

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., Haghiri 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

بررسی آثار ال-اسید اسکوربیک و انسولین در پیشگیری از آپوتوز 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 بر میزان 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 ۶ 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 به صورت ترکیبی (I+AA)] استفاده شد. دیابت توسط تزریق استرپتوزوسین (IP، ۶۰ mg/kg) القاء شد. شش هفته پس از القای دیابت، گروه I، انسولین با دوز ۴U/kg/day-۶ به صورت تزریق زیر جلدی، گروه AA، اسید اسکوربیک با دوز (IP، ۲۰۰ mg/kg/day) به صورت داخل صفاقی و گروه I+AA نیز ترکیبی از دو مورد فوق را با همان دوز دریافت کرد. گروه D و گروه C، نرمال سالیین 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 فلورومتري 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 (۶۷ برابر)، در حالی که تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک سبب کاهش فعالیت کاسپاز-۳ در موش‌های صحرایی گروه I، AA و I+AA به ترتیب به میزان ۲/۶، ۴/۲ و ۵/۱ برابر شد. به علاوه استفاده از انسولین و اسید اسکوربیک سبب مهار بروز پدیده 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 آپوتوز ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین را از طریق کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و جلوگیری از بروز پدیده نمای نردبانی (DNA Laddering) در DNA کروموزومی، مهار کند.

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

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

مقدمه

دیابت قندی شایع‌ترین اختلال متابولیک مزمن همراه با افزایش قند خون در انسان است. دیابت می‌تواند ناشی از فقدان انسولین (دیابت نوع ۱) یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع ۲) 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 به وسیله نقص در یادگیری و حافظه، اختلالات نوروشیمیایی و ساختمانی در سیستم عصبی مرکزی مشخص می‌شود [۴ و ۵]. آسیب مستقیم نورون‌ها ممکن است ناشی از افزایش گلوکز داخل سلولی باشد که در نهایت اغلب منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود [۶].

در سال‌های اخیر گزارش شده است که دیابت سیستم عصبی مرکزی را نیز درگیر می‌کند و در داخل سیستم عصبی مرکزی، هیپوکامپ نیز به عنوان یک هدف ویژه در بیماری دیابت درگیر می‌شود [۷]. اختلالات شناختی ناشی از آسیب نورون‌های هیپوکامپ نیز از عوارض دیابت است، به علاوه 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 [۱۱ و ۱۲].

هر چند مکانیسم‌های تخریب سلول‌های عصبی، ناشی از دیابت، در هیپوکامپ کاملاً مشخص نشده است، اما 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 به ندرت قابل انجام است. از طرفی مشخص شده که استفاده از درمان‌های مکمل می‌تواند در جلوگیری یا به تأخیر انداختن شروع عوارض دیابت کمک کند [۱۴]. 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]. به علاوه گزارش شده است که انسولین و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-1) از آپوپتوز اولیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی یا رده سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [۱۶-۱۸].

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

بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش انسولین به عنوان کنترل‌کننده قند خون و اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان 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 تا ۲۵۰ گرم و سن تقریبی ۸ تا ۱۰ 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 23 ± 2 سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات پس از وزن‌کشی و کنترل

سنجش فعالیت کاسپاز-۳

در این مطالعه برای بررسی میزان فعالیت کاسپاز-۳ از کیت Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit (K105) تهیه شده از شرکت Biovision (CA, USA) استفاده شد. برای هر آزمایش، ۵۰ میکروگرم از نمونه بافتی هیپوکامپ موش‌های صحرایی مورد مطالعه، استفاده شد.

در پایان شدت فلورسنت حاصل با دستگاه فلورومتر Shimatso (Jasco, FP-6200, Japan) با طول موج تحریک ۴۰۰ نانومتر و طول موج انتشار ۵۰۵ نانومتر قرائت شد. ضریب-افزایش (Fold increase) فعالیت کاسپاز-۳ از طریق مقایسه نتایج بافت هیپوکامپ موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین با نتایج مربوط به بافت بدون آپوپتوز (بافت هیپوکامپ موش صحرایی غیر دیابتی) همچنین بافت هیپوکامپ موش‌های دیابتی تیمار شده با انسولین و اسید اسکوریک به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی تعیین شد.

شناسایی DNA Laddering

برای شناسایی نمای نردبانی DNA کروموزومی در فرایند آپوپتوز ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی مورد آزمایش از کیت Quick apoptotic DNA Laddering Detection kit (Biovision, USA) استفاده شد. پس از استخراج DNA طبق پروتکل کیت، ۱۵ میکرولیتر از محصول نهایی تکثیر هر نمونه روی یک ژل آگارز ۱/۲ درصد رنگ شده با اتیدیوم بروماید برای مشاهده و عکس‌برداری باندها در داخل چاهک‌های تعبیه شده در ژل ریخته شد. در پایان باندها با استفاده از دستگاه Bio Imaging System (Syngene, U.K.) مشاهده و عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه، Tukey test و آزمون T-student استفاده و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۱/۵) برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

قند خون از طریق ورید دمی با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Bioname; Bioname, UK)، به‌طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی شامل یک گروه کنترل (C) و چهار گروه دیابتی [به‌ترتیب گروه دیابتی کنترل (D)، گروه دیابتی تحت تیمار با انسولین (I)، گروه دیابتی تحت تیمار با اسید اسکوریک (AA) و گروه دیابتی تحت تیمار با انسولین به‌اضافه اسید اسکوریک (I+AA)] تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه‌های دیابتی پس از طی ۲۴ ساعت گرسنگی و بعد از بیهوشی توسط کلروفورم، با داروی استرپتوزوسین (Pharmacia and Upjohn, USA) با یکبار تزریق داخل صفاقی (IP: IntraPeritoneal) به مقدار ۶۰ mg/kg دیابتی شدند [۲۱]. برای تزریق، استرپتوزوسین در سرم فیزیولوژی حل شد. گروه C فقط نرمال سالیین دریافت کردند. سه روز پس از تزریق استرپتوزوسین موش‌های صحرایی با قند خون بالاتر از ۲۵۰ mg/dl دیابتی در نظر گرفته شدند [۲۲]. در پایان هفته ششم در حالی که هر هفته وزن و قند خون حیوانات به‌طور دقیق کنترل و ثبت شد، گروه I تحت تیمار با انسولین پروتامین (NPH) (داروسازی اکسیر بروجرد، ایران) به‌میزان ۴ تا ۶ واحد در روز به‌صورت تزریق زیر جلدی (SubCutaneous) گروه AA تحت تیمار با ویتامین C (داروپخش تهران، ایران) (ال-اسکوریک اسید به فرم قابل تزریق ۵۰۰ mg در ۵ میلی لیتر) با دوز ۲۰۰ mg/kg در روز به‌صورت تزریق داخل صفاقی (IP) و گروه I+AA تحت تیمار با انسولین به‌اضافه اسید اسکوریک به مدت دو هفته قرار گرفتند. گروه C و D به مقدار مساوی نرمال سالیین دریافت داشتند. در پایان دوره درمانی وزن و قند خون موش‌های صحرایی کنترل و یادداشت شد. موش‌های صحرایی با استفاده از کلروفورم بیهوش و کشته شده، مجسمه آن‌ها در طول خط وسط باز و مغز رت‌ها خارج و وزن شد و روی تخته برش یخ بسته (Ice-cooled) قرار داده شد و پرده‌های منتر به‌دقت برداشته و سپس هیپوکامپ به‌دقت تشریح و جدا شد و به تانک ازت مایع منتقل و در دمای ۷۰- سانتی‌گراد برای استخراج پروتئین، DNA و آزمایش‌های دیگر ذخیره شد.

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 (میلی گرم/دسی لیتر)		۱۰۹/۴۰±۵/۶۰	۱۰۶/۹۰±۶/۳۰	۴۷۹/۴۰±۲۳/۳۰	۴۷۲/۷۵±۳۲/۰۰	۴۹۶/۲۵±۳۱/۶۰
قند خون نهایی (میلی گرم/دسی لیتر)		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

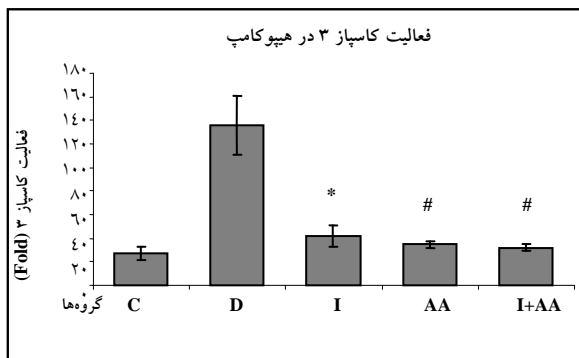
تغییرات مربوط به قند خون و وزن حیوانات

میزان قند خون موش های صحرایی دیابتی سه روز بعد از تزریق استرپتوزوسین برابر یا بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر بود. در پایان دوره درمانی میزان قند خون موش های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به رت های گروه D به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت (p<۰/۰۱). در ابتدا هر پنج گروه وزن تقریباً یکسانی داشتند. در پایان هفته ششم وزن موش های صحرایی گروه های دیابتی به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه C کاهش یافت (p<۰/۰۱). همچنین در پایان دوره درمانی وزن موش های صحرایی گروه I و I+AA نسبت به موش های صحرایی گروه D به طور معنی داری (p<۰/۰۱) افزایش یافت. اختلاف معنی داری بین وزن موش های صحرایی گروه AA و D و همچنین گروه I و I+AA مشاهده نشد (به ترتیب p=۰/۲ و p=۰/۸) (جدول ۱).

کاسپاز-۳

کاسپازها نقش اساسی در آپوتوز دارند و در میان کاسپازها، کاسپاز-۳ در القای آپوتوز در سیستم عصبی مرکزی نقش کلیدی دارد. فعالیت کاسپاز-۳ در موش های صحرایی گروه D نسبت به موش های صحرایی گروه C بعد از هشت هفته دیابتی شدن توسط استرپتوزوسین ۶/۷ برابر

افزایش یافت (به ترتیب $۱۴۰/۵ \pm ۳۵/۸$ و $۲۱/۰ \pm ۵/۹$ ، (p<۰/۰۰۱). در حالی که، بعد از دو هفته تیمار با انسولین (گروه I) و اسید اسکوربیک (گروه AA) و انسولین و اسید اسکوربیک به طور همزمان (گروه I+AA)، از فعالیت کاسپاز ۳ به ترتیب به میزان ۳/۹، ۴/۲ و ۵/۱ برابر (به ترتیب $۳۶/۰ \pm ۲۰/۳$ ، $۳۳/۳ \pm ۳/۸$ و $۲۷/۴ \pm ۵/۵$) کاسته شد ولی به اندازه فعالیت کاسپاز-۳ در گروه C کاهش نیافته است (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی آثار انسولین و اسید اسکوربیک به تنهایی و به طور همزمان بر میزان فعالیت کاسپاز-۳ در ناحیه هیپوکامپ موش های 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 موش های صحرایی گروه های AA و I+AA و گروه I در مقایسه با گروه D معنی دار است. داده ها به صورت Mean ± S.E.M آمده اند (از تعداد ۳ سر موش صحرایی در هر گروه استفاده شده است).

#: p<۰/۰۰۱

*: p<۰/۰۱

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-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 [۲۳ و ۲۴].

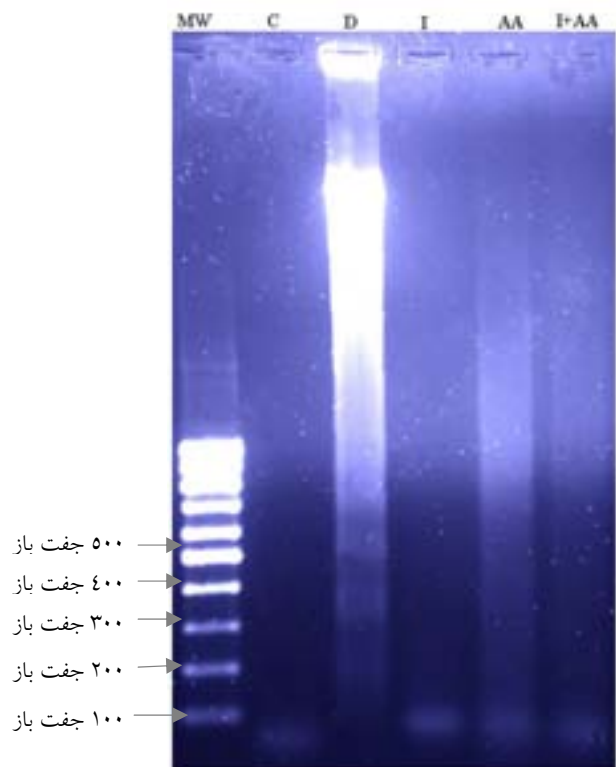
به علاوه انسولین ممکن است با جلوگیری از کاهش بیان Bcl-2 و Bcl-x_L که به وسیله ایجاد دیابت نوع ۱ ناشی از استرپتوزوسین القا شده است، رها شدن سیتوکروم C و سایر فاکتورهای آپوپتوتیک را مهار کند. بنابراین نسبت بیان Bcl-2/Bax و Bcl-x_L/Bax نیز به عنوان یک فاکتور تعیین کننده در مهار یا القای آپوپتوز و همچنین 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 به منظور کنترل قند خون به طور معناداری از تعداد سلول‌های آپوپتوتیک این موش‌ها، نسبت به موش‌های دیابتی که درمانی دریافت نکردند، می‌کاهد. همچنین میزان بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [۲۵].

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

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 به صورت اولیگونوکلوئوزومال درآمده و به فرم نردبانی یا Ladder دیده می‌شوند. در حالی که بعد از دو هفته تیمار با انسولین و اسید اسکوربیک به تنهایی و به طور همزمان، این نمای نردبانی در DNA سلول‌های ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه‌های AA، 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 به طور همزمان (I+AA) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. (MW نشانگر وزن مولکولی است).

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 [۳۴ و ۳۵].

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که انسولین از آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های پوششی یا رده‌های سلولی کارسینومایی جلوگیری می‌کند [۱۸-۱۶]. بنابراین به نظر می‌رسد که انسولین اثر محافظت نوروئی و ضد آپوپتوزی 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-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-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-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 سکنه مغزی، ایسکمی و تشنجات صرعی است [۳۸ و ۳۹]. در مطالعه‌ای ائون جین (Eun Jin) و همکاران نشان دادند که اسید

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. به علاوه نمای نردبانی نیز در DNA کروموزومی سلول‌های این ناحیه از بین می‌رود [۲۶ و ۲۷].

در این راستا کومار (Kumar) و همکاران نشان دادند که استفاده از انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین به طور 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-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 به طور 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 به وفور در سیستم عصبی مرکزی وجود دارد، موجب ادامه فرایند می‌شود [۲۹].

از آنجایی که ممکن است از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به وسیله 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 مکانیسم‌های 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 به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک می‌تواند نورون‌ها را از مرگ محافظت کند و اطلاعات زیادی نشان می‌دهند که انسولین یک فاکتور نوروتروفیک است [۳۱]؛ به طوری که 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]. به علاوه استفاده از انسولین در کشت سلول‌های قشر مغز، مرگ سلولی ناشی از

است با مهار تولید گونه‌های اکسیژن فعال ROS ناشی از دیابت که سبب مرگ نوروها 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 بیوستت کاتکولامین دخالت می‌کند. اسید اسکوربیک همچنین پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا را مهار می‌کند و رادیکال‌های آزاد مغز را به دام می‌اندازد [۴۸ و ۴۹].

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 نوروزنیس 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.

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 رده 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 آنتی‌اکسیدان قوی است که می‌تواند ROS و گونه‌های 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 آنتی‌اکسیدان 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 [۲۰ و ۴۲].

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 [۴۳ و ۴۴].

غلظت بالای داخل سلولی اسید اسکوربیک در نوروها نشان دهنده نقش مهم آن در فیزیولوژی طبیعی نوروها و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان نوروپروتکتیو و نورومدولاتور است (۴۲ و ۴۵).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک و اسید دِهیدرواسکوربیک برای بازیافت ویتامین C به داخل نوروها و آستروسیت‌ها منتقل می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد بازیافت مداوم ویتامین C به‌طور واضح و روشن، انواع مختلف نوروها را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند [۴۶ و ۴۷].

به‌علاوه مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک ممکن

References

1. **Sreemantula S, Kilari EK, Vardhan VA, Jaladi R.** Influence of antioxidant (L- ascorbic acid) on tolbutamide induced hypoglycemia/antihyperglycemia 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. Available from http://www.who.int/whosis/menu.cfm?path=evidence_burden_Burden-Gbd_2000_doc&language=English. 2002.
4. **Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato 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 Axoglial 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

- 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, Hacıoglu G, Yargıçoglu 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, Haghiri 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 Zanzan 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, et 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.

- 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 H₂O₂, 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.