زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۲۲۰- ۲۰۷

مقاله پژوهشی

اثر درمانی متفورمین بر مرگ سلولی نکروتیک سلول‌های هیپوکمپ و بهبود اختلال حافظه فضایی در موش صحرایی نر مدل سندرم جنین الکلی

مریم سبزعلی[۱]، اکرم عیدی[۱]، مهدی خاکساری[۲*]، حسین خواستار[۲]

۱- گروه زیست شناسی ، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

*مسئول مکاتبات: Khaksari417@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1933390.1264

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲

چکیده

مواجهه با الکل در دوران جنینی سبب طیف گسترده‌ای از آثار فیزیولوژیکی و رفتاری طولانی مدت می‌شود که در مجموع اختلال سندرم جنین الکلی (FASD) نامیده می‌شود.اختلالات عصبی ناشی از سوء مصرف الکل در کودکان با آپوپتوز در چندین منطقه از مغز مانند هیپوکامپ که به دنبال فعال شدن آبشار اکسیداتیو- التهابی و سطح بالای دژنراسیون عصبی رخ می‌دهد مرتبط است. مطالعات نشان دادند که متفورمین (۱،۱- دی‌متیل هیدروکلراید) که به عنوان داروی خط اول برای درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌شود می‌تواند به سرعت از سد خونی مغزی عبور کرده و آثار نوروپروتکتیو آن در چندین بیماری سیستم عصبی مورد تأیید قرار گرفته است. این پژوهش با هدف ارزیابی فعالیت‌های محافظتی متفورمین بر روی اختلالات حافظه و نکروز سلول‌های عصبی در هیپوکامپ موش صحرایی با قرار گرفتن در معرض الکل پس از تولد انجام شد.نوزادان نر موش صحرایی ۵.۲۷ گرم در کیلوگرم اتانول محلول در ۸.۲۷ میلی‌لیتر بر کیلوگرم شیر خشک را از طریق گاواژ در روزهای ۱۰-۲ بعد از تولد دریافت کردند .نوزادان همچنین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین را در روزهای ۱۰-۲ بعد از تولد دریافت کردند. برای بررسی حافظه فضایی ، آزمایش ماز آبی موریس ۳۶ روز پس از تولد انجام شد. پس از آزمون رفتاری ، رنگ‌آمیزی نیسل برای ارزیابی سلولهای دچار نکروز انجام شد. نتایج بیانگر این است که درمان با متفورمین می‌تواند به طور قابل توجهی اختلال در حافظه مکانی را بهبود بخشد ($p < ۰/۰۱$) و همچنین کاهش معنی‌دار نورون‌های دچار نکروز در گروه درمان با متفورمین در مقایسه با گروه اتانول شد ($p < ۰/۰۱$). بر اساس یافته‌ها، متفورمین سبب بهبود اختلال در حافظه فضایی در نوزادان موش قرار گرفته در معرض اتانول می‌شود و از مرگ نکروتیک نورون‌های هیپوکمپ به طور قابل توجهی جلوگیری می‌نماید.

کلمات کلیدی: متفورمین؛ اتانول؛ حافظه مکانی؛ نکروز، هیپوکمپ.

مقدمه

تخریب عصبی نتیجه‌ای مخرب برای بسیاری از بیماری‌ها و آسیب‌های عصبی است که می‌تواند منجر به کاهش عملکرد فیزیولوژیکی، کاهش ظرفیت ذهنی یا حتی مرگ شود. در تمام بیماری‌ها و آسیب‌هایی که منجر به تخریب عصبی می‌شوند ، عوامل علیت ثابت مانند عدم تنظیم التهاب، استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها و عدم تعادل انرژی وجود دارد (۲۵). الکل ، به عنوان یک ماده تراتوژنیک، می‌تواند به رشد مغز در طول بارداری آسیب رسانیده و باعث ناهنجاری‌های ساختاری شود و عملکرد مغز را در سطح عصبی- بیوشیمیایی با پیامدهای مختلف تحت تأثیر قرار دهد (٦). بنابراین مواجهه با الکل پیامدهای ساختاری و عملکردی برای سیستم عصبی مرکزی (CNS) به دنبال خواهد داشت (۳۳). قرار گرفتن در معرض اتانول در طول رشد می‌تواند منجر به انواع ناهنجاری‌های رشدی گردد و اختلالات فیزیولوژیکی و رفتاری طولانی مدت ایجاد نماید. این ناهنجاری‌ها شامل طیف گسترده‌ای از نقایص تکوینی، آناتومیکی، شناختی و رفتاری می‌شوند که مجموع آنها سندروم جنین الکلی(FASD) نامیده می‌شود (١٤). آمارهای جهانی نشان می‌دهد که این سندرم ۵-۱ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده است(۱۹) و به عنوان یک نگرانی مهم بهداشت عمومی شناخته شده است (٢٦). مواجهه با اتانول در دوران بارداری می‌تواند باعث تولد نوزاد مرده ، سقط جنین ، نقص مادرزادی و در مجموع سندرم جنین الکلی گردد. به طور کلی طیف تظاهرات این سندروم شامل سندرم جنین الکلی(FAS)، FAS جزئی و نقایص نورولوژیکی مرتبط با الکل (ARND) می‌گردد(۲۲). پژوهش ها حاکی از این است که آثار اتانول در مغز در حال تکوین جنین شامل کاهش فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها، ایجاد استرس اکسیداتیو به‌واسطه کاهش آنتی اکسیدان‌ها و افزایش رادیکال‌های آزاد، افزایش سلول‌های گلیال و ایجاد آستروگلیوزیس می‌باشد که خود مسبب مرگ سلولی نکروتیک و آپوپتیک وسیع در هیپوکمپ می‌گردد (۲۱). هیپوکمپ بخشی از قشر پره فرونتال در مغز پستانداران است که یکی از ساختارهای اصلی در یادگیری فضائی و تثبیت حافظه محسوب می‌شود و دارای عملکردهای متعدد حیاتی در فرایند حافظه شامل ذخیره سازی، تثبیت و بازیابی اطلاعات است (۲۳). مجموع این عوامل که هر کدام مکانیسم مربوط به خود را دارند، سبب تخریب نورونی و نقص در ایجاد پلاستیسیته طبیعی در مغز شده که به نوبه خود کاهش یادگیری، تخریب انواع حافظه و همچنین نقص در سایر جنبه‌های شناخت را در پی خواهد داشت (۲۰). بر خلاف آپوپتوز ، نکروز نوعی مرگ غیر قابل کنترل سلولی است که در اثر آسیب خارجی مانند هیپوکسی یا التهاب ایجاد می‌شود(۷). این فرآیند اغلب شامل تنظیم مجدد انواع مختلف التهابات از قبیل پروتئین ها و ترکیباتی مانند NF-κB که منجر به پارگی غشای سلول شده و با تخلیه محتوای سلول در مناطق اطراف منجر به آبشار التهاب و آسیب بافتی می‌شود(۵). مدل های حیوانی متفاوتی برای ارزیابی تأثیر مواجهه با الکل در مراحل مختلف رشد و در دوزهای مختلف بررسی شده است (۱۱). از آنجائیکه دو هفته اول زندگی پس از زایمان در موش صحرایی که جهش رشد مغز اتفاق می‌افتد معادل سه ماهه سوم بارداری در انسان می‌باشد (١٦). در این مطالعه از مدل تجویز

اتانول به عنوان جایگزین شیر به موش‌های نوزاد در طی روز دوم تا دهم پس از تولد از طریق گاواژ (بصورت خوراکی) به عنوان شبیه سازی مطالعه تأثیر قرار گرفتن در معرض الکل در اواخر بارداری در انسان استفاده نمودیم تا کنترل دقیق دوز اتانول تجویز شده به موش‌های نوزاد امکان پذیر باشد.یکی از استراتژی های مهم در درمان این گونه بیماری های پاتولوژیک در جهان، استفاده از داروهای سنتی با منشأ طبیعی و شناسایی آثار بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی آنهاست. زیرا استفاده طولانی مدت از داروی صناعی در چنین مواردی منجر به عوارض جانبی غیر قابل پیش بینی می‌شود (۲٤). متفورمین (۱،۱- دی‌متیل هیدروکلراید) در حال حاضر به عنوان داروی خط اول برای درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌شود و همچنین مطالعات قبلی نشان داد که متفورمین می‌تواند به سرعت از سد خونی مغزی عبور کرده (۲۹) و آثار نوروپروتکتیو آن در چندین بیماری سیستم عصبی تأیید شده است (۱) و اثر محافظت کنندگی نورونی خود را بواسطه تعدیل فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اعمال می‌نماید(۳۲). با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی متفورمین و اهمیت التهاب عصبی در ایجاد FASD ، این مطالعه بررسی اثر درمانی متفورمین بر مرگ سلولی نکروتیک سلولهای هیپوکمپ و بهبود اختلال حافظه فضایی برای اولین بار در مدل حیوانی FASD انجام شد.

مواد و روش‌ها

شصت نوزاد رت ویستار با وزن حدودی (۱۰-۸ گرم) پس از تولد به طور تصادفی به پنج گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند: گروه ۱: کنترل گروه ۲: محلول شیر + نرمال سالین گروه ۳: محلول شیر + اتانول. گروه های ٤ و ٥: محلول شیر + اتانول + متفورمین (۲۰ و ٤۰ میلی گرم در کیلوگرم). نوزادان موش از روز ۱۰-۲ پس از تولد، تحت تیمار قرار گرفتند. حیوانات یک بار در روز توزین می‌شدند و برای رسیدن به حداکثر سطح سرمی الکل (۳۰۰ تا ٤۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) ، ۵.۲۷گرم بر کیلوگرم اتانول) در محلول شیر (۲۷.۸ میلی لیتر در کیلوگرم) روزانه بصورت گاواژ دریافت کردند. میزان اتانول (۵.۲۵ گرم در کیلوگرم) روزانه با فاصله زمانی دو ساعت (۲.٦۲ گرم در کیلوگرم) دریافت شد. برای جبران کاهش وزن ناشی از کاهش مصرف شیر مادر ، در افرادی که اتانول دریافت کردند ، گاواژ سوم محلول شیر (بدون اتانول) ، دو ساعت بعد از دوز دوم الکل دریافت شد. سالین و متفورمین (۲۰ و ٤۰ میلی گرم در کیلوگرم) هم بصورت روزانه بعد از هر بار گاواژ محلول شیرو اتانول به صورت زیر جلدی (SC) تزریق شد.در روز ۳٦ پس از تولد تا روز٤۰، از دستگاه ماز آبی موریس به منظور بررسی حافظه فضایی حیوانات استفاده گردید. ماز آبی یک تانک مشکی رنگ استوانه‌ای شکل به قطر ۱۵۲ سانتیمتر و ارتفاع ٦۰ سانتیمتر است. دستگاه توسط دو خط فرضی عمود بر هم، به چهار بخش مساوی تقسیم می‌شود. محفظه ماز جهت شروع آزمون تا ارتفاع ۳۲ سانتی‌متری با آب ۲۲ درجه سانتیگراد پر می‌شود. سپس سکوی ساخته شده از جنس پلکسی گلس شفاف به قطر ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر در یکی از چهار بخش ماز به شکلی که دو سانتی‌متر آب روی آن را گرفته و از بیرون برای حیوان قابل مشاهده نباشد قرار داده می‌شود. جایگاه سکو در طول آزمون برای تمامی

گروهها یکسان می‌باشد. یک دوربین حساس به حرکت بالای ماز نصب شده که داده‌ها را به کامپیوتری که دارای نرم افزار پردازش و ذخیره اطلاعات است ارسال می‌کند. مسیر شنای حیوان توسط مسیریاب در سیستم ثبت می‌شود. حداکثر زمانی که حیوان فرصت پیدا کردن سکو را دارد ٦٠ ثانیه بود. در صورتی که موش نمی‌توانست در طی این مدت سکوی پنهان را بیابد، توسط یک میله چوبی به سمت سکو هدایت می‌شد و به مدت ۱۵ ثانیه روی آن قرار می‌گرفت. در طول این مدت به موش فرصت داده می‌شد با توجه به جایگاه سکو و علایمی که به عنوان سرنخ در دیوارهای آزمایشگاه نصب شده بودند از نظر فضایی موقعیت خود را به خاطر بسپارد. مرحله آموزش و یادگیری در چهار روز پیاپی انجام و روند یادگیری حیوان براساس مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده جهت یافتن سکو سنجیده می‌شد. روز پنجم، آخرین آزمون به منظور ارزیابی سنجش میزان بخاطرآوری وحافظه فضایی انجام شد؛ بدین صورت که پس از خارج کردن سکو، موش‌ها به طور یکسان از یک منطقه ماز به درون آن رها شدند. این آزمایش بر این اساس است که با فرض اینکه حیوان محل سکوی پنهان را در طی چهار روز یادگیری به خاطر سپرده است لذا بایستی بیشترین زمان و مسافت را در ناحیه محل قرارگیری سکو شنا کند. این مرحله برای هر حیوان به مدت ٦٠ ثانیه و تنها یک بار انجام شد. مدت زمان و مسافت پیموده شده بواسطه شنای حیوان در منطقه قرارگیری سکو معیار ارزیابی حافظه فضایی حیوانات قرار گرفت. اطلاعات به دست آمده ازحیوانات گروه‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از روش های آماری و نرم افزارهای مرتبط مقایسه شد.جهت ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس از تکنیک رنگ آمیزی کریزل ویوله (نیسل) استفاده شد . رنگ آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود .در این تحقیق از سلول-های ناحیه هیپوکمپ CA1 برداشت شد .بعد از انجام پرفیوژن از نمونه‌های فیکس شده قالب پارافینه تهیه شد و پس از قالب‌گیری با پارافین، با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاط کرونال با ضخامت ۷ میکرون تهیه و سپس برش‌ها برروی لام‌های سیلاته قرار داده شدند.بعد از شفاف سازی و آب‌دهی، لامها با استفاده از کریزل ویوله یک درصد رنگ شدند و در نهایت مقاطع به وسیله چسب انتالن و لامل پوشانده شدند .لام‌های رنگ شده به روش نیسل توسط میکروسکوپ ,OLYMPUS AX70 با بزرگنمایی x400 بررسی و بعد از تهیه عکس توسط نرم افزار olysia bio report شمارش سلولی انجام شد. سلول‌های دچار مرگ سلولی نکروتیک با ظاهری نامنظم و رنگی تیره و همچنین فاقد هسته و هستک مشخص بودند که شمارش شدند(۳۰).

نتایج

در ماز آبی موریس نحوه حرکت هر یک از موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل، سندرم جنین الکلی و تیمار شده با متفورمین توسط دوربین فیلمبرداری ردیابی و توسط نرم‌افزار کامپیوتری رسم شد. یادگیری بصورت کاهش زمان طی شده تا یافتن سکوی پنهان شده در طی ٤ روز ابتدایی آزمون در ماز آبی موریس در نظر گرفته شد. به طور کلی تمامی حیوانات در مرحله یادگیری مدت زمان کمتری جهت یافتن سکوی پنهان سپری کردند.

نمودار ۱ نشان می دهد که تفاوت معنی‌داری بین گروه ها از نظر مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در طی روزهای آموزش (٤ روز ابتدایی) وجود دارد. گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل یادگیری کمتری داشتند ($p < ۰/۰۱$). ضمن اینکه کاهش معنی داری در مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در حیوانات گروه درمان با متفورمین ۲۰ و ٤۰ میلی گرم نسبت به گروه اتانول مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$). این موضوع نشان‌دهنده بهبود یادگیری فضایی با تجویز متفورمین در موش‌های مبتلا به سندروم جنین الکلی بود. اثرات متفورمین بر نقص‌حافظه فضایی ناشی از اتانول بعد از مراحل یادگیری در ماز آبی موریس بـه منظور سنجش به خاطرآوری حافظه در حیوانات یک مرحله آزمایش با برداشتن سکوی پنهان درون ماز انجام می‌شود. در ایـن مرحله مدت زمان سپری شده (شنا) در ربع محل قرارگیری سکو مورد ارزیابی قرار گرفت. در روز آزمون پروب (روز پنجم) پارامتر مدت زمان حضور در ربع دایره هدف بین گروه‌های مورد آزمایش جهت سنجش حافظه فضایی مقایسه شد. شاخص دیگر سرعت شنا حیوانات بود که در این مرحله ارزیابی گردید (نمودار۲).

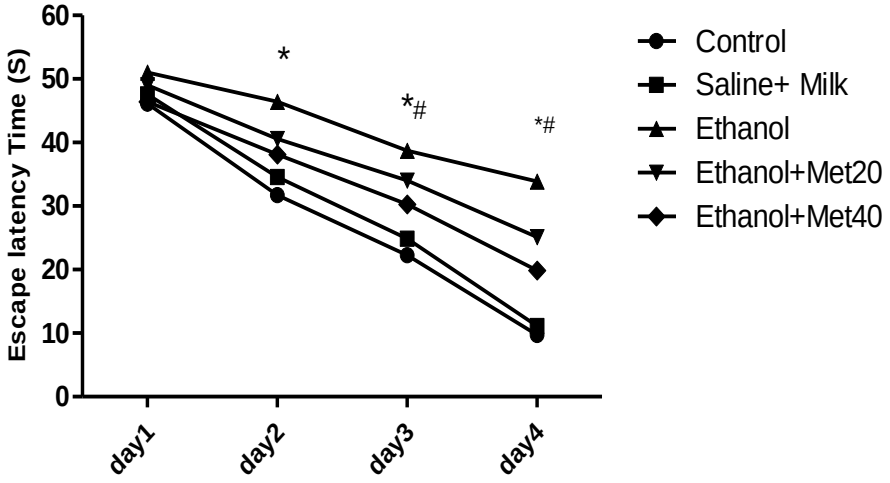
آنالیز داده‌ها بیانگر کاهش معنی‌دار مدت زمان شنای حیوانات گروه اتانول در ناحیه هدف نسبت به گروه کنترل بود. همچنین افزایش معنی‌داری در مدت زمان حضور حیوانات گروه درمان با متفورمین ۲۰ و ٤۰ میلی گرم ($p < ۰/۰۱$) در ناحیه مذکور نسبت به گروه اتانول مشاهده شد (نمودار ۳).

میزان متوسط سرعت شنا در بین گروه‌ها معنی‌دار نبود. این موضوع نشان دهنده عدم تاثیر سرعت بر روی کاهش مدت زمان سپری شده توسط حیوان بود. تصویر مسیر حرکت حیوان در تانک مدور ماز آبی که توسط نرم افزار ردیاب ثبت شده است (تصویر۱).

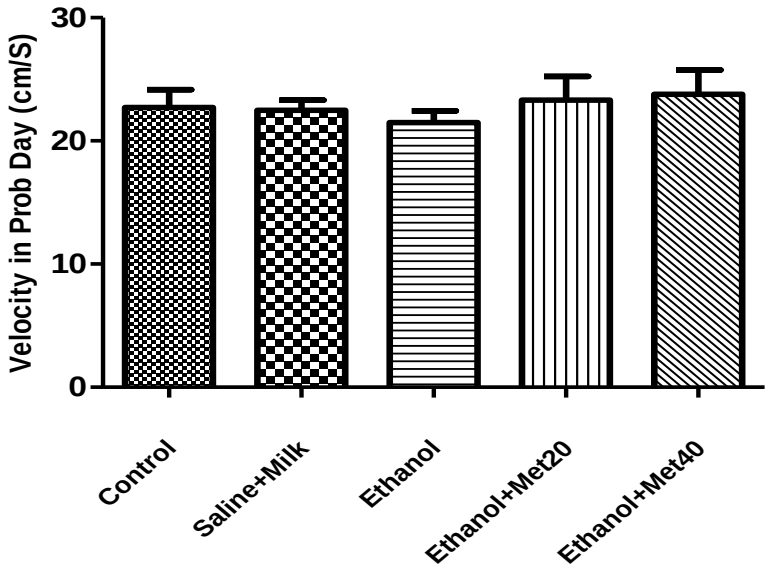
جهت بررسی اثرات اتانول بر مرگ نورونی نکروتیک در ناحیه هیپوکمپ و ارزیابی اثرات متفورمین در سطح بافت، از رنگ کرزیل ویوله برای رنگ‌آمیزی نیسل استفاده گردید. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های عصبی نکروتیک در ناحیه CA1 هیپوکمپ شمارش شدند. در گروه کنترل، نورون‌های هرمی شکل با هسته‌های گرد و کاملا مشخص به رنگ آبی، اجسام نیسل به رنگ آبی لاجوردی، هستک‌های برجسته و همچنین سیتوپلاسم واضح و بدون رنگ مشاهده می‌شود. درحالی که درهیپوکمپ موش‌های در معرض اتانول نورون‌های هرمی بصورت پراکنده ونامنظم که بسیاری از آنها هسته و هستک مشخص نداشتند قرارگرفته و بین آنها فاصله‌ی زیادی مشاهده گردید (شکل ۳). نتایج رنگ‌آمیزی نیسل افزایش معنی‌دار مرگ سلولی نکروتیک را در گروه اتانول نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < ۰/۰۰۱$).

از طرف دیگر، درصد نورون‌های دچار نکروز در گروه درمان با متفورمین در مقایسه با گروه اتانول کاهش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۱$) (نمودار ٤).

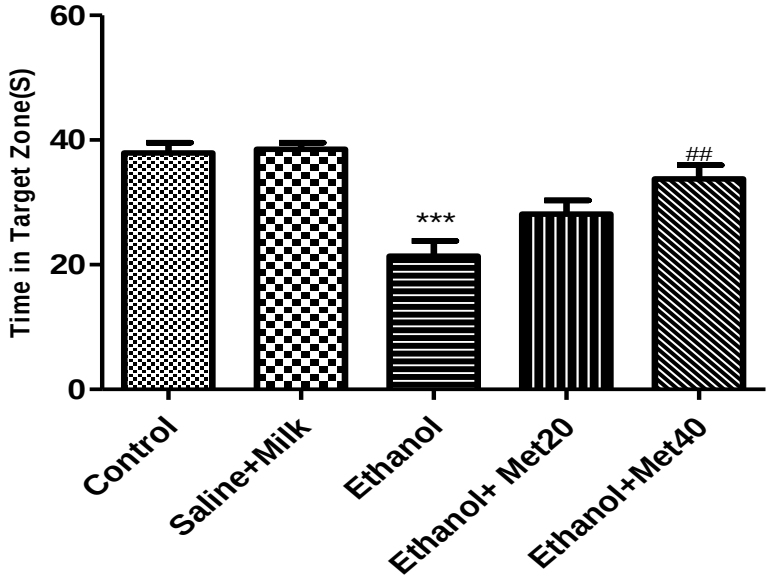
به طور خلاصه، نتایج این بخش حاکی از توان حفاظتی متفورمین در برابر نکروز القا شده بواسطه اتانول است.



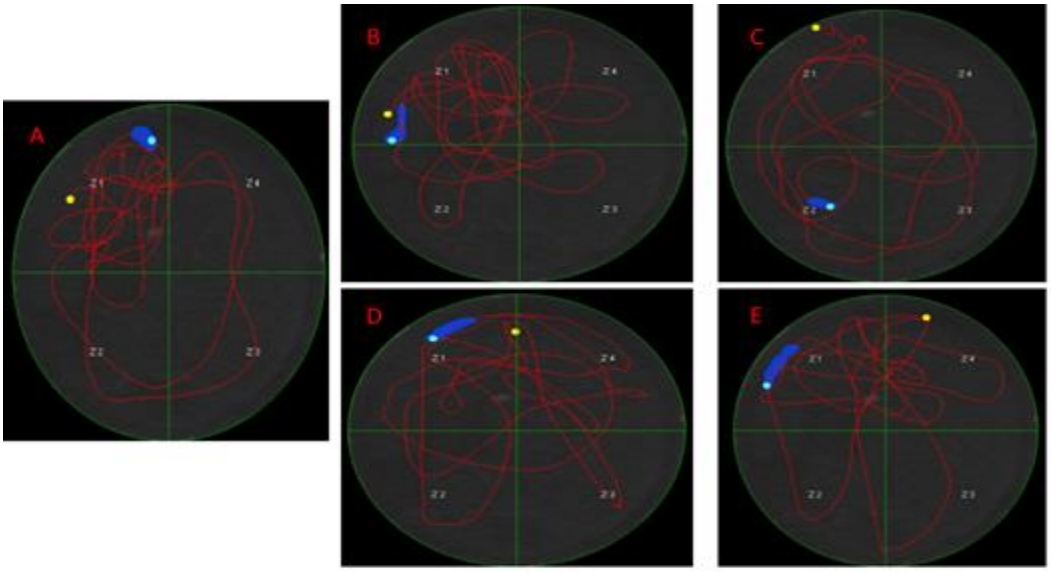
نمودار ۱- مدت زمان سپری شده درماز آبی موریس جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات گروه‌های آزمایشی در روزهای آموزش، اختلاف بین گروه‌های اتانول و کنترل، همچنین اختلاف بین گروه درمان شده با گروه اتانول معنی‌دار است.



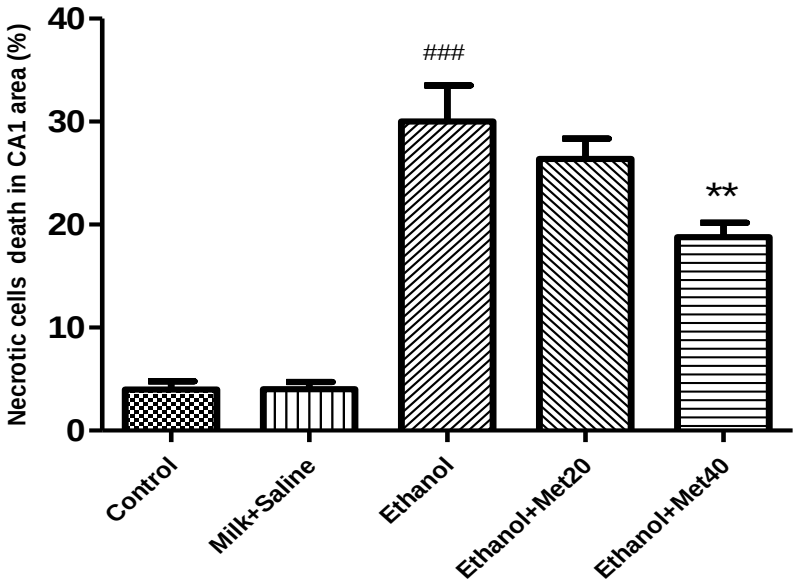
نمودار ۲- سرعت شنا در ربع محل قرارگیری سکو در روز آزمون پروب در گروه‌های آزمایشی



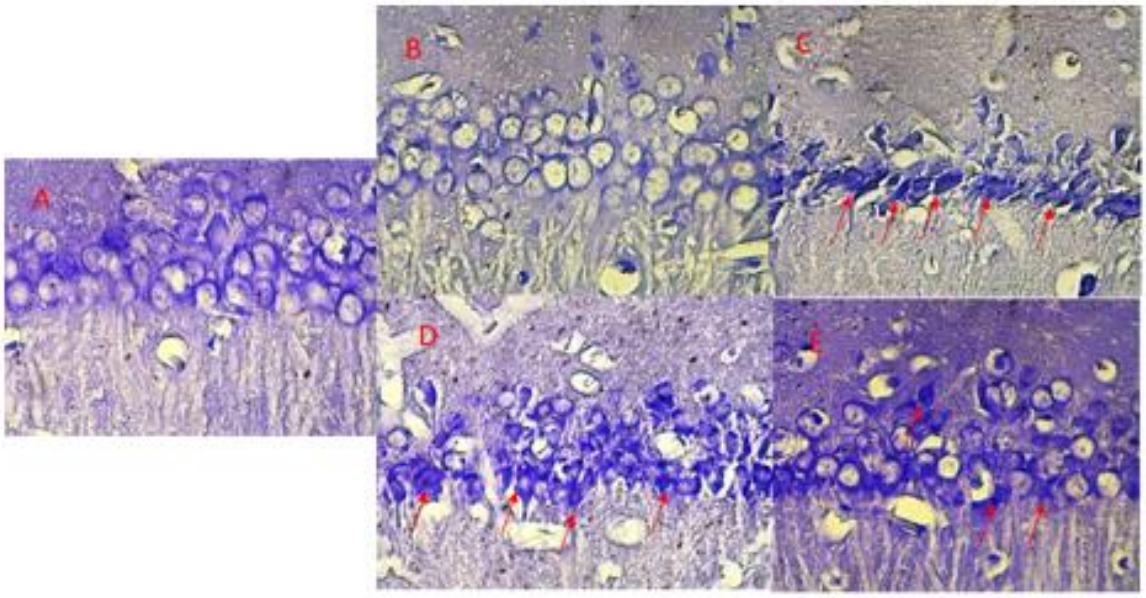
نمودار ۳- مدت زمان سپری شده (شنا) در ربع محل قرارگیری سکو در روز آزمون پروب



شکل ۱- تصویر دوربین ردیابی مسیر حرکت حیوان در تانک مدور ماز آبی که به چهار ناحیه فرضی تقسیم شده است. تصویر مربوط به آزمون پروب می‌باشد. محل قبلی سکو Zone1 بوده است. نقطه زرد رنگ محل شروع حرکت و نقطه آبی محل حیوان در پایان ٦٠ ثانیه شنا جهت یافتن سکو است.



نمودار٤- اثرات درمان با متفورمین بر مرگ سلولی نکروزیس ناشی از سمیت اتانول



شکل ۳- اثرات درمان با متفورمین بر مرگ سلولی نکروتیک ناشی از سمیت اتانول. شکل سمت راست فتومیکروگراف از مرگ سلولی نکروز در گروههای آزمایشی است. A.کنترل، B. شم، C.اتانول، D. اتانول+ متفورمین(۲۰میلی‌گرم) E. اتانول+ متفورمین (٤٠ میلی‌گرم)

بحث

به طورکلی دوران بارداری به سه دوره سه ماهه تقسیم می‌شود. دوره سه ماهه سوم زمانی است که برخی ساختارهای مغزی بیشترین رشد را در طول بارداری خواهند داشت. لذا دانشمندان علوم اعصاب این دوره از تکوین را به نام جهش رشد مغزی نامگذاری کرده اند. مصرف الکل در این دوره، موجب اختلال در سیناپتوژنز، پلاستیسیتی نورونی و مرگ گسترده سلول-های عصبی شده که در نهایت عواقب جبران ناپذیری را در بزرگسالی به دنبال خواهد داشت (۱۲). طیف اختلالات ناشی از اتانول در جنین بر اساس دوز، مدت زمان و الگوی مواجهه با الکل متفاوت است. جهت مطالعه اثرات دقیق اتانول روی مغز در حال تکوین مدل‌سازی این سندروم در حیوانات کوچک آزمایشگاهی و خصوصا جوندگان مانند موش صحرایی جهت شبیه سازی این سندرم در انسان بسیار مفید می-باشد، زیرا با کنترل فاکتورهایی نظیر زمان، دوز و میزان مواجهه، بررسی نقایص شناختی و عملکردی ناشی از مصرف اتانول با توجه به مرحله تکوینی بافت مغز امکان‌پذیر است. در جوندگان تکوین مغزی در روز ۱ تا ۱۰ بارداری معادل با سه ماهه ابتدایی در انسان، روز ۱۰ تا روز ۲۰ معادل با سه ماهه دوم و از روز تولد (که در جوندگان روز ۲۰تا ۲۳ ام بارداری اتفاق می‌افتد) تا دهمین روز پس از تولد مطابق با سه ماهه سوم بارداری در انسان می‌باشد. بنابراین ایجاد مدل FASD بوسیله در معرض قرار دادن موش با اتانول در روز یک تا ده و یا ده تا بیست بارداری و یا ده روز ابتدایی پس از تولد و یا حتی تلفیقی از این دوران امکان‌پذیر است (۱۵).

اما نکته قابل توجه این است که برای دادن الکل در دوران بارداری محدودیت‌هایی وجود دارد. در جوندگان آنزیم‌های متابولیزه کننده جفتی نسبت به جفت انسانی بسیار قوی‌تر عمل کرده و متابولیزه کردن اتانول بواسطه این آنزیم‌ها سبب کاهش غلظت خونی اتانول در جنین جوندگان نسبت به غلظت آن در پلاسمای موش مادر می‌گردد. از طرف دیگر تجویز اتانول برای موش باردار سبب ایجاد تغییرات منفی چشمگیری در رفتارهای مادرانه از قبیل سرکوب و کاهش مدت زمان و میزان شیردهی و همچنین کاهش کیفیت و کمیت تیمار نوزادان توسط موش‌های مادر اتانولی می‌شود که این موضوع به نوبه خود آثار منفی بر تکوین سیستم عصبی مرکزی نوزاد به دنبال خواهد داشت (۸، ۲۷). همانطور که قبلا اشاره گردید سه ماهه سوم بارداری (معادل ده روز ابتدایی پس از تولد در جوندگان) دوران جهش رشد مغزی است و در این دوره بسیاری از مناطق مغز از جمله آمیگدال، پری فرونتال کورتکس و به ویژه هیپوکمپ که درگیر در فرآیندهای یادگیری و حافظه هستند در مقایسه با کل دوران تکوین بیشترین رشد را دارند. لذا مطالعه اثرات اتانول بر روی رفتارهای مرتبط با هیپوکمپ بوسیله مدل‌سازی سندروم جنین الکلی در دوره سه ماهه سوم بسیار دقیق و معتبر است (۳، ۱۷). به همین دلیل این مدل برای پژوهش حاضر ایجاد و اثرات حفاظتی متفورمین در برابر سمیت القا شده توسط اتانول بر ساختار هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفت.متفورمین گسترده ترین داروی تجویز شده برای درمان دیابت نوع ۲ توسط سازمان بهداشت جهانی محسوب می-شود(۲) و درمان طولانی مدت با آن اثر محافظتی بر

بروز بیماری‌های سیستم عصبی و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو (ND)، از جمله آلزایمر ، هانتینگتون ، پارکینسون و زوال عقل می‌گردد (۲۸). متفورمین همچنین می‌تواند بواسطه جلوگیری از اختلال عملکرد میتوکندری در مغز ، کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش سطح فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از مغز، نقایص عصبی را بهبود بخشد (٤).

اختلال در عملکردهای هیپوکمپی مانند یادگیری و حافظه فضایی از عوارض شناخته شده اتانول است. از سالها پیش تاکنون برای سنجش حافظه فضایی در انسان، آزمون‌های استانداردی طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است. بر اساس نمره‌دهی این آزمونها مشخص شد که اتانول سبب اختلال شدید در حافظه فضایی می‌گردد (۱۰). اخیراً ، تعداد زیادی از مطالعات نشان داده است که متفورمین همچنین منجر به بهبود قابل توجهی در حافظه و شناخت در شرایط بالینی می-شود (۳٤). بسیاری از محققان بر این باورند که نقش بهبودبخش متفورمین بر نقص یادگیری و حافظه در مدل‌های دیابتی، بیماری‌های آلزایمر و پارکینسون مربوط به فعال شدن AMPK توسط متفورمین می-باشد (٤). در پژوهش حاضر از آزمون ماز آبی موریس معتبرترین دستگاه سنجش یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات آزمایشگاهی است استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون هم‌راستا با سایر پژوهش‌های انسانی و حیوانی، بیانگر آثار تخریبی اتانول بر یادگیری و حافظه فضایی می‌باشد (۱۰، ۳۱، ۱۸). مطالعه حاضر نشان داد که تجویز متفورمین توانست به طور قابل‌توجهی سبب بهبود نقص حافظه فضایی مرتبط با FASD شود که این اثر احتمالاً از طریق القای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، بکارگیری مکانیسم‌های کاهش مرگ سلولی و بقای نورونی، افزایش فاکتورهای رشد و همچنین با تعدیل واسطه‌های التهابی بوده است.

اتوفاژی، آپوپتوز و نکروز انواع مختلفی از مرگ عصبی هستند که در FASD نقش دارند (۱۳). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قرارگیری در معرض اتانول در دوره تکوین منجر به مرگ نکروتیک و آپوپتیک وسیع در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی دچار سندروم جنین الکلی می‌شود که این اثرات بواسطه تجویز متفورمین معکوس می‌گردد. در بسیاری از مطالعات، پیشگیری از مرگ سلول‌های عصبی توسط متفورمین گزارش شده است. در واقع، این موضوع به خوبی شناخته شده است که افزایش مرگ سلولی و کاهش نورونی خصوصا در ناحیه‌ای مانند هیپوکمپ که دخیل در حافظه، یادگیری و شناخت است می‌تواند سبب اختلال در این فرایندها گردد (۳۵). در همین راستا در پژوهشی تأثیر متفورمین بر زنده ماندن نورون به دنبال آسیب نخاعی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که تعداد سلولهای عصبی باقی مانده در حیوانات تحت درمان با متفورمین در مقایسه با حیوانات دچار آسب نخاعی بیشتر می‌باشد (۹). در مطالعه ای بر روی بافت قلب نیز گزارش شده است که کاهش سلولهای عصبی به دنبال مرگ سلولی در شرایط ایست ناگهانی قلبی احیای قلبی/ ریوی توسط متفورمین بطور قابل توجهی جبران شده است (۳٦) .لذا می‌توان گفت که متفورمین سبب توقف مرگ نورونی شده و به شکلی کارآمد نقص حافظه فضایی، اختلال شناختی ناشی از اتانول را بهبود می‌بخشد.

نتیجه گیری

متفورمین با جلوگیری از اختلال عملکرد هیپوکمپ سبب بهبود اختلال در حافظه فضایی در نوزادان موش قرار گرفته در معرض اتانول می‌شود و از مرگ نکروتیک نورون‌های هیپوکمپ به طور قابل توجهی جلوگیری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم پیراسته نوروزی کارشناس مسئول آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شاهرود و دیگر عزیزانی که ما را در این مطالعه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می-نمایم.

منابع

1. Ashabi G., Khalaj L., Khodagholi F., Goudarzvand M., Sarkaki A. 2015. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metabolic Brain Disease*, 30(3): 747-754.

2. Association A. 2020. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 43: S98-S110.

3. Bellinger F.P., Bedi K.S., Wilson P., Wilce P.A. 1999. Ethanol exposure during the third trimester equivalent results in long-lasting decreased synaptic efficacy but not plasticity in the CA1 region of the rat hippocampus. *Synapse*, 31(1):51-8.

4. Chen F., Dong R.R., Zhong K.L., Ghosh A., Tang S.S., Long Y. 2016. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-β across the blood–brain barrier and memory impairment in db/db mice. *Neuropharmacology*, 101: 123-136.

5. D'Arcy M.S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell biology international, 43(6): 582-592.

6. De Gruyter S. 2013. Teratogenität des Alkohols. Walter de Gruyter GmbH: Berlin, Germany.

7. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology,35(4):495-516.

8. Giglia R, Binns C. 2006. Alcohol and lactation: a systematic review. Nutrition & Dietetics,63(2):103-16.

9. Guo Y., Wang F., Li H., Liang H., Li Y., Gao Z. 2018. Metformin protects against spinal cord injury by regulating autophagy via the mTOR signaling pathway. *Neurochemical Research*, 43(5): 1111-1117.

10. Hamilton D.A., Kodituwakku P., Sutherland R.J., Savage D.D. 2003. Children with Fetal Alcohol Syndrome are impaired at place learning but not cued-navigation in a virtual Morris water task. *Behavioural Brain Research*, 143(1): 85-94.

11. Hamilton G., Hernandez I., Krebs C., Bucko P., Rhodes J. 2017. Neonatal alcohol exposure reduces number of parvalbumin-positive interneurons in the medial prefrontal cortex and impairs passive avoidance acquisition in mice deficits not rescued from exercise. *Neuroscience*, 352: 52-63.

12. Jacobson S.W., Hoyme H.E., Carter R.C., Dodge N.C., Molteno C.D., Meintjes E.M. 2020. Evolution of the Physical Phenotype of Fetal Alcohol Spectrum Disorders from Childhood through Adolescence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 45(2): 395-408.

13. Kaminen-Ahola N. 2021. Fetal alcohol spectrum disorders: Genetic and epigenetic mechanisms. *Prenatal Diagnosis*, 40(9): 1185-1192.

14. Kane C.J., Drew P.D. 2021. Neuroinflammatory contribution of microglia and astrocytes in fetal alcohol spectrum disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 99(8): 1973-1985.

15. Kelly SJ, Goodlett CR, Hannigan JH. 2009. Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social

23. Ortiz J.B., Conrad C.D. 2018. The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49: 114-123.

24. Raju M., Kulkarni Y.A., Wairkar S. 2019. Therapeutic potential and recent delivery systems of berberine: A wonder molecule. *Journal of Functional Foods*, 61: 103517.

25. Rehman S.U., Ikram M., Ullah N., Alam S.I., Park H.Y., Badshah H. 2019. Neurological enhancement effects of melatonin against brain injury-induced oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration via AMPK/CREB signaling. *Cells*, 8(7): 760.

26. Rodriguez C.I.., Vergara V.M., Davies S., Calhoun V.D., Savage D.D., Hamilton D.A. 2021. Detection of prenatal alcohol exposure using machine learning classification of resting-state functional network connectivity data. *Alcohol*, 93: 25-34.

27. Shankar K., Ronis M.J., Badger T.M. 2007. Effects of pregnancy and nutritional status on alcohol metabolism. *Alcohol Research and Health*, 30(1): 55.

28. Shi Q., Liu S., Fonseca V.A., Thethi T.K., Shi L. 2019. Effect of metformin on neurodegenerative disease among elderly adult US veterans with type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open*, 9(7): e024954.

29. Takata F., Dohgu S., Matsumoto J., Machida T., Kaneshima S., Matsuo M. 2013. Metformin induces up-regulation of blood–brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(4): 586-590.

30.Toosi A., Shajiee H., Khaksari M., Vaezi G., Hojati V. 2019. Obestatin improve spatial memory impairment in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders via environment. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 15(3): 200-208.

16. Kosnicki K.L., Penprase J.C., Cintora P., Torres P.J., Harris G.L., Brasser S.M. 2019. Effects of moderate, voluntary ethanol consumption on the rat and human gut microbiome. *Addiction Biology*, 24(4): 617-30.

17. Livy D., Miller E.K., Maier S.E., West J.R. 2003. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicology and Teratology*, 25(4): 447-458.

18. Malisza K.L., Allman A.A., Shiloff D., Jakobson L., Longstaffe S., Chudley A.E. 2005. Evaluation of spatial working memory function in children and adults with fetal alcohol spectrum disorders: a functional magnetic resonance imaging study. *Pediatric Research*, 58(6): 1150-1157.

19. May P.A., Chambers C.D., Kalberg W.O., Zellner J., Feldman H., Buckley D. 2018. Prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in 4 US communities. *Jama*, 319(5): 474-482.

20. Mohseni F., Bagheri F., Khaksari M. 2020. Hydrogen sulfide attenuates the neurotoxicity in the animal model of fetal alcohol spectrum disorders. *Neurotoxicity Research*, 37(4): 977-986.

21. Mohseni F., Bagheri F., Rafaiee R., Norozi P., Khaksari M. 2020. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment via increases of BDNF expression and hippocampal neurogenesis following early postnatal alcohol exposure. *Physiology and Behavior*, 215:112784.

22. Novick Brown N., Connor P.D., Adler R.S. 2012. Conduct-disordered adolescents with fetal alcohol spectrum disorder: Intervention in secure treatment settings. *Criminal Justice and Behavior*, 39(6):770-793.

inhibiting apoptosis and neuroinflammation. *Neuropeptides*,74: 88-94.

31.Uecker A., Nadel L. 1996. Spatial locations gone awry: object and spatial memory deficits in children with fetal alcohol syndrome. *Neuropsychologia*, 34(3): 209-223.

32. Wang Y., Wei J., Li L., Fan C., Sun Y. 2015. Combined use of metformin and everolimus is synergistic in the treatment of breast cancer cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 22(4): 193-201.

33. Wechsler D., Kodama H. 1949. Wechsler intelligence scale for children: Psychological corporation New York.

34. Zhao M., Cheng X., Lin X., Han Y., Zhou Y., Zhao T. 2019. Metformin administration prevents memory impairment induced by hypobaric hypoxia in rats. *Behavioral Brain Research*, 363:30-7.

35. Zhong S., Ding W., Sun L., Lu Y., Dong H., Fan X. 2020. Decoding the development of the human hippocampus. *Nature*, 577(7791): 531-536.

36. Zhu J., Liu K., Huang K., Gu Y., Hu Y., Pan S. 2018. Metformin improves neurologic outcome via amp-activated protein kinase–mediated autophagy activation in a rat model of cardiac arrest and resuscitation. *Journal of the American Heart Association*, 7(12): e008389.

Therapeutic Effect of Metformin on Necrotic Cell Death of Hippocampal Cells and Improvement of Spatial Memory in the Fetal Rat of Model Alcohol Spectrum Disorders

Maryam Sabzali[1], Akram Eidi[1], Mehdi khaksari[2*], Hossein Khastar[2]

1 .Department of Biology, Islamic Azad University, Science & Research Institute, Tehran, Iran

2 .Addiction Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

Abstract

Exposure to alcohol during pregnancy causes a wide range of long-term physiological and behavioral effects, collectively referred to as fetal alcohol syndrome (FASD). Nervous disorders due to alcohol abuse in children with apoptosis in several areas of the brain such as the hippocampus is associated with activation of the oxidative-inflammatory cascade and high levels of nerve degeneration. Studies have shown that metformin (1,1-dimethyl hydrochloride), used as a first-line drug for the treatment of type 2 diabetes, can rapidly cross the blood-brain barrier (BBB) and have neuroprotective effects in several diseases of the nervous system. The aim of this study was to assess the protective activities of metformin on memory impairment and neuronal necrosis in the rat hippocampus by postnatal alcohol exposure received by gavage on days 2-10 after birth. Moreover, infants received 20 and 40 mg/kg of metformin on days 2-10 after birth. To assess spatial memory, the Morris water maze test was performed 36 days after birth. After the behavioral test, nickel staining was performed to assess necrotic cells. The results revealed that metformin treatment could significantly improve spatial memory impairment ($P < 0.01$) and significantly reduced necrotic neurons in the metformin treatment group compared to the ethanol group ($P < 0.01$). Metformin has been shown to improve spatial memory impairment in neonatal rats exposed to ethanol and significantly prevent necrotic death of hippocampal neurons.

Keywords: Metformin, Ethanol, Spatial Memory, Necrosis, Hippocampus.