Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Protective Effect of Intranasal Insulin Administration on Cognitive Functions and Neurogenesis in a Rat Model of Alzheimer's Disease

Z. Eshrati (MSc)[1], E. Beirami (PhD)[*1], D. Eslimi Esfahani (PhD)[1]

1.Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R.Iran.

Article Type

Research Paper

ABSTRACT

Background and Objective: Alzheimer's disease is the most common destructive brain disease which is associated with cognitive disorders. Considering the protective role of insulin in the functions of the nervous system, the present study was conducted to investigate the effect of intranasal insulin administration on cognitive disorders and neurogenesis in rats treated with streptozotocin (STZ).

Methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats were divided into 4 groups of 8: control, STZ, STZ + insulin and insulin. The model of Alzheimer's disease was induced by intraventricular injection of STZ (3 mg/kg; 3 µl in each ventricle). Two weeks after STZ injection, cognitive functions were evaluated using Elevated Plus Maze (EPM) and Passive Avoidance (PA) tests. Insulin treatment (2 IU daily; 10 µl in each nasal passage) was performed after STZ injection for 14 consecutive days. The change in the expression of genes involved in neurogenesis (Nestin, DCX and Ki67) in the hippocampus area was investigated by Real-time PCR technique.

Findings: STZ caused longer animal stay in open arms in acquisition phase (64.5±5.24) and recall phase (60.25±5.55) compared to the control group (33±2.17 and 26.38±2.06) in the EPM test ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). In addition, it caused a decrease in learning recall 90 minutes (77.57±6.03) and 24 hours (90.25±7.25) after training, compared to the control group (254.38±3.19 and 238.13±3.46) in the PA test ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively). Insulin treatment improved the above parameters in EPM test (41.88±4.14 and 31.5±4.16, respectively) and PA (278.88±2.32 and 218.5±2.12, respectively) compared to the STZ group. STZ also led to a decrease in Nestin gene expression (0.46±0.04), DCX (0.35±0.04) and Ki67 (0.41±0.05) compared to the control group (1.02±0.11, 1±0.04 and 1.01±0.08, respectively) ($p<0.01$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively), while insulin treatment could increase the expression of these genes (0.87±0.09, 0.78±0.02 and 0.69±0.08, respectively) ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that insulin improved cognitive functions and increased neurogenesis in rats treated with STZ. Therefore, insulin can be considered as an effective therapeutic target in Alzheimer's disease.

Received:
Mar 5th 2023
Revised:
May 2nd 2023
Accepted:
May 31st 2023

Keywords: *Streptozotocin, Alzheimer's Disease, Insulin, Neurogenesis.*

Cite this article: Eshrati Z, Beirami E, Eslimi Esfahani D. Protective Effect of Intranasal Insulin Administration on Cognitive Functions and Neurogenesis in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2023; 25(1): 386-96.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

***Corresponding Author: E. Beirami (PhD)**
Address: Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 (21) 86072709. **E-mail:** elmira.beirami@khu.ac.ir

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

اثر محافظتی تجویز داخل بینی انسولین بر عملکردهای شناختی و نوروژنز در موش صحرایی مدل بیماری آلزایمر

زهرا عشرتی (MSc)[1]، المیرا بیرامی (PhD)[1]*، دلارام اسلیمی اصفهانی (PhD)[1]

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۱/۱۲/۱۴
اصلاح:
۱۴۰۲/۲/۱۲
پذیرش:
۱۴۰۲/۳/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری مخرب مغزی است که با اختلالات شناختی همراه می‌باشد. با توجه به نقش محافظتی انسولین در عملکردهای سیستم عصبی، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز داخل بینی انسولین بر اختلالات شناختی و نوروژنز در موش‌های صحرایی تیمار شده با استرپتوزوتوسین (STZ) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۴ گروه ۸ تایی: کنترل، STZ، STZ+انسولین و انسولین تقسیم بندی شدند. مدل آلزایمر با تزریق درون بطنیSTZ (۳ mg/kg؛ ۳ µl در هر بطن) القاء شد. دو هفته پس از تزریق STZ، بررسی عملکردهای شناختی با استفاده از تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (Elevated Plus Maze= EPM) و آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال (Passive Avoidance= PA) انجام گرفت. تیمار با انسولین (روزانه ۲ IU؛ ۱۰ µl در هر مجرای بینی) پس از تزریق STZ و به مدت ۱۴ روز متوالی انجام گرفت. تغییر بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز (Nestin، DCX و Ki67) در ناحیه هیپوکامپ، توسط تکنیک Real-time PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: STZ سبب افزایش حضور در بازوهای باز در مرحله اکتساب (۵/۲۴±۶۴/۵) و به یادآوری حافظه (۵/۵۵±۶۰/۲۵) نسبت به گروه کنترل (۲/۱۷±۳۳ و ۲/۰۶±۲۶/۳۸) در تست EPM شد (به ترتیب $p<0.05$ و $p<0.01$). بعلاوه سبب کاهش به خاطرآوری یادگیری ۹۰ دقیقه (۶/۰۳±۷۷/۵۷) و ۲۴ ساعت (۷/۲۵±۹۰/۲۵) بعد از آموزش، نسبت به گروه کنترل (۳/۱۹±۲۵۴/۳۸ و ۳/۴۶±۲۳۸/۱۳) در تست PA شد (به ترتیب $p<0.001$ و $p<0.05$). تیمار با انسولین سبب بهبود پارامترهای فوق در تست EPM (به ترتیب ۴/۱۴±۴۱/۸۸ و ۴/۱۶±۳۱/۵) و PA (به ترتیب ۲/۳۲±۲۷۸/۸۸ و ۲/۱۲±۲۱۸/۵) نسبت به گروه STZ شد. STZ همچنین منجر به کاهش بیان ژن Nestin (۰/۰۴±۰/۴۶)، DCX (۰/۰۴±۰/۳۵) و Ki67 (۰/۰۵±۰/۴۱) نسبت به گروه کنترل (به ترتیب ۰/۱۱±۱/۰۲، ۰/۰۴±۱ و ۰/۰۸±۱/۰۱) گردید (به ترتیب $p<0.01$، $p<0.001$ و $p<0.001$)، در حالی که تیمار با انسولین توانست بیان این ژن‌ها را افزایش دهد (به ترتیب ۰/۰۹±۰/۸۷، ۰/۰۲±۰/۷۸ و ۰/۰۸±۰/۶۹) ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که انسولین سبب بهبود عملکردهای شناختی و افزایش نوروژنز در موش‌های تیمار شده با STZ گردید، بنابراین انسولین می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی موثر در بیماری آلزایمر مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوزوتوسین، بیماری آلزایمر، انسولین، نوروژنز.

استناد: زهرا عشرتی، المیرا بیرامی، دلارام اسلیمی اصفهانی. اثر محافظتی تجویز داخل بینی انسولین بر عملکردهای شناختی و نوروژنز در موش صحرایی مدل بیماری آلزایمر. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۲؛ ۲۵(۱): ۹۶-۳۸۶.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

▣ این مطالعه مستخرج از پایان نامه زهرا عشرتی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری دانشگاه خوارزمی می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر المیرا بیرامی
آدرس: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری. تلفن: ۸۶۰۷۲۷۰۹-۰۲۱
رایانامه: elmira.beirami@khu.ac.ir

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری تحلیل برنده عصبی است که با اختلالات پیشرونده در عملکردهای شناختی همراه می‌باشد. از دست رفتن حافظه، عدم توجه و تمرکز، اختلال در تفکر و استدلال، تغییرات خلقی و رفتاری مانند آشفتگی، اضطراب و افسردگی از علائم بارز این بیماری هستند که می‌توانند توانایی فرد را برای انجام فعالیت‌های روزانه مختل نمایند. تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی، استرس اکسیداتیو، التهاب عصبی و اختلال در عملکرد میتوکندری نیز از مهم‌ترین خصوصیات پاتوفیزیولوژیک در مغز بیماران آلزایمری می‌باشند که در نهایت می‌توانند منجر به بروز اختلالات شناختی شوند (۱).

تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin= STZ) به موش‌های صحرایی، در دوزهای پایین‌تر از دوز ایجادکننده دیابت (۳ mg/kg)، یکی از روش‌های مناسب برای القاء بیماری آلزایمر در کوتاه‌ترین زمان ممکن (دو هفته بعد از تزریق) می‌باشد (۳و۲). در این روش، STZ با ایجاد اختلال در جذب گلوکز مغزی، بروز استرس اکسیداتیو، ایجاد التهاب، تجمع پروتئین تائو هایپرفسفریله، ایجاد اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین، کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین ترانسفراز و نیز آسیب به نورون‌های کولینرژیک باعث بروز اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود (۴و۳). با توجه به اینکه تزریق درون بطنی STZ سبب بروز تغییرات رفتاری، مولکولی و پاتولوژیکی مشابه با بیماری آلزایمری می‌شود، لذا، این روش می‌تواند مدل حیوانی مناسبی را برای القاء بیماری آلزایمر و مطالعه سیگنالینگ‌های مولکولی تخریب شده در این بیماری ارائه دهد (۲).

بررسی تغییرات در فرآیند نوروژنز در مغز مبتلایان به آلزایمر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به این ترتیب که برخی از مطالعات افزایش (۶و۵) و برخی دیگر کاهش نوروژنز (۸و۷) را در بیماری آلزایمر گزارش نموده‌اند. نوروژنز، در تعریف جامع فرآیند تولید نورون‌های عملکردی از سلول‌های پیش‌ساز عصبی است که در پستانداران به طور معمول در مراحل جنینی و پیش از تولد مشاهده می‌شود و در مغز پستانداران بالغ این فرآیند محدود به مناطق خاصی از مغز همچون ناحیه ساب‌گرانولا و ناحیه زیر بطنی بوده و برای حفظ شکل‌پذیری سیناپسی و شکل‌گیری حافظه ضروری می‌باشد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که عوامل نوروتروفیک و فاکتورهای رشد از تنظیم کننده‌های مهم فرآیند نوروژنز در مغز بالغین می‌باشند، که از جمله آنها می‌توان به انسولین اشاره نمود (۱۰).

انسولین دارای اثرات محافظتی زیادی در عملکردهای سیستم عصبی مرکزی می‌باشد، بطوریکه سطوح کاهش یافته انسولین و یا اختلال در مسیر سیگنالینگ آن در بیماری‌های نورودژنراتیو همچون بیماری آلزایمر گزارش شده است (۱۱). با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که تجویز داخل بینی انسولین با تحت تاثیر قرار دادن نواحی دخیل در فرآیندهای شناختی، باعث بهبود حافظه در موش‌های مدل بیماری آلزایمر می‌گردد (۱۳و۱۲). در این روش تجویز، انسولین به راحتی وارد نواحی مختلف مغز همچون هیپوکامپ و کورتکس شده و بر خلاف سایر روش‌های تزریق از جمله تزریق داخل وریدی و یا زیرجلدی، که روش‌های تهاجمی بوده و همراه با اثرات جانبی همچون هایپوگلیسمیا می‌باشند، در تجویز داخل بینی انسولین، میزان انسولین و نیز گلوکز خون محیطی بدون تغییر باقی می‌ماند (۱۴).

با وجود اینکه مطالعات تاثیر مثبت انسولین را در بهبود حافظه بیماران مبتلا به آلزایمر و یا مدل‌های حیوانی این بیماری گزارش کرده‌اند، با این حال مکانیسم‌های مولکولی و سلولی زمینه ساز این بیماری هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. با توجه به اهمیت نورژنز در فرآیندهای شناختی و نیز وجود مطالعات ضد و نقیض در ارتباط با تغییرات نوروژنز در مغز بیماران آلزایمری، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز داخل بینی انسولین بر اکتساب و به یادآوری حافظه با استفاده از تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع، ارزیابی به خاطرآوری یادگیری با استفاده از آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال و نیز بررسی میزان تغییر بیان ژن‌های مهم دخیل در فرآیند نورژنز در موش‌های تیمار شده با STZ می‌باشد تا مشخص شود آیا تجویز داخل بینی انسولین، بر اساس پروتکل ارائه شده در این پژوهش، می‌تواند از طریق تعدیل بیان فاکتورهای دخیل در نوروژنز موجب بهبود و یا کاهش نقایص شناختی در یک مدل حیوانی از بیماری آلزایمر گردد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب درکمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی با کد IR.KHU.REC.1401.026، بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) انجام گرفت. حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲۲±۲ °C)، رطوبت (۱۰٪±۵۰) و نوری (دوره تاریکی- روشنایی ۱۲ ساعته) و با امکان دسترسی کافی به آب و غذا به صورت چهارتایی در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند:

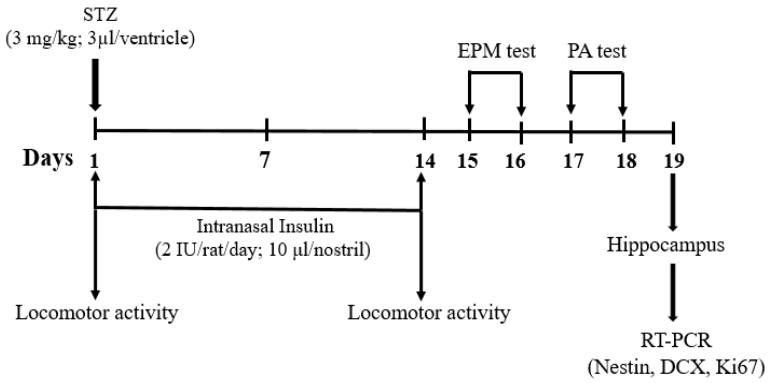
۱-**گروه کنترل:** این گروه ابتدا سالین را به صورت درون بطنی (۳ µl در هر بطن) و سپس به مدت ۱۴ روز سالین را به صورت داخل بینی (۱۰ µl در هر مجرای بینی) دریافت نمودند.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

۲-**گروه STZ:** این گروه STZ (۳ mg/kg) را به صورت درون بطنی (۳ µl در هر بطن) و سپس به مدت ۱۴ روز سالین را به صورت داخل بینی (۱۰ µl در هر مجرای بینی) دریافت نمودند.

۳-**گروه STZ و تیمار با انسولین (STZ+Ins):** این گروه STZ (۳ mg/kg) را به صورت درون بطنی (۳ µl در هر بطن) و سپس به مدت ۱۴ روز انسولین (روزانه ۲ IU) را به صورت داخل بینی (۱۰ µl در هر مجرای بینی) دریافت نمودند.

۴-**گروه انسولین (Ins):** این گروه سالین را به صورت درون بطنی (۳ µl در هر بطن) و سپس به مدت ۱۴ روز انسولین (روزانه ۲ IU) را به صورت داخل بینی (۱۰ µl در هر مجرای بینی) دریافت نمودند. پروتکل انجام این مطالعه در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. پروتکل زمانبندی تجویز داروها، انجام تست‌های رفتاری و مطالعات مولکولی

القاء بیماری آلزایمر: برای این منظور از STZ خریداری شده از شرکت سیگما آمریکا استفاده شد. انتخاب دوز STZ (۳ mg/kg) و تزریق آن به صورت تک دوز در روز ۱، بر اساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۱۵و۳و۲). حیوانات بعد از بیهوشی توسط ترکیب کتامین (۸۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg)، در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفتند. پس از تعیین نقاط برگما و لامبدا، مختصات بطن‌های جانبی جهت تزریق STZ طبق اطلس پاکسینوس مشخص شد (AP=-۰/۸ mm، ML=±۱/۵ mm و DV=-۳/۶ mm). سپس با استفاده از میکروسرنگ همیلتون، ۳ µl از STZ (۳ mg/kg) با سرعت تزریق ۱ µl در دقیقه در هر بطن تزریق شد. تجویز داخل بینی انسولین توسط میکروپیپت و به مدت ۱۴ روز متوالی، طبق پروتکل انجام گرفت (شکل ۱). به این ترتیب که هر حیوان هوشیار روزانه ۲۰ µl انسولین، محتوی ۲ واحد انسولین (۲ IU)، را به صورت تجویز داخل بینی دریافت می‌نمود (۱۰ µlدر هر مجرای بینی) (۱۳).

ارزیابی فعالیت حرکتی: برای این منظور از دستگاه Open field استفاده شد. این دستگاه شامل یک جعبه از جنس پلاستیک فشرده شفاف به ابعاد ۴۰×۴۰×۴۰ cm است که به حسگرهای مادون قرمز در فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه پایینی جعبه مجهز است. قبل از شروع و بعد از اتمام تزریق داروها (به ترتیب روزهای ۱ و ۱۴) حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفت و سپس فعالیت‌های حرکتی افقی حیوان (تعداد عبور از مقابل حسگرهای مادون قرمز) در این مدت توسط دستگاه ثبت شده و به عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی استفاده شد (۱۶).

ارزیابی اکتساب و به یادآوری حافظه: برای این منظور از دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (Elevated Plus Maze= EPM) استفاده شد. این دستگاه دارای چهار بازو است که دو بازوی آن فاقد هر گونه دیواره بوده و در ابعاد ۱۰×۵۰cm هستند. دو بازوی دیگر دارای دیواره هایی به رنگ تیره و به ابعاد ۵۰×۱۰×۴۰cm می‌باشند. ارتفاع این دستگاه از سطح زمین ۵۰cm بوده و به همین دلیل ماز مرتفع نامیده می‌شود. این تست در ۲ مرحله و در ۲ روز متوالی انجام گرفت. در روز ۱۵ اکتساب حافظه و ۲۴ ساعت بعد، به یادآوری حافظه مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی اکتساب حافظه، هر حیوان در انتهای یکی از بازوهای باز و پشت به مرکز دستگاه قرار گرفت و سپس مدت زمانی که طول کشید تا حیوان از بازوی باز به یکی از بازوهای بسته وارد شود به عنوان (Initial Transfer Latency= ITL) در نظر گرفته شد. در مرحله به یادآوری حافظه، حیوان در انتهای همان بازوی بازی که در مرحله قبل قرار گرفته بود، قرار داده شد و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان از بازوی باز به یکی از بازوهای بسته وارد شود به عنوان (=Retention Transfer Latency RTL) در نظر گرفته شد. زمان کل این آزمون ۹۰ ثانیه بود و در صورتی که حیوان در این مدت بازوی بسته را پیدا نمی‌کرد، RTL برای حیوان ۹۰ ثانیه ثبت می‌شد. کاهش در RTL به عنوان شاخص بهبود عملکرد شناختی در نظر گرفته شد (۱۷).

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال: دستگاه مربوط به سنجش این تست از دو بخش مجزا تشکیل شده است که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا شده‌اند. در کف هر کدام از بخش‌ها میله‌هایی به قطر ۳ mm وجود دارد که با فاصله ۱ cm از هم قرار گرفته‌اند. ابعاد هر بخش ۳۰×۲۰×۲۰ cm بوده و در بالای محفظه روشن یک لامپ ۱۰ واتی قرار گرفته است. این تست در ۳ مرحله و در ۲ روز متوالی انجام گرفت:

۱-**مرحله عادت سازی:** در این مرحله هر حیوان در داخل بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت. ۱۰ ثانیه بعد درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود، به محض ورود به این بخش درب بسته شد تا حیوان ۳۰ ثانیه آزادانه در آنجا حرکت نماید.

۲-**مرحله آموزش:** این مرحله ۳۰ دقیقه بعد از مرحله ۱ انجام گرفت. ابتدا دست‌ها، پاها و دم حیوان خیس شد و سپس در بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت. بعد از ۱۰ ثانیه درب برداشته شد و اجازه ورود به بخش تیره به حیوان داده شد. به محض ورود حیوان به بخش تیره، درب بسته و جریان الکتریکی با شدت ۱ میلی‌آمپر و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲ ثانیه از پاهای حیوان عبور داده شد. ۲۰ ثانیه پس از اعمال شوک درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش روشن شود. اگر حیوان بعد از ورود به بخش روشن، ۱۲۰ ثانیه در این بخش می‌ماند و وارد بخش تاریک نمی‌شد، نشان دهنده شکل‌گیری یادگیری در حیوان بود.

۳-**مراحل به خاطرآوری یادگیری:** این مراحل به ترتیب ۹۰ دقیقه و ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش انجام گرفتند، با این تفاوت که هیچ شوک الکتریکی به پای حیوان وارد نمی‌شد. میزان تأخیر در ورود اولیه به بخش تاریک (Step-through latency= STL) در طی ۳۰۰ ثانیه ثبت شد (۱۸).

تکنیک Real-Time PCR (RT-PRC): برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های Nestin (مارکر سلول‌های بنیادی عصبی)، (DCX) Doublecortine (مارکر تمایز سلول بنیادی عصبی به نوروبلاست) و Ki67 (مارکر تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی) در هیپوکامپ، از این تکنیک استفاده شد. استخراج RNA توسط کیت (Total RNA Extraction Kit, pars tous) انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت (Easy cDNA Synthesis Kit, pars tous) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۱۵ µl تشکیل شد که شامل ۲ µl cDNA، ۱ µl از پرایمرهای Forward و Reverse، ۷/۵ µl مسترمیکس حاوی Sybergreen و ۳/۵ µl آب مقطر دو بار تقطیر بود. واکنش با استفاده از دستگاه Applied Biosystems Step One و برنامه زمانی و دمایی ۹۵ °C به مدت ۱۵دقیقه (۱ چرخه)، تکرار ۴۰چرخه شامل: ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به کمک نرم افزار Oligo analysis طراحی و توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شد (جدول ۱). آنالیز داده‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت. نتایج تمام ژن‌ها نسبت به ژن بتا- اکتین، به عنوان کنترل داخلی، نرمالایز شد و سپس مقایسه بین گروه‌ها انجام گرفت (۱۹).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

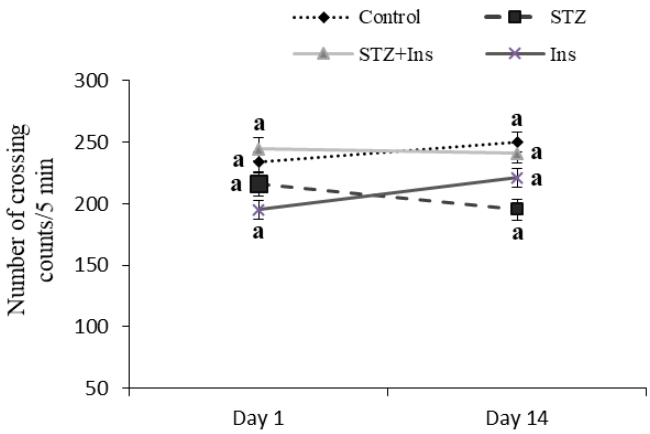
ژن	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Nestin	GGAGCAGGAGAAGCAAGGTC	GAGTTCTCAGCCTCCAGCAG
DCX	GGAAGGGGAAAGCTATGTCTG	TTGCTGCTAGCCAAGGACTG
Ki67	CGGCGAGCCTCAAGAGATA	CGTGCTGTTCTACATGCCC
β-actin	TCTATCCTGGCCTCACTGTC	AACGCAGCTCAGTAACACTCC

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پیش از انجام آزمون‌های آماری به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمونKolmogorov-Smirnov استفاده شد. برای بررسی داده‌های به دست آمده از تست EPM، PA و RT-PCR از آزمون واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و برای مشخص نمودن گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون تعقیبی توکی (Tukey post hoc test) استفاده شد. آزمون آماری Repeated-measures ANOVA نیز جهت آنالیز داده‌های حاصل از تست Open filed مورد استفاده قرار گرفت. نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (IBM, SPSS, Armonk, NY, USA) برای بررسی‌های آماری استفاده گردید و نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۸ (Graph Pad Software, USA) برای رسم نمودارها استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

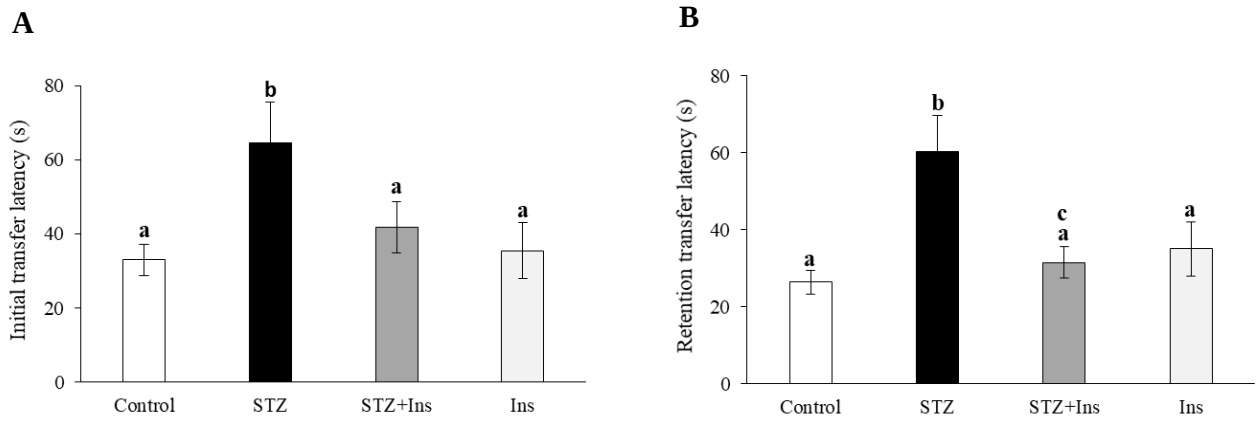
یافته ها

بررسی نتایج مربوط به فعالیت حرکتی حیوانات نشان داد که بین فعالیت حرکتی گروه کنترل و گروه STZ در روز ۱ (۴/۳±۲۳۴/۲ در مقابل ۶/۱±۲۱۵/۸) و روز ۱۴ (۳/۵۶±۲۵۰/۱ در مقابل ۵/۲۱±۱۹۵/۲) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین نتایج تفاوت معنی‌داری را در فعالیت حرکتی گروه STZ و گروه STZ تیمار شده با انسولین در روز ۱ و ۱۴ نشان نداد (به ترتیب ۳/۲±۲۴۴/۵ و ۳/۰۴±۲۴۱/۱). بین گروه کنترل و گروهی که انسولین را به تنهایی دریافت نموده بودند نیز در روز ۱ (۲/۴±۱۹۵/۱) و روز ۱۴ (۳/۴±۲۲۱/۲) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۱).



نمودار ۱. اثر تزریق STZ و انسولین بر فعالیت حرکتی حیوانات (حرف a نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد)

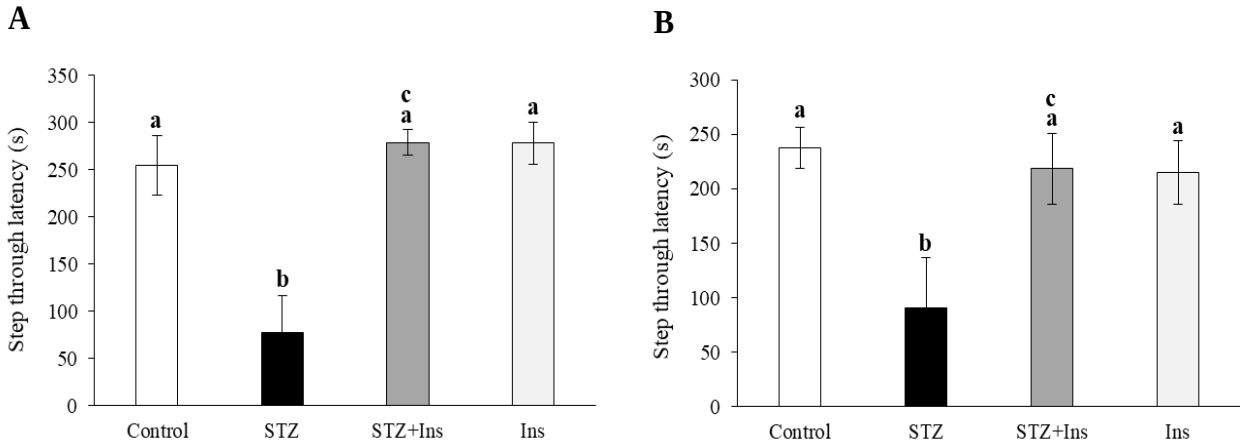
نتایج مطالعه همچنین نشان داد که تزریق درون بطنی STZ به طور قابل توجهی سبب افزایش حضور حیوان در بازوهای باز در مرحله اکتساب (۵/۲۴±۶۴/۵) و به یادآوری حافظه (۵/۵۵±۶۰/۲۵) نسبت به گروه کنترل (۲/۱۷±۳۳) و (۲/۰۶±۲۶/۳۸) در تست EPM شد (به ترتیب p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱)، که دلالت بر بروز اختلال در اکتساب و به یادآوری حافظه در اثر تزریق STZ دارد. در حالی که تیمار با انسولین سبب کاهش مدت زمان سپری شده در بازوهای باز در مرحله اکتساب (۴/۱۴±۴۱/۸۸) و به یادآوری حافظه (۴/۱۶±۳۱/۵) نسبت به گروه STZ شد (p<۰/۰۵)، اما این کاهش از لحاظ آماری در مرحله اکتساب حافظه معنی‌دار نبود. این نتایج دلالت بر افزایش توانایی حیوان در پیدا کردن سریع بازوهای بسته در گروه STZ تیمار شده با انسولین نسبت به گروه STZ دارد. تجویز انسولین به تنهایی، تغییری در اکتساب (۶/۴۳±۳۵/۵) و به یادآوری حافظه (۵/۳۱±۳۵) نسبت به گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۲A و ۲B).



نمودار ۲. اثر تجویز داخل بینی انسولین بر اکتساب و به یادآوری حافظه در موش‌های تیمار شده با STZ در تست EPM. نمودار **A: اکتساب حافظه، نمودار B: به یادآوری حافظه. (a: عدم وجود اختلاف معنی‌دار، b: اختلاف در مقایسه با گروه کنترل، c: اختلاف در مقایسه با گروه STZ)**

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

بعلاوه، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق STZ سبب کاهش معنی‌دار در زمان تاخیر اولیه (STL) در ورود به بخش تاریک در مرحله به خاطرآوری یادگیری، ۹۰ دقیقه (۶/۰۳±۷۷/۵۷) و ۲۴ ساعت (۷/۲۵±۹۰/۲۵) بعد از آموزش، نسبت به گروه کنترل (۳/۱۹±۲۵۴/۳۸) و (۳/۴۶±۲۳۸/۱۳) در تست PA شد (به ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۵). در حالی که تیمار با انسولین باعث افزایش STL در ورود به بخش تاریک در این دو مرحله (به ترتیب ۲/۳۲±۲۷۸/۸۸ و ۲/۱۲±۲۱۸/۵) نسبت به گروه STZ گردید، که دلالت بر افزایش حافظه اجتنابی غیرفعال حیوان توسط انسولین در به یادآوری شوک در بخش تاریک دستگاه را دارد. شایان ذکر است که تجویز انسولین به تنهایی اثری بر روی این مراحل (به ترتیب ۴/۵۳±۲۷۸ و ۵/۱۱±۲۱۵) در مقایسه با گروه کنترل نداشت (نمودار ۳A و ۳B).

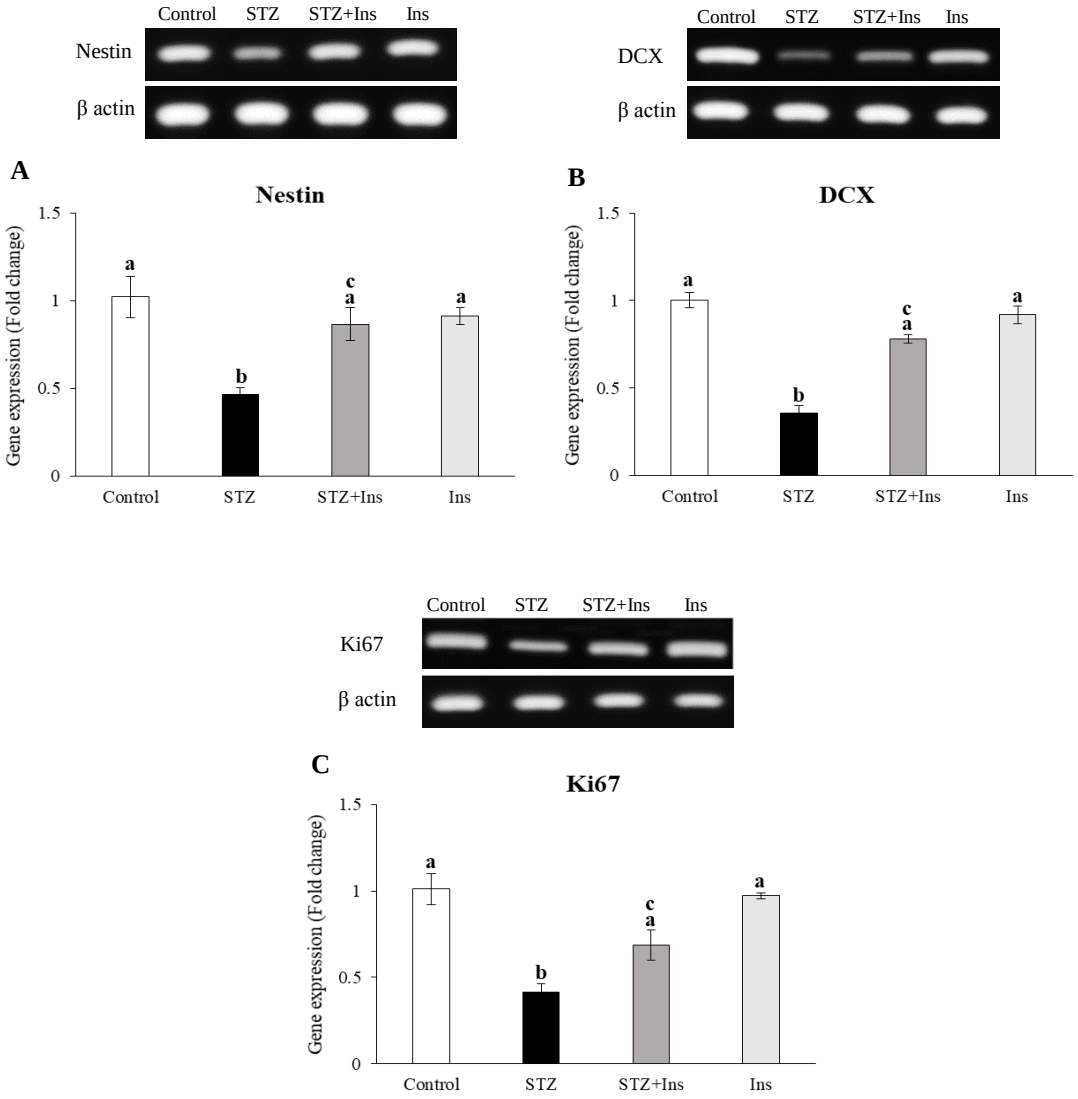


نمودار ۳. اثر تجویز داخل بینی انسولین بر به خاطرآوری یادگیری در موش‌های تیمار شده با STZ در تست PA. نمودار A: به خاطرآوری یادگیری ۹۰ دقیقه بعد از آموزش، نمودار B: به خاطرآوری یادگیری ۲۴ ساعت بعد از آموزش (a: عدم وجود اختلاف معنی‌دار، b: اختلاف در مقایسه با گروه کنترل، c: اختلاف در مقایسه با گروه STZ)

نتایج حاصل از مطالعات مولکولی نشان داد که در گروه STZ در مقایسه با گروه کنترل بیان ژن Nestin (۰/۰۴±۰/۴۶ در مقابل ۰/۱۱±۱/۰۲)، DCX (۰/۰۴±۰/۳۵ در مقابل ۰/۰۴±۱) و Ki67 (۰/۰۵±۰/۴۱ در مقابل ۰/۰۸±۱/۰۱) به طور معنی‌داری کاهش یافت (به ترتیب p<۰/۰۱، p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۱). در حالی که تیمار با انسولین باعث افزایش قابل توجه در بیان ژن Nestin (۰/۰۹±۰/۸۷)، DCX (۰/۰۲±۰/۷۸) و Ki67 (۰/۰۸±۰/۶۹) نسبت به گروه STZ شد (به ترتیب p<۰/۰۵، p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۵). تجویز انسولین به تنهایی تاثیری بر بیان ژن Nestin (۰/۰۴±۰/۹۱)، DCX (۰/۰۵±۰/۹۲) و Ki67 (۰/۰۱±۰/۹۷) نسبت به گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۴A، ۴B و ۴C).

به منظور بررسی اثر تزریق درون بطنی STZ و همچنین تجویز داخل بینی انسولین بر وزن حیوانات، در تمامی گروه‌ها، وزن حیوانات در روز ۱ (قبل از جراحی)، روز ۷ و همچنین بعد از آخرین تجویز داخل بینی انسولین (روز ۱۴) اندازه‌گیری شد. نتایج تغییر معنی‌داری را در وزن حیوانات گروه‌های مختلف نشان نداد. بعلاوه جهت اطمینان از عدم تغییر گلوگز خون محیطی و عدم ایجاد هایپوگلیسمیا، که ممکن است فعالیت‌های رفتاری حیوانات را تحت تاثیر قرار دهند، ۴۰-۳۰ دقیقه بعد از تجویز داخل بینی انسولین گلوگز خون توسط خونگیری از دم حیوان هوشیار و با استفاده از دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد (حدود ۲۰-۱۵ دقیقه طول می‌کشد تا انسولین در رت از راه بینی وارد مغز شود (۲۰). نتایج حاصل تغییر معنی‌داری را در میزان گلوگز خون محیطی حیوانات گروه‌های مختلف نشان نداد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]



نمودار ٤. اثر تجویز داخل بینی انسولین بر مارکرهای نوروژنز در موش‌های تیمار شده با STZ. A: Nestin، B: DCX، C: Ki67.
(a: عدم وجود اختلاف معنی‌دار، b: اختلاف در مقایسه با گروه کنترل، c: اختلاف در مقایسه با گروه STZ)

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر تاثیر مثبت تجویز داخل بینی انسولین را در بهبود عملکردهای شناختی در موش‌های صحرایی تیمار شده با STZ نشان داد، که این رویدادها با افزایش بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز در هیپوکامپ این حیوانات همراه بود. در این مطالعه موش‌های صحرایی دو هفته پس از تزریق درون بطنی STZ اختلال در اکتساب و به یادآوری حافظه را در تست EPM و نیز اختلال در به خاطرآوری یادگیری را در تست PA نشان دادند، در حالی که تیمار با تجویز داخل بینی انسولین توانست منجر به کاهش اختلالات مذکور در این حیوانات نسبت به گروه STZ شود. در تایید یافته‌های ما، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تزریق درون بطنی STZ سبب بروز اختلال در یادگیری و انواع مختلف حافظه‌ها همچون حافظه فضایی، حافظه شناختی و حافظه اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی می‌شود (۲۱و۱۵و۴-۲). بعلاوه، همسو با یافته‌های ما مطالعات پیشین گزارش کرده‌اند که تیمار موش‌های صحرایی مدل بیماری آلزایمر با تجویز داخل بینی انسولین سبب بهبود حافظه و یادگیری در این حیوانات می‌شود (۲۲و۱۳و۱۲). مطالعه دیگر نشان داده است که تجویز داخل بینی انسولین، بدون افزایش قند خون محیطی، سبب بهبود حافظه فضایی در بیماران مبتلا به آلزایمر و نیز افرادی که دارای اختلالات خفیف شناختی هستند، می‌شود (۲۳).

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

همچنین گزارش شده است که تجویز داخل بینی انسولین با کاهش بیان پروتئین آمیلوئید بتا (Aβ)، کاهش التهاب عصبی، کاهش آپوپتوز، کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش بیان فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک سبب بهبود حافظه فضایی در موش‌های صحرایی مدل بیماری آلزایمر می‌شود (۲۴و۱۳). در مطالعه حاضر نتایج بررسی فعالیت‌های حرکتی حیوانات، قبل از شروع و بعد از اتمام تزریق داروها، تایید نمود که داده‌های حاصل از تست‌های رفتاری به دلیل وجود اختلالات حرکتی در حیوانات نبوده است. در راستای تایید نتایج ما، سایر مطالعات نیز عدم بروز اختلال در فعالیت‌های حرکتی حیوان را به دنبال تزریق درون بطنی STZ و تجویز داخل بینی انسولین گزارش کرده‌اند (۱۸و۳).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق درون بطنی STZ منجر به کاهش چشمگیر در بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز (Nestin، DCX و Ki67) در هیپوکامپ موش‌ها شد، که دلالت بر تاثیر STZ در کاهش فرآیند نوروژنز دارد. در حالی که تیمار این موش‌ها با تجویز داخل بینی انسولین افزایش قابل توجهی را در بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز نسبت به گروه STZ نشان داد. در توافق با یافته‌های ما، گزارش شده است که تزریق درون بطنی STZ باعث کاهش بیان مارکرهای دخیل در نوروژنز، افزایش التهاب عصبی، اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز بروز اختلالات شناختی در موش‌های صحرایی بالغ می‌شود (۲۵و۲۱). بعلاوه در موش‌های ترانس‌ژنیک مدل بیماری آلزایمر نیز کاهش نوروژنز مشاهده شده است (۸و۷). علی‌رغم مطالعات فوق که کاهش نوروژنز را در مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر گزارش کرده‌اند، مطالعاتی هم وجود دارد که افزایش نوروژنر را در مراحلی از بیماری آلزایمر در موش‌های ترانس‌ژنیک (۲۶و۶) و یا در افراد مبتلا به بیماری آلزایمر نشان داده‌اند (۵). با این حال گزارش شده است در مواردی که افزایش نوروژنر در مغز بیماران آلزایمری مشاهده می‌گردد، نورون‌های تازه متولد شده برای مدت زمان زیادی زنده باقی نمی‌مانند و قبل از بلوغ از بین می‌روند (۵). تاکنون عوامل دخیل در افزایش نوروژنز در بیماری آلزایمر به طور دقیق شناخته نشده است، اما به نظر می‌رسد که پپتید Aβ و پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (Amyloid precursor protein= APP) در این فرآیند نقش داشته باشند. بطوریکه اثرات نوروژنیک پپتید Aβ در مطالعات in vitro و in vivo گزارش شده است (۲۷و۲۶) و نیز نشان داده شده است که APP از طریق فعال کردن مسیر سیگنالینگ ERK موجب افزایش نوروژنز می‌گردد (۲۸).

تفاوت در گونه، ژنتیک، موتاسیون‌ها، مرحله بیماری و نیز روش بررسی فرآیند نوروژنز می‌تواند سبب ایجاد نتایج متفاوت در این زمینه شده باشد و افزایش نوروژنز در بیماری آلزایمر به نظر می‌رسد که یک مکانیسم جبرانی ناکارآمد جهت مقابله با نقایص شناختی در این بیماری می‌باشد، چرا که نورون‌های تازه متولد شده در هیپوکامپ، که در فرآیند یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ مشارکت دارند، مدت زمان زیادی زنده باقی نخواهند ماند (۵). با این وجود، شواهد بسیاری حاکی از آن است که نقایص نوروژنز یکی از عوامل دخیل در کاهش عملکردهای شناختی در بیماری آلزایمر می‌باشد (۲۵و۲۱و۸و۷). در مطالعه حاضر همسو با نتایج حاصل از تیمار با انسولین، گزارشاتی مبنی بر ارتباط مستقیم بین افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ انسولین و نوروژنز وجود دارد. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که در طی رشد مغز، میزان انسولین و گیرنده‌های آن در مغز افزایش قابل توجهی پیدا می‌کنند (۲۹). مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده است که انکوباسیون نورون‌های جنینی در محیط عاری از انسولین تغییری در میزان تکثیر، تمایز و بقاء نورونی ایجاد نمی‌کند، در صورتیکه با افزودن انسولین به محیط کشت این نورون‌ها، افزایش قابل توجهی در این موارد مشاهده می‌گردد (۳۰). همچنین گزارش شده است که در میمون‌های مسن میزان نوروژنز در شکنج دندانه‌ای کاهش می‌یابد، در صورتیکه تزریق انسولین می‌تواند سبب جلوگیری از این کاهش شود (۳۱). مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که تجویز داخل بینی انسولین با افزایش بیوژنز میتوکندری، افزایش بیان فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین، کاهش التهاب، تعدیل شکل پذیری سیناپسی، افزایش انتقالات سیناپسی و نیز تقویت نوروژنز می‌تواند سبب بهبود حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی دارای اختلالات شناختی شود (۳۲و۱۸).

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق درون بطنی STZ سبب اختلال در اکتساب و به یادآوری حافظه در تست EPM و نیز بروز اختلال در به خاطرآوری یادگیری در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال گردید و این رویدادها با کاهش بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز در ناحیه هیپوکامپ همراه بود. در حالی که تجویز داخل بینی انسولین به طور چشمگیری باعث افزایش توانایی یادگیری و حافظه و نیز افزایش بیان ژن‌های دخیل در نوروژنز در هیپوکامپ موش‌های تیمار شده با STZ گردید. در مجموع، این احتمال وجود دارد که انسولین با تعدیل فرآیند نوروژنز در هیپوکامپ موش‌های تیمار شده با STZ، موجب بهبود اختلالات شناختی در این حیوانات شده باشد. از این رو انسولین می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی امیدوار کننده در بیماری‌های تخریب نورونی نظیر آلزایمر مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه خوارزمی به جهت حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

References

1.Calsolaro V, Femminella GD, Rogani S, Esposito S, Franchi R, Okoye C, Rengo G, Monzani F. Behavioral and Psychological Symptoms in Dementia (BPSD) and the Use of Antipsychotics. Pharmaceuticals (Basel). 2021;14(3):246.

2.Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: selection of appropriate dose. J Alzheimers Dis. 2013;33(1):17-21.

3.Akhtar A, Dhaliwal J, Saroj P, Uniyal A, Bishnoi M, Sah SP. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV-STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer's-like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3β pathway. Inflammopharmacology. 2020;28(2):385-400.

4.Hoyer S, Lannert H. Long-term effects of corticosterone on behavior, oxidative and energy metabolism of parietotemporal cerebral cortex and hippocampus of rats: comparison to intracerebroventricular streptozotocin. J Neural Transm (Vienna). 2008;115(9):1241-9.

5.Chen Q, Nakajima A, Choi SH, Xiong X, Sisodia SS, Tang YP. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. Neurobiol Dis. 2008;29(2):316-26.

6.Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, et al. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. Hippocampus. 2009;19(12):1247-53.

7.Hollands C, Tobin MK, Hsu M, Musaraca K, Yu TS, Mishra R, et al. Depletion of adult neurogenesis exacerbates cognitive deficits in Alzheimer's disease by compromising hippocampal inhibition. Mol Neurodegener. 2017;12(1):64.

8.Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. J Comp Neurol. 2006;495(1):70-83.

9.Abbott LC, Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. Anat Histol Embryol. 2020 Jan;49(1):3-16.

10.Spinelli M, Fusco S, Grassi C. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. Front Neurosci. 2019;13:788.

11.Ferreira ST. Brain insulin, insulin-like growth factor 1 and glucagon-like peptide 1 signalling in Alzheimer's disease. J Neuroendocrinol. 2021;33(4):e12959.

12.Farzampour S, Majdi A, Sadigh-Eteghad S. Intranasal insulin treatment improves memory and learning in a rat amyloid-beta model of Alzheimer's disease. Physiol Int. 2016;103(3):344-53.

13.Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R. Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. Mol Neurobiol. 2017;54(8):6507-22.

14.Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. J Pharm Sci. 2010;99(4):1654-73.

15.Verma V, Singh D, Kh R. Sinapic Acid Alleviates Oxidative Stress and Neuro-Inflammatory Changes in Sporadic Model of Alzheimer's Disease in Rats. Brain Sci. 2020;10(12):923.

16.Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol. 2019;1916:99-103.

17.Sachdeva AK, Kuhad A, Tiwari V, Arora V, Chopra K. Protective effect of epigallocatechin gallate in murine water-immersion stress model of chronic fatigue syndrome. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;106(6):490-6.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]

18.Beirami E, Oryan S, Seyedhosseini Tamijani SM, Ahmadiani A, Dargahi L. Intranasal insulin treatment restores cognitive deficits and insulin signaling impairment induced by repeated methamphetamine exposure. J Cell Biochem. 2018;119(2):2345-55.

19.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

20.Dahl R, Mygind N. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. Adv Drug Deliv Rev. 1998;29(1-2):3-12.

21.Bassani TB, Bonato JM, Machado MMF, Cóppola-Segovia V, Moura ELR, Zanata SM, et al. Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. Mol Neurobiol. 2018;55(5):4280-96.

22.Bazrgar M, Khodabakhsh P, Dargahi L, Mohagheghi F, Ahmadiani A. MicroRNA modulation is a potential molecular mechanism for neuroprotective effects of intranasal insulin administration in amyloid βeta oligomer induced Alzheimer's like rat model. Exp Gerontol. 2022;164:111812.

23.Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, et al. Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. JAMA Neurol. 2020;77(9):1099-109.

24.Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. Life Sci. 2017;173:1-10.

25.Mishra SK, Singh S, Shukla S, Shukla R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. Neurochem Int. 2018;113:56-68.

26.López-Toledano MA, Shelanski ML. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). J Alzheimers Dis. 2007;12(3):229-40.

27.Gan L, Qiao S, Lan X, Chi L, Luo C, Lien L, et al. Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APPSw,Ind) mice. Neurobiol Dis. 2008;29(1):71-80.

28.Rohe M, Carlo AS, Breyhan H, Sporbert A, Militz D, Schmidt V, et al. Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis. J Biol Chem. 2008;283(21):14826-34.

29.Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. Diabetes. 2014;63(7):2232-43.

30.Okawa ER, Gupta MK, Kahraman S, Goli P, Sakaguchi M, Hu J, et al. Essential roles of insulin and IGF-1 receptors during embryonic lineage development. Mol Metab. 2021;47:101164.

31.Leuner B, Kozorovitskiy Y, Gross CG, Gould E. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(43):17169-73.

32.Ott V, Benedict C, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism. Diabetes Obes Metab. 2012;14(3):214-21.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.386]