Jafari Anarkooli I., Ph.D.*, Sankian M., Ph.D., Varasteh A.R., Ph.D., Haghir H., Ph.D.

** Anatomy Department, Medicine School, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate effects of insulin and ascorbic acid on rate of Caspase – 3 activity and DNA Laddering in hippocampus of STZ-induced diabetic rats.

Materials and Methods: Thirty male Wistar rats in five groups, 6 in each group: one control group (group C) and four diabetic groups [diabetic control (group D), treatment with insulin (group I), with ascorbic acid (group AA) and with insulin plus ascorbic acid (group I+AA)] were used in this study. Diabetes was induced by injection of 60 mg/kg STZ IP. After six weeks, rats in group I were treated with insulin (4-6 U/kg/day Sc.), rats in group AA treated with ascorbic acid (200 mg/kg/day, IP) and rats in group I+AA treated with equal dosage of both insulin and ascorbic acid for two weeks. Rats in group D were treated with saline and considered as the diabetic control group. Two weeks after treatment, animals were anesthetized and hippocampus was dissected from hemispheres. Caspase-3 activity was assessed by Fluorometry, and finally, DNA fragmentation due to apoptosis was determined by DNA laddering Assay.

Results: Caspase-3 activity in group D significantly increased compared to group C (6.7 fold), whereas it decreased after treatment with insulin, ascorbic acid or both (2.6, 4.2 and 5.1 fold, respectively). DNA laddering was observed in group D, but not in three treated groups.

Conclusions: From this survey it was concluded that treatment of STZ-induced diabetic rats with insulin and/or L-ascorbic acid could possibly inhibit apoptosis in hippocampal tissues using decrease of Caspase -3 activity and prevention of DNA Laddering.

Key words: Diabetes, Apoptosis, Ascorbic acid, Insulin, Hippocampus

Archive of SID

www.SID.ir

مقاله تحقیقی

بررسی آثار ال- اسید اسکوربیک و انسولین در پیشگیری از آپوپتوز ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین

ایرج جعفری انارکولی .Ph.D *، مجتبی سنکیان .Ph.D **، عبدالرضا وارسته .Ph.D **، حسین حقیر .Ph.D ***

* گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
**مرکز تحقیقات و گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
*** گروه علوم تشریحی و واحد تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
تاریخ وصول: مردادماه ۱۳۸۸، تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۸

چکیده

هدف: بررسی آثار انسولین و اسید اسکوربیک برمیزان فعالیت کاسپاز- ۳ و بروز نمای نردبانی در DNA کروموزومی هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar (پنج گروه ٦ تایی یعنی برای هر روش در هر گروه سه سر موش صحرایی) شامل گروه کنترل (C) و چهار گروه دیابتی [(کنترل (D)، تحت تیمار با انسولین (I)، تحت تیمار با اسید اسکوربیک (AA) و تحت تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک به‌صورت ترکیبی (I+AA)] استفاده شد. دیابت توسط تزریق استرپتوزوسین (IP ،٦٠mg/kg) القاء شد. شش هفته پس از القای دیابت، گروه I، انسولین با دوز ٤U/kg/day-٦ به‌صورت تزریق زیر جلدی، گروه AA، اسید اسکوربیک با دوز (IP،٢٠٠mg/kg/day) به‌صورت داخل صفاقی و گروه I+AA نیز ترکیبی از دو مورد فوق را با همان دوز دریافت کرد. گروه D و گروه C، نرمال سالین دریافت کرد. دو هفته بعد از تیمار، موش‌های صحرایی کشته شده، هیپوکامپ آن‌ها خارج و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. سپس DNA برای استفاده در روش ارزیابی نمای نردبانی DNA (DNA Laddering Assay) استخراج و همچنین فلورومتری برای بررسی میزان فعالیت کاسپاز- ۳ انجام شد.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت کاسپاز-۳ در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه D نسبت به موش‌های صحرایی گروه C افزایش می‌یابد (٦/٧ برابر)، در حالی‌که تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک سبب کاهش فعالیت کاسپاز- ۳ در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA به‌ترتیب به میزان ۲/٦، ٤/۲ و ۵/۱ برابر شد. به‌علاوه استفاده از انسولین و اسید اسکوربیک سبب مهار بروز پدیدهٔ نمای نردبانی (DNA Laddering) در DNA کروموزومی سلول‌های ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک احتمالاً می‌تواند آپوپتوز ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین را از طریق کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و جلوگیری از بروز پدیدهٔ نمای نردبانی (DNA Laddering) در DNA کروموزومی، مهار کند.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، اسید اسکوربیک، انسولین، دیابت، هیپوکامپ

آدرس مکاتبه: ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
E-mail: anarkool@zums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دیابت قندی شایع‌ترین اختلال متابولیک مزمن همراه با افزایش قند خون در انسان است. دیابت می‌تواند ناشی از فقدان انسولین (دیابت نوع۱) یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع۲) باشد [۱].

براساس مطالعات انجام شده، در سال ۲۰۰۰ شیوع جهانی دیابت ۲/۸ درصد بوده است و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۱۰ بیش از ۲۰۰ میلیون نفر از مردم جهان به دیابت مبتلا شوند [۲].

افزایش مزمن قند خون در دراز مدت منجر به آسیب اندام‌ها و سیستم‌های مختلفی از جمله سیستم قلبی عروقی، چشم، کلیه، سیستم عصبی و در نهایت اختلال در کارکرد آنها می‌شود [۳]. آنسفالوپاتی دیابتی به‌وسیله نقص در یادگیری و حافظه، اختلالات نوروشیمیایی و ساختمانی در سیستم عصبی مرکزی مشخص می‌شود [٤و٥]. آسیب مستقیم نورون‌ها ممکن است ناشی از افزایش گلوکز داخل سلولی باشد که در نهایت اغلب منجر به مرگ نورون ها می‌شود [٦].

در سال‌های اخیر گزارش شده است که دیابت سیستم عصبی مرکزی را نیز درگیر می‌کند و در داخل سیستم عصبی مرکزی، هیپوکامپ نیز به‌عنوان یک هدف ویژه در بیماری دیابت درگیر می‌شود [۷]. اختلالات شناختی ناشی از آسیب نورون‌های هیپوکامپ نیز از عوارض دیابت است، به‌علاوه گزارش شده است که نقص در حافظه و یادگیری در افراد دیابتی شایع‌تر از افراد غیر دیابتی است [۸-۱۰]. بنابراین هیپوکامپ به عنوان یک مرکز مهم در یادگیری و حافظه نسبت به افزایش قند خون حساس بوده و نورون‌های آن در دیابت نوع ۱ فوق‌العاده آسیب‌پذیر هستند [۱۱و۱۲].

هر چند مکانیسم‌های تخریب سلول‌های عصبی، ناشی از دیابت، در هیپوکامپ کاملاً مشخص نشده است، امّا تحقیقات نشان داده است که آتروفی دندریتی، تنظیم کاهشی گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید، تغییر بیان گیرنده‌های فاکتور رشد شبه انسولینی، کاهش انتقال دهنده‌های انسولین و القای آپوپتوز می‌توانند در این امر دخیل باشند [۱۳].

اگرچه کنترل شدید قند خون در جلوگیری از عوارض دیابت مطلوب به نظر می‌رسد اما به‌ندرت قابل انجام است. از طرفی مشخص شده که استفاده از درمان‌های مکمل می‌تواند در جلوگیری یا به تأخیر انداختن شروع عوارض دیابت کمک کند [١٤]. تحقیقات نشان داده است که انسولین در پیشگیری یا برگرداندن عوارض عصبی ناشی از دیابت مانند اختلالات یادگیری، ترمیم پذیری سیناپسی و همچنین سرعت هدایت عصبی نقش دارد [۱۵]. به‌علاوه گزارش شده است که انسولین و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-1) از آپوپتوز اولیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی یا رده سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [١٦-١٨].

از طرف دیگر استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از علل اصلی تغییرات دژنراتیو مزمن در دیابت مطرح شده و نشان داده شده است که تیمار با آنتی اکسیدان‌ها از بروز برخی عوارض دیابت کاسته است [۱۹] و اسید اسکوربیک به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان، بافت‌ها را از صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کند [۲۰].

بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش انسولین به‌عنوان کنترل کننده قند خون و اسید اسکوربیک به‌عنوان یک آنتی اکسیدان در پیشگیری از آپوپتوز ناحیه هیپوکامپ رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوسین است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar به وزن تقریبی ۲۰۰ تا۲۵۰ گرم و سن تقریبی ۸ تا۱۰ هفته، تهیه شده از حیوان‌خانه پژوهشکده بوعلی انجام شده است. حیوانات در حیوان‌خانه پژوهشکده و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲±۲۳ سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات پس از وزن‌کشی و کنترل

Archive of SID
www.SID.ir

قند خون از طریق وریـد دُمـی بـا اسـتفاده از دسـتگاه گلوکـومتر (Bioname; Bioname, UK)، به‌طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی شامل یک گروه کنترل (C) و چهار گروه دیابتی [به‌ترتیـب گـروه دیابتی کنترل (D)، گروه دیابتی تحت تیمار با انـسولین (I)، گـروه دیابتی تحت تیمار با اسید اسکوربیک (AA) و گرو ه دیابتی تحت تیمار با انسواین به‌اضافه اسید اسکوربیک (I+AA)] تقسیم شـدند. موش‌های صحرایی گروه‌هـای دیـابتی پـس از طـی ۲٤ سـاعت گرسـنگی و بعـد از بیهوشـی توسـط کلروفـرم، بـا داروی استرپتوزوسـین (Pharmacia and Upjohn, USA) بـا یکبـار تزریـق داخل صفاقی (IP:IntraPeritoneal) به مقدار ٦۰mg/kg دیابتی شدند [۲۱]. برای تزریق، استرپتوزوسین در سرم فیزیولـوژی حـل شـد. گروه C فقط نرمال سالین دریافت کردند. سه روز پـس از تزریـق استرپتوزوسـین مـوش‌هـای صـحرایی بـا قنـد خـون بـالاتر از ۲۵۰mg/dl، دیابتی در نظر گرفته شدند [۲۲]. در پایان هفته شـشم در حالی‌که هر هفته وزن و قند خون حیوانات به‌طور دقیق کنتـرل و ثبت شد، گـروه I تحـت تیمـار بـا انـسولین پروتـامین (NPH) (داروسازی اکسیر بروجرد، ایران) به‌میـزان ٤ تـا ٦ واحـد در روز به‌صورت تزریق زیر جلـدی (SubCutaneous)، گـروه AA تحـت تیمار با ویتامین C (داروپخش تهران، ایران) (ال- اسکوربیک اسید به فرم قابل تزریق ۵۰۰ mg در ۵ میلی لیتر) بـا دوز ۲۰۰mg/kg در روز به‌صورت تزریق داخـل صـفاقی (IP) و گـروه I+AA تحـت تیمار با انسولین به‌اضافه اسید اسکوربیک به مدت دو هفتـه قـرار گرفتند. گروه C و D به مقدار مساوی نرمال سالین دریافت داشتند.

در پایان دوره درمانی وزن و قند خون موش‌های صحرایی کنترل و یادداشت شـد. مـوش‌هـای صـحرایی بـا اسـتفاده از کلروفرم بیهوش و کشته شده، جمجمـه آن‌هـا در طـول خـط وسط باز و مغز رت‌ها خارج و وزن شد و روی تختـه بـرش یخ بسته (Ice-cooled) قرار داده شد و پرده‌های مننـژ بـه‌دقـت برداشته و سپس هیپوکامپ به‌دقت تـشریح و جـدا شـد و بـه تانـک ازت مـایع منتقـل و در دمـای ۷۰- سـانتی‌گـراد بـرای استخراج پروتئین، DNA و آزمایش‌های دیگر ذخیره شد.

سنجش فعالیت کاسپاز -۳

در این مطالعه برای بررسی میـزان فعالیـت کاسـپاز- ۳ از کیت Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit (K105) تهیـه شده از شرکت Biovision (CA, USA) استفاده شد. بـرای هـر آزمایش، ۵۰ میکروگرم از نمونه بافتی هیپوکامـپ مـوش‌هـای صحرایی مورد مطالعه، استفاده شد.

در پایان شدت فلورسـنت حاصـل بـا دسـتگاه فلـورومتر Shimatso (Jasco, FP-6200, Japan) با طول موج تحریـک ٤۰۰ نانومتر و طول موج انتشار۵۰۵ نانومتر قرائـت شـد. ضـریب- افزایش (Fold increase) فعالیت کاسـپاز- ۳ از طریـق مقایـسهٔ نتـایج بافـت هیپوکامـپ مـوش صـحرایی دیـابتی شـده بـا استرپتوزوسین با نتایج مربوط به بافت بـدون آپوپتـوز (بافـت هیپوکامـپ مـوش صـحرایی غیـر دیـابتی) همچنـین بافـت هیپوکامپ موش‌های دیابتی تیمـار شـده بـا انـسولین و اسـید اسکوربیک به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی تعیین شد.

شناسایی DNA Laddering

برای شناسـایی نمـای نردبـانی DNA کرومـوزومی در فراینـد آپوپتوز ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی مورد آزمایش از کیت Quick apoptotic DNA Laddering Detection kit (Biovision, USA) استفاده شد. پس از استخراج DNA طبـق پروتکـل کیـت، ۱۵ میکرولیتـر از محـصول نهـایی تکثیـر هـر نمونـه روی یـک ژل آگارز ۱/۲ درصد رنـگ شـده بـا اتیـدیوم بروماید بـرای مشاهده و عکس‌برداری باندها در داخـل چاهـک‌هـای تعبیـه شده در ژل ریخته شد. در پایان باندها بـا اسـتفاده از دسـتگاه Bio Imaging System (Syngene, U.K.) مشاهده و عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بـرای تجزیـه و تحلیـل آمـاری داده‌هـا از آزمـون آنـالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه، Tukey test و آزمون T.student استفاده و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۱/۵) برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه پارامترهای وزن و قند خون موش های صحرای گروه های مختلف

گروه / پارامتر	C	D	I	AA	AA+I
وزن اولیه (گرم)	۲۴۳/۷۵±۹/۲۵	۲۴۷/۰۸±۱۹/۰۸	۲۱۳/۴۰±۱۰/۱۰	۲۰۵/۲۵±۱۱/۳۰	۱۹۸/۳۰±۱۳/۰۴
وزن نهایی (گرم)	۳۰۶/۰۰±۱۰/۴۰	۱۹۸/۱۷±۲۱/۰۴*	۲۳۷/۰۸±۱۲/۷۰**	۲۱۹/۵۰±۱۹/۳۰**	۲۲۴/۰۰±۱۷/۲۰**
قند خون اولیه (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۰۹/۴۰±۵/۶۰	۱۰۶/۹۰±۶/۳۰	۴۷۹/۴۰±۲۳/۳۰	۴۷۲/۷۵±۳۲/۰۰	۴۹۶/۲۵±۳۱/۶۰
قند خون نهایی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۱۱/۲۵±۱/۳۰	۴۷۷/۱۰±۲۸/۴۰*	۱۱۱/۲۵±۱۱/۲۰**	۴۸۳/۱۷±۲۶/۹۰	۱۱۸/۳۰±۱۱/۵۰**

*P<0.0 در مقایسه با گروه کنترل (C)

**P<0.0 در مقایسه با گروه دیابت (D)

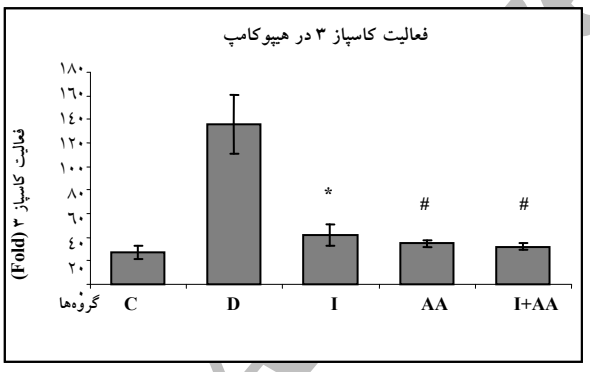
یافته‌ها

تغییرات مربوط به قند خون و وزن حیوانات

میزان قند خون موش‌های صحرایی دیابتی سه روز بعد از تزریق استرپتوزوسین برابر یا بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. در پایان دوره درمانی میزان قند خون موش‌های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به رت‌های گروه D به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (p<۰/۰۱). در ابتدا هر پنج گروه وزن تقریباً یکسانی داشتند. در پایان هفته ششم وزن موش‌های صحرایی گروه‌های دیابتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه C کاهش یافت (p<۰/۰۱). همچنین در پایان دوره درمانی وزن موش‌های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به موش‌های صحرایی گروه D به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) افزایش یافت. اختلاف معنی‌داری بین وزن موش‌های صحرایی گروه AA و D و همچنین گروه I و I+AA مشاهده نشد (به‌ترتیب p=۰/۲ و p=۰/۸) (جدول ۱).

کاسپاز- ۳

کاسپازها نقش اساسی در آپوپتوز دارند و در میان کاسپازها، کاسپاز- ۳ در القای آپوپتوز در سیستم عصبی مرکزی نقش کلیدی دارد. فعالیت کاسپاز-۳ در موش‌های صحرایی گروه D نسبت به موش‌های صحرایی گروه C بعد از هشت هفته دیابتی شدن توسط استرپتوزوسین ۶/۷ برابر افزایش یافت (به‌ترتیب ۳۵/۸ ± ۱۴۰/۵ و ۵/۹ ± ۲۱/۰، p<۰/۰۰۱). در حالی‌که، بعد از دو هفته تیمار با انسولین (گروه I) و اسید اسکوربیک (گروه AA) و انسولین و اسید اسکوربیک به‌طور همزمان (گروه I+AA)، از فعالیت کاسپاز ۳ به‌ترتیب به‌میزان ۳/۹، ۴/۲ و ۵/۱ برابر (به‌ترتیب ۲۰/۳±۳۶/۰، ۳/۸±۳۳/۳ و ۵/۵±۲۷/۴) کاسته شد ولی به اندازه فعالیت کاسپاز- ۳ در گروه C کاهش نیافته است (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی آثار انسولین و اسید اسکوربیک به‌تنهایی و به‌طور همزمان بر میزان فعالیت کاسپاز- ۳ در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه دیابتی تحت تیمار انسولین I، گروه دیابتی تحت تیمار اسید اسکوربیک AA و گروه دیابتی تحت تیمار انسولین + اسید اسکوربیک I+AA. میزان فعالیت کاسپاز- ۳ در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه‌های AA و I+AA و گروه I در مقایسه با گروه D معنی‌دار است. داده‌ها به‌صورت Mean ± S.E.M آمده‌اند (از تعداد ۳ سر موش صحرایی در هر گروه استفاده شده است).

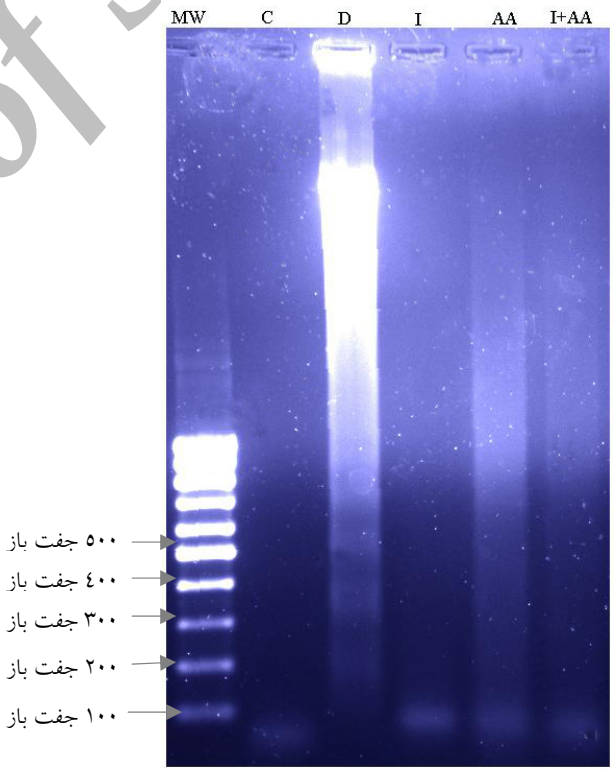
#: p<۰ /۰۰۱

*: p<۰/۰۱

Archive of SID
www.SID.ir

DNA Laddering

یکی از روش‌های تشخیص آپوپتوز، الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول‌ها یا بافت مورد مطالعه است. همان‌طور که شکل (۲) نشان داده است، دیابت سبب بروز نمای نردبانی (DNA Ladder) در DNA سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه D شده است. این الگو که در سلول‌های آپوپتوتیک مشاهده می‌شود، نشان‌دهنده این است که DNA سلول‌های مورد نظر به‌صورت اولیگونوکلئوزومال درآمده و به فرم نردبانی یا Ladder دیده می‌شوند. در حالی‌که بعد از دو هفته تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک به‌تنهایی و به‌طور همزمان، این نمای نردبانی در DNA سلول‌های ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه‌های I، AA و I+AA مشاهده نمی‌شود (شکل ۲).



شکل ۲. نمایش الکتروفورز DNA هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه کنترل (C)، گروه دیابتی (D)، گروه دیابتی تحت تیمار با انسولین (I)، گروه دیابتی تحت تیمار با اسید اسکوربیک (AA) و گروه دیابتی تحت تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک به‌طور همزمان (I+AA) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. (MW نشانگر وزن مولکولی است).

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با انسولین قادر است آپوپتوز ناشی از القای دیابت نوع ۱ را در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین، از طریق کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و جلوگیری از قطعه قطعه شدن DNA مهار نماید.

احتمالاً توانایی انسولین در کاهش بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bax یا افزایش بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و $Bcl\text{-}x_L$ می‌تواند ناشی از تأثیر غیرمستقیم آن از طریق کنترل گلوکز خون محیطی و کنترل دیابت یا ناشی از تأثیر مستقیم انسولین بر سلول‌های ناحیه هیپوکامپ باشد. این امر باعث بسته شدن منفذ غشای میتوکندری و مانع رها شدن سیتوکروم C، Apaf-1، AIF یا پروکاسپازها و تشکیل آپوپتوزم و فعال شدن عوامل فرودست به ژن‌های خانواده Bcl-2 می‌شود [۲۳و۲۴].

به‌علاوه انسولین ممکن است با جلوگیری از کاهش بیان Bcl-2 و $Bcl\text{-}x_L$ که به‌وسیله ایجاد دیابت نوع ۱ ناشی از استرپتوزوسین القا شده است، رها شدن سیتوکروم C و سایر فاکتورهای آپوپتوژنیک را مهار کند. بنابراین نسبت بیان Bcl-2/Bax و $Bcl\text{-}x_L$/Bax نیز به‌عنوان یک فاکتور تعیین کننده در مهار یا القای آپوپتوز و همچنین در زندگی یا مرگ سلول می‌تواند بسیار مهم باشد.

در همین راستا مطالعه‌ای که توسط سرینیواسان (Srinivasan) و همکاران روی نورون‌های گانگلیون ریشه خلفی نخاع در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین انجام شد، نشان داد که تیمار موش‌های صحرایی توسط انسولین به مدت دو هفته به‌منظور کنترل قند خون به‌طور معناداری از تعداد سلول‌های آپوپتوتیک این موش‌ها، نسبت به موش‌های دیابتی که درمانی دریافت نکردند، می‌کاهد. همچنین میزان بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [۲۵].

در مطالعه دیگری توسط سیما (Sima) و همکاران نیز مشخص شد که پپتید C، از مشتقات انسولین، در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ترانس ژنیک BB/W آثار مشابهی دارد؛ به این

Archive of SID
www.SID.ir

ترتیب که میزان بیان پروتئین القای کننده آپوپتوز Bax و میزان فعالیت کاسپاز-۳ در سلول‌های ناحیه هیپوکامپ در نتیجه تیمار با پپتید C کاهش می‌یابد. به‌علاوه نمای نردبانی نیز در DNA کروموزومی سلول‌های این ناحیه از بین می‌رود [۲۶و۲۷].

در این راستا کومار (Kumar) و همکاران نشان دادند که استفاده از انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان بیان پروتئین القا کننده آپوپتوز (Bax) را در سلول‌های لوله‌های کلیوی کاهش می‌دهد و همچنین میزان بیان پروتئین مهار کننده آپوپتوز ($Bcl\text{-}x_L$) را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد [۲۸].

در مجموع مطالعه روی مدل‌های حیوانی نشان داده است که اعمال انسولین روی بافت مغزی به دو طریق انجام می‌شود:

۱- انسولین مستقیماً با بافت مغزی میان‌کنش نشان می‌دهد؛ ۲- انسولین به‌طور غیرمستقیم از طریق کنترل گلوکز خون محیطی اثرش را اعمال می‌کند. بنابراین انسولین تمام اعمالش را ابتدا از طریق اتصال به گیرنده‌اش شروع و فعال شدن گیرنده اختصاصی‌اش که به‌وفور در سیستم عصبی مرکزی وجود دارد، موجب ادامه فرایند می‌شود [۲۹].

از آنجایی‌که ممکن است از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به‌وسیله مکانیسم‌های مولکولی متعددی نظیر نوروتروفین‌ها، سنتز فاکتور رشد، تعدیل بیان پروتئین‌های تنظیم کننده آپوپتوز جلوگیری شود (۳۰)، بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از انسولین از طریق مکانیسم های زیر از مرگ نورون‌ها جلوگیری می‌کند. ۱- انسولین با کنترل گلوکز خون محیطی و حفظ آن در حد طبیعی در کنترل دیابت نقش ایفا می‌کند. ۲- انسولین به‌عنوان یک فاکتور نوروتروفیک می‌تواند نورون‌ها را از مرگ محافظت کند و اطلاعات زیادی نشان می‌دهند که انسولین یک فاکتور نوروتروفیک است [۳۱]؛ به‌طوری‌که در یک سیستم کشت برش مخچه موش صحرایی ۹ روزه نشان داده شده است که استفاده از انسولین از مرگ سلول‌های گرانولر مخچه نیز جلوگیری می‌کند [۳۲]. به‌علاوه استفاده از انسولین در کشت سلول‌های قشر مغز، مرگ سلولی ناشی از فقدان سرم را نیز کاهش می‌دهد [۳۳]. ۳- از طرف دیگر مشخص شده انسولین، پروانسولین، پپتید C و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF) اثر ضد آپوپتوزی دارند [۳۴و۳۵].

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که انسولین از آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی یا رده‌های سلولی کارسینومایی جلوگیری می‌کند [۱۸-۱۶]. بنابراین به‌نظر می‌رسد که انسولین اثر محافظت نورونی و ضدآپوپتوزی غیرقابل انکاری دارد که مکانیسم‌ها و مسیرهای متنوعی در آن دخیل هستند که سرانجام منجر به افزایش بقای سلولی می‌شود. اثر ضد آپوپتوزی انسولین که در مطالعه حاضر به آن اشاره شد، ممکن است به اثر مستقیم انسولین روی سلول‌های ناحیه هیپوکامپ از طریق کاهش بیان پروتئین Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl-2 و $Bcl\text{-}x_L$، مهار رها شدن سیتوکروم C، کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و مهار CADNase و در نتیجه مهار قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی مورد مطالعه باشد که در مجموع باعث کاهش تنظیمی فرایند آپوپتوز و بقای نورون‌ها می‌شود.

همچنین نتایج پژوهش حاضر و مطالعه قبلی این محققین [۲۳] نشان داد که اسید اسکوربیک نیز مانند انسولین از طریق کاهش بیان ژن Bax، افزایش بیان ژن‌های Bcl-2 و $Bcl\text{-}x_L$، کاهش فعالیت کاسپازها و جلوگیری از قطعه قطعه شدن DNA، در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین، قادر به مهار آپوپتوز است.

به هر حال نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های پژوهش‌های قبلی که بیان می‌دارند اسید اسکوربیک بیان ژن $Bcl\text{-}x_L$ را در سلول‌های سرطانی کولون انسانی از طریق تثبیت غشای میتوکندری افزایش می‌دهد [۳۶]، تطابق دارد. همسو با این نتایج، اثر اسید اسکوربیک بر عملکرد Bcl-2، در سلول‌های اندوتلیال انسانی نیز مشاهده شده است [۳۶]. مشاهده شده که اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان دارای آثار محافظتی در اختلالات تجربی نورولوژیکی مانند سکته مغزی، ایسکمی وتشنجات صرعی است [۳۸و۳۹]. در مطالعه‌ای ائون جین (Eun Jin) و همکاران نشان دادند که اسید

Archive of SID
www.SID.ir

اسکوربیک دارای آثار محافظت نورونی است و از مرگ نورونی ناشی از اسید کینیک (Kainic Acid) در هیپوکامپ توسط مهار عملکرد بد میتوکندری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) جلوگیری می‌کند [۳۹].

تال (Tal) و همکاران در بررسی نقش اسید اسکوربیک در مهار آپوپتوز در سلول‌های ردهٔ HL-60 (سلول‌های لوسمی انسانی)، نشان دادند که اسید اسکوربیک قادر است آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن را در این سلول‌ها از طریق ممانعت از رها شدن سیتوکروم C و کاهش فعالیت کاسپاز-۳ مهار کند [۴۰].

به‌علاوه معتقدند که اسید اسکوربیک یک آنتی اکسیدان قوی است که می‌تواند ROS و گونه های نیتروژن فعال (Reactive Nitrogen Species ;RNS) را به دام بیندازد. همچنین اسید اسکوربیک داخل سلولی می‌تواند از مرگ سلولی جلوگیری کند و موتاسیون ایجاد شده توسط استرس اکسیداتیو را مهار کند [۴۱]. نقش اسید اسکوربیک به‌عنوان یک آنتی اکسیدان داخل سلولی به‌خوبی ثابت شده است و اسید اسکوربیک می‌تواند مرگ سلولی ناشی از هیدروژن پراکسید، آپوپتوز ناشی از اتصال Fas به Fas Ligand و آسیب DNA ناشی از استرس اکسیداتیو را مهار کند [۲۰و۴۲].

غلظت اسید اسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، در مغز نسبت به سایر ارگان‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است. همچنین در داخل مغز نیز توزیع آن یکنواخت نیست و بیشترین مقدار اسید اسکوربیک در آمیگدالا، هیپوکامپ و هیپوتالاموس است [۴۳و۴۴].

غلظت بالای داخل سلولی اسید اسکوربیک در نورون‌ها نشان دهنده نقش مهم آن در فیزیولوژی طبیعی نورون‌ها و به‌عنوان یک آنتی اکسیدان نوروپروتکتیو و نورومدولاتور است (۴۲و ۴۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک و اسید دِهیدرواسکوربیک برای بازیافتِ ویتامین C به داخل نورون‌ها و آستروسیت‌ها منتقل می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد بازیافت مداوم ویتامین C به‌طور واضح و روشن، انواع مختلف نورون‌ها را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند [۴۶ و۴۷].

به‌علاوه مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک ممکن است با مهار تولید گونه‌های اکسیژن فعال ROS ناشی از دیابت که سبب مرگ نورون‌ها و سلول‌های نوروگلی می‌شود، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. محققان معتقدند که اسید اسکوربیک عملکردهای حیاتی در مغز دارد و به‌عنوان یک کوفاکتور برای دوپامین β-هیدروکسیلاز عمل می‌کند و در بیوسنتز کاتکولامین دخالت می‌کند. اسید اسکوربیک همچنین پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا را مهار می‌کند و رادیکال‌های آزاد مغز را به دام می‌اندازد [۴۸و۴۹].

نتایج این تحقیق به اثر انسولین و اسید اسکوربیک در کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و مهار قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی مورد آزمایش دلالت دارد. در این زمینه ادامه تحقیقات با استفاده از سایر روش‌های تشخیص آپوپتوز و نیز تلفیق این روش‌ها با روش‌های تشخیص نوروژنزیس نه تنها در موش‌های صحرایی بلکه در سایر گونه‌های جانوری توصیه می‌شود. برای تعمیم نتایج این تحقیق به انسان، پس از اتمام مرحله تجربی، انجام کارآزمایی بالینی ضروری است.

نتایج این تحقیق به اثر انسولین و اسید اسکوربیک در کاهش فعالیت کاسپاز- ۳ و مهار قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین در نمونه‌های مورد مطالعه دلالت دارد. آثار ضد آپوپتوزی انسولین و اسید اسکوربیک روی سلول‌های هیپوکامپ افراد دیابتی و به‌عبارت دیگر مهار آپوپتوز به‌وسیله کنترل قند خون توسط انسولین و درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها، احتمالاً می‌تواند نقص در یادگیری و حافظه ناشی از تخریب هیپوکامپ را در دیابت نوع ۱ کاهش دهد، اگر چه مطالعات آزمایشگاهی و کارآزمایی بالینی بیشتری برای اثبات این فرضیه لازم است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این طرح تحقیقاتی را برعهده داشته‌اند و همچنین همکاران بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، مخصوصاً سرکار خانم مقدم سپاسگزاری می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. **Sreemantula S, Kilari EK, Vardhan VA, Jaladi R.** Influence of antioxidant (L- ascorbic acid) on tolbutamide induced hypoglycemia/antihyperglecemia in normal and diabetic rats. BMC Endocr Disord 2005; 5:2.
2. **Harris RA.** International review of neurobiology: Glucose metabolism in the brain (Glucose, Stress, and Hippocampal Neuronal Vulnerability). New York. Elsevier Science 2002.
3. **Wild Sh, Roglic G, Sicree R, Green A, King H.** Global Burden Diabetes Mellitus in the year 2000. Availble from http//www. who. int/ whosis /menu.cmf ?path=evidence, burden, Burden-Gbd 2000 doc & language = English. 2002.
4. **Mastrocola R, Restivo F, Vercellinatto I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, et al.** Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. J Endocrinol 2005; 187: 37-44.
5. **Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH.** Ageing and diabetes: implications for brain function. Eur J Pharmacol 2002; 441: 1-14.
6. **Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al**. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. Nature 2000; 404: 787-90.
7. **Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH.** Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin. Brain Res 1998; 800: 125-35.
8. **Li ZG, Sima AAF.** C-peptide and central nervous system complications in diabetes. Exp Diabetes Res 2004; 5: 79-90.
9. **Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF.** Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. Brain Res 2002; 946:221-31.
10. **Martinez-Tellez R, Gomez-Villalobos MJ, Flores G.** Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. Brain Res 2005; 1048:108-15.
11. **Reagan LP, Magariños AM, McEwen BS.** Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. Ann N Y Acad Sci 1999; 893: 126-37.
12. **Reagan LP**. Insulin signaling effects on memory and mood. Curr Opin Pharmacol 2007; 7:633-7.
13. **Sima AAF, Nathaniel V, Bril V, McEwen T, Green DA.** Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of Axo-glial disjunction in human diabetic neuropathy. J Clin Invest 1988; 81:349-64.
14. **Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I.** Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. Free Radic Biol Med 2006; 41: 979-84.
15. **Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH.** Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin. Brain Res 1998 ; 800: 125-35.
16. **Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, et al.** Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. Cell 1992; 70: 31-46.
17. **Merlo GR, Basolo F, Fiore L, Duboc L, Hynes NE.** P53-Dependent and p53- independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. J Cell Biol 1995; 128: 1185-96.
18. **Brownlee M, Brownlee A, Cerami H, Vlassara.** Advanced glycosylation end products in tissue and

Archive of SID

www.SID.ir

the biochemical basis of diabetic complications. New Engl J Med 1988; 318: 1315–21.

19. **Greene DA, Stevens MG, Obrosova I, Feldman EL.** Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. Eur J Pharmacol 1999; 375: 217–223.
20. **Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, et al.** Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. Diabetes 2002 ; 51: 1118-24.
21. **Ozkaya YG, Agar A, Hacioglu G, Yargiçoglu P.** Exercise improves visual deficits tested by visual evoked potentials in streptozotocin-induced diabetic rats. Tohoku J Exp Med 2007; 213: 313-21.
22. **Ozkan Y, Yilmaz O, Oztürk AI, Erşan Y.** Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and alpha-lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. Cell Biol Int 2005; 29: 754-60.
23. **Jafari AI, Sankian M, Ahmadpour S, Haghir H, Bonakdaran S, Varasteh A.** The study of effects of insulin and ascorbic acid on Bcl-2 family gene expression in hippocampus of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. J Zanjan Univ Med Sci 2007; 60: 1–16 .Persian
24. **Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA.** Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. J Biol Chem 2001; 276: 32814-21.
25. **Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW.** Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. Diabetes 2000; 49: 1932-8.
26. **Li ZG, Zhang W, Sima AAF.** C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. Int J Exp Diabetes Res 2002; 3: 241-5.
27. **Sima AA, Li ZG.** The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. Diabetes 2005; 54: 1497-505.
28. **Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD.** Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. Nephron Exp Nephrol 2004; 96: 77-88.
29. **Hui L, Pei DS, Zhang QG, Guan QH, Zhang GY.** The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation. Brain Res 2005; 1052: 1-9.
30. **Kajta M.** Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. Pol J Pharmacol 2004; 56: 689-700.
31. **Van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP.** Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. Prog Neurobiol 2006; 79: 205-21.
32. **Tanaka M, Sawada M, Yoshida S, Hanaoka F, Marunouchi T.** Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. Neurosci Lett 1995; 199:37-40.
33. **Ryu BR, Ko HW, Jou I, Noh JS, Gwag BJ.** Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. J Neurobiol 1999; 39: 536-46.
34. **Bertrand F, Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Prunier C, Robin H, Capeau J, at al.** Insulin antiapoptotic signaling involves insulin activation of the nuclear factor kappaB-dependent survival genes encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and manganese-superoxide dismutase. J Biol Chem 1999; 274: 30596-602.
35. **Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW.** Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes.

Archive of SID

www.SID.ir

Early onset and effect of insulin. J Clin Invest 1998; 102: 783-91.

36. **Wenzel U, Nickel A, Kuntz S, Daniel H.** Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. Carcinogenesis 2004; 25: 703-12.
37. **Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S.** Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. Eur J Pharmacol 1996; 317: 407-11.
38. **Xavier SM, Barbosa CO, Barros DO, Silva RF, Oliveira AA, Freitas RM.** Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. Neurosci Lett 2007; 420: 76-9.
39. **Kim EJ, Won R, Sohn JH, Chung MA, Nam TS, Lee HJ, et al.** Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. Biochem Biophys Res Commun 2008; 366: 8-14.
40. **Gruss-Fischer T, Fabian I.** Protection by ascorbic acid from denaturation and release of cytochrome c, alteration of mitochondrial membrane potential and activation of multiple caspases induced by H(2)O(2), in human leukemia cells. Biochem Pharmacol 2002; 63: 1325-35.
41. **Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW.** Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. J Biol Chem 2002; 277: 16895-9.
42. **Low PA, Nickander KK, Tritschler HL.** The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. Diabetes 1997; 46: 38-42.
43. **Rice ME.** Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. Trends Neurosci 2000; 23: 209-16.
44. **MacGregor DG, Higgins MJ, Jones PA, Maxwell WL, Watson MW, Graham DI, et al.** Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. Brain Res 1996; 727: 133-44.
45. **Grunewald RA.** Ascorbic acid in the brain. Brain Res Rev 1993; 18: 123-33.
46. **Kim EJ, Won R, Sohn JH, Chung MA, Nam TS, Lee HJ, et al.** Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. Biochem Biophys Res Commun 2008; 366:8-14.
47. **Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC, et al.** Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. J Clin Invest 1997; 100: 2842-8.
48. **Cameron NE, Cotter MA.** Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. Diabetes Res Clin Pract 1999; 45:137-46.
49. **Hosoya K, Minamizono A, Katayama K, Terasaki T, Tomi M.** Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood-retinal barrier. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45: 1232-9.

Archive of SID

www.SID.ir