

اثر بربرین کلراید بر قویت طولانی مدت (LTP) در شکنج دندانه دار موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

حمد کلالیان مقدم (PhD)*، توراندخت بلوج نژاد مجرد (PhD)**، مهرداد روغنی (PhD)**، مهدی خاکساری (PhD)**، عبدالعزیز رونقی (MSc)**، مهناز مصری پور علویجه (MSc)**

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهزاد

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه شاهد

۴- گروه فیزیولوژی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

دریافت: ۹۲/۰۳/۳۱، اصلاح: ۹۲/۰۶/۳۱، پذیرش: ۹۲/۰۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: بربرین، آلکالوئیدی ایزوکوئینولین می باشد که در مطالعات اخیر آثار ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی آن گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز بربرین بر شکنج دندانه دار موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بطور تصادفی به پنج گروه: کنترل، کنترل تیمار شده با بربرین (۱۰۰mg/kg)، دیابتی و دیابتی تیمار شده با بربرین (۵۰ و ۱۰۰mg/kg) تقسیم شدند. دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین با دوز ۵۵mg/kg، به صورت درون صفاقی القاء گردید. یک هفته پس از تزریق STZ با استرپتوزوتوسین، تیمار بربرین با دوز ۱۰۰mg/kg/day و ۵۰mg/kg/day هفت هفت به صورت خوارکی انجام گردید. قندخون در هفته های ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از تزریق با خون گیری از سیاهرگ دمی اندازه گیری شد. آزمون ماز Y به منظور بررسی اثر بربرین بر اختلال حافظه ای و یادگیری ناشی از دیابت استفاده گردید. جهت ارزیابی اثر بربرین بر شکنج دندانه دار موش های مسیر پروفورن-شکنج دندانه ای ضمن القاء تحریک الکتریکی با فرکانس ۲۰۰ هرتز در موش های صحرایی ثبت گردید و دامنه پتانسیل پس سیناپسی تحریکی (fEPSP) و نیز نقطه اوج دامنه (PS)، با نرم افزارهای مربوطه آنالیز گردید.

یافته ها: افزایش قندخون و کاهش وزن نمونه ها و حافظه فضایی کوتاه مدت در نمونه های دیابتی تحت درمان با بربرین، بهبود یافت ($P < 0.01$). دامنه PSLTP در گروه دیابتی (12 ± 12) در مقایسه با کنترل (92 ± 14) به طور معنی داری کاهش و در گروه دیابتی تحت درمان با بربرین (100 ± 10) در مقایسه با کنترل دیابتی (112 ± 12) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین شبیه fEPSP LTP در گروه دیابتی (121 ± 16) در مقایسه با کنترل (167 ± 11) به طور معنی داری کاهش و در گروه دیابتی تحت درمان با بربرین (100 ± 10) در مقایسه با کنترل دیابتی (147 ± 3) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که درمان با بربرین در روندی وابسته به دوز اختلال شناختی و الکترو فیزیولوژیکی را در موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بهبود می بخشد.

واژه های کلیدی: بربرین، دیابت، شکنج دندانه دار، یادگیری و حافظه، شکل پذیری سیناپسی.

مقدمه

منجر به تغییر ساختار پایانه های سیناپسی در ناحیه هیبو کامپ می شود از جمله: کاهش باز ارایی وزیکول های سیناپسی (۶)، تخلیه وزیکول های سیناپسی و کاهش تعداد دندریت نورون های رأسی ناحیه هیبو کامپ را می توان نام برد (۷) با این حال تاکنون، هیچ درمان مشخصی برای کنترل و یا پیشگیری از نوروپاتی دیابتی و اختلال های شناختی متعاقب آن در دسترس نمی باشد (۸). بربرین آلکالوئیدی

دیابت ملیتوس (DM) به شدت با اختلال های دز نرایی و عملکرد سیستم عصبی مرکزی همراه است (۱). شواهد نشان داده که پس از القای دیابت به تدریج اختلال در عملکرد شناختی و شکل پذیری سیناپسی در ناحیه شکنج دندانه دار هیبو کامپ ایجاد گردیده با مکانیسم های متعددی، آسیب های مغزی ایجاد می کند (۲-۵). نتایج مشابهی نیز نشان داده اند که القاء دیابت با استرپتوزوتوسین،

* مسئول مقاله: دکتر حمید کلالیان مقدم

ادرس: شاهزاد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۲۷۳-۳۳۹۵۰۵۴

گیری از سیاهه‌گ دمی انجام شد. به گروه‌های کنترل، معادل حجم دارو، نرمال سالین تزریق گردید. یک هفتنه پس از تزریق STZ، نمونه خون ناشتا پس از یک شب گرفته و غلظت گلوکز سرم با استفاده از روش اکسیداسیون گلوکز (ریست شیمی، تهران) اندازه‌گیری شد. فقط حیواناتی با میزان قند سرمی ناشتا بالاتر از ۲۵۰ mg/dl، به عنوان دیابتی برای آزمایش انتخاب شدند (۲۴). روزی که قند خون تأیید گردید، به عنوان روز صفر تعیین شد. یک هفتنه بعد از تزریق STZ، بربرین هیدرو کلرايد به صورت گاواز با دوز ۱۰۰ mg/kg/day و ۵۰ mg/kg/day دو روزه ۷ هفتنه‌ای تجویز شد. آزمون‌های رفتاری از جمله ماز Y در پایان مطالعه به شرح زیر انجام شد. وزن و قند گروه‌ها هر دو هفتنه یک بار اندازه‌گیری شد.

بررسی حافظه فضایی با استفاده از ماز Y: پس از پایان ۸ هفتنه دریافت دارو یا تحمل شرایط دیابت بدون دریافت دارو حافظه فضایی نمونه‌ها با استفاده از ماز Y مورد سنجش قرار گرفت. جنس ماز Y از پلکسی گلاس سیاه رنگ بود. طول و عرض و ارتفاع هر بازوی ماز Y، به ترتیب ۴۰ در ۱۵ در ۳۰ سانتی‌متر بود. هر سه بازو در مرکز یک صفحه مثلثی شکل متساوی الاصلاع با ابعاد ۱۵ سانتی‌متری، همگرا شده بودند. هر موش، در انتهای یک بازو قرار داده و در هر جلسه، به آن اجازه حرکت آزادانه به مدت ۸ دقیقه در طول بازوی هر ماز Y داده شد. زمانی ورود به بازو کامل محسوب می‌شد که انتهای دم حیوان به طور کامل در بازو قرار می‌گرفت. در پایان بازوهایی که حیوان به آن‌ها وارد شده بود، بدون احتساب بازوی شروع در توالی‌های سه تایی بدون تکرار دسته‌بندی گردید. تعداد تناوب واقعی منظور ورود به سه بازوی متوالی تحت عنوان مجموعه سه گانه و تعداد تناوب حداکثر یا احتمالی از رابطه (۲- تعداد کل بازوی های ورودی) و در نهایت نیز درصد تناوب از رابطه نسبت واقعی تناوب به نسبت تناوب حداکثر یا همان (۲- تعداد کل بازو ورودی) محاسبه شده است.

آزمایش‌های الکتروفیزیولوژیک: پس از ۸ هفتنه از القاء دیابت و درمان با بربرین، موش‌ها با اورتان (kg/1۵ g) بیهوش شده و سر حیوان را در دستگاه استریوتاکس ثابت کرده و مطابق با اطلس پاکسینوس نواحی مربوط به جایگاه الکترودهای تحریکی و ثبات عالمت گذاری شدند. درجه حرارت مقدیع ثبت گردیده و با بالشتکی برقی به طور خودکار حرارت بدن حیوانات در سطح $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ حفظ گردید. الکترودهای تحریکی و ثبات، دو قطبی از جنس فولاد ضد زنگ (با قطر ۱۲۵ میکرومتر) با پوشش تفلونی در یک نیمکره مغز قرار داده شدند. الکترود مرتعج یا غیر فعلی که در ناحیه پوست سر قرار گرفته و الکترود ثبات به دستگاه میکروالکترود آمپلی فایر و الکترود تحریکی به سیستم تحریک کننده متصل شد. الکترود تحریکی در مسیر پروفورانت با مختصات دورا: $V = 3-3.3$ mm، $L = 4.3$ mm، $AP = -8.1$ mm و الکترود ثبات در محل شکنج دندانه‌دار هیپوکامپا مختصات دورا: $V = 2.7-3.2$ mm، $L = 2.4$ mm، $AP = -3.8$ mm در لایه سلول‌های گرانوله قرار داده شد. با تحریک مسیر پروفورانت، پتانسیل‌های میدانی (Field Potential) از محل شکنج دندانه‌دار ثبت گردید (۲۸). برای تحریک آزمون (TS) موج‌های مربعی تک فاز، با پهنای 0.2 میلی ثانیه به مسیر پروفورانت جهت برانگیختن پتانسیل میدانی در ناحیه شکنج دندانه‌دار، به صورت 10 تحریک با فاصله زمانی 10 ثانیه (فرکانس 0.1 هertz) در هر بار ثبت، اعمال شد. بعد از تعیین حداکثر دامنه پتانسیل میدانی، شدتی که در آن اندازه دامنه معادل 40% دامنه حداکثر بود برایش TS رویت شده و به طور جداگانه، بر اساس رابطه Input Output Curve I/O (Input Output Curve) محاسبه شد.

ایزوکوئینولین است که از آن آثار ضد اضطرابی، ضد دردی، ضد التهابی، ضد افسردگی و ضد فراموشی گزارش شده است (۱۰-۱۲) در این راستا طی مطالعات بالینی و پیش بالینی در دیابت، آثار مفیدی از بربرین مشاهده شده است (۱۳-۱۶) به نظر مرسد این دارو موجب افزایش بیان انسولین، بازسازی سلول‌های β و افزایش پتانسیل آتنی اکسیدان سلول‌ها می‌شود (۱۷-۲۰).

همچنین گزارش شده که بربرین با مهار آنزیم استیل کولین استراز نقش مهمی در درمان الزایم و فراموشی دارد که با افزایش فعالیت‌های کولینزیک سیستم عصبی مرکزی مرتبط می‌باشد. گزارش‌های دیگری نشان داده که بربرین نقش مفیدی نیز بر سلامت و عملکرد سیستم عصبی و محافظت از نورون‌های مغزی در برابر عوامل تهاجمی ایفا می‌کند (۲۱-۲۳). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بربرین با افزایش بیوستر و انتشار کولین با مهار آنزیم استیل کولین می‌تواند نقش مهمی در درمان نوروپاتی‌های ناشی از دیابت ایفا کند (۲۴). مطالعات قبلی نشان داده که در سطح پایه، عملکرد فیزیولوژیکی سیستم عصبی را می‌توان با استفاده از ثبت پتانسیل‌های میدانی (f-EPSPs)، که میانگین پاسخ پس سیناپسی تعدادی از نورون‌های است، ارزیابی کرد (۲۵ و ۲۶). با این وجود، حتی بافت‌هایی که دارای EPSPf- قوی می‌باشند، ممکن است در عملکردهای فیزیولوژیکی پیچیده‌تر، مانند ایجاد LTP ناتوان باشند، لذا در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این آزمایش و آزمایش‌های مشابه به نظر مرسد برخلاف LTP، اندازه‌گیری شبیه EPSPf شاخص حساسی جهت ارزیابی اختلال‌های سیناپسی ناشی از نوروپاتی دیابتی نیست (۴ و ۲۷).

لذا با توجه به تمامی شواهد، در این پژوهش اثر تجویز خوارکی مزمن بربرین بر بهبود حافظه فضایی و اختلال‌های ایجاد شده در شکل پذیری سیناپسی در مدل تجربی دیابت القاء شده با استریوتوزوتوسین در مosh صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

جهت انجام این مطالعه تجربی از 40 سر مosh صحرایی نر، نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران، ایران) و وزن 225 تا 285 گرم استفاده گردید. نمونه‌ها به منظور انطباق با محیط، از یک هفتنه قبل از شروع آزمایش، در محیط آزمایشگاه با دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت $40-30\%$ و چرخه روش شناسی و تاریکی 12 ساعه قرار گرفته و به طور آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. قابل ذکر است که نکات اخلاقی در رابطه با نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمام مدت کار رعایت گردید.

موس‌های صحرایی به طور تصادفی به پنج گروه 10 تایی: کنترل، کنترل، تیمار شده با بربرین هیدرو کلرايد (100 mg/kg)، دیابتی، تیمار شده با بربرین هیدرو کلرايد (50 mg/kg) و دسته بندی شدند. داروهای به کار رفته در این آزمایش نیز شامل: بربرین هیدرو کلرايد و استریوتوزوتوسین بودند، که همگی از شرکت سیگما خریداری شدند. القای دیابت با تزریق درون صفاقی استریوتوزوتوسین (ip) 55 mg/kg حل شده در بافر سدیم سیترات $M = 0.05M$ و $pH = ۴-۴$ انجام شد. به منظور کاهش مرگ و میر ناشی از شوک قند خون، در مosh های صحرایی پس از تزریق STZ، 24 ساعت از محلول گلوکز 5% به جای آب استفاده شد. 22 ساعت بعد از تزریق STZ، سنجش قند خون از طریق خون-

یافته‌ها

این مطالعه نشان داد که در حیوانات دیابتی دامنه پتانسیل تجمعي و شبیب پتانسیل میدانی پس از تحریک با فرکانس بالا در گروه مبتلا به دیابت کاهش می یابد و در گروههای دیابتی تحت درمان با برین در یک روند وابسته به دوز افزایش می یابد. وزن گروه کنترل دیابتی در سومین هفته به میزان قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P<0.001$). همچنین، در هفته پنجم بعد از تزریق STZ، وزن بدن حیوانات در گروههای دیابتی تحت درمان با بربرین 50 mg/kg و 100 mg/kg به میزان قابل توجهی نسبت به گروه دیابتی افزایش یافت ($P<0.001$ و $P<0.05$) (نمودار ۱).

میزان قند خون در موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.001$) و همچنین درمان مزمن با بربرین 50 mg/kg و 100 mg/kg به مدت ۷ هفته کاهش معنی‌داری در قندخون حیوانات در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ایجاد نمود ($P<0.01$). علاوه بر این، موش‌های صحرایی گروه کنترل تحت تیمار با دارو (100 mg/kg) وزن و قند خون نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (نمودار ۲).

بررسی حافظه فضایی با استفاده از ماز Y: نتایج رفتاری آزمون ماز Y نشان داد که درصد تناوب می‌تواند شاخصی از حافظه کوتاه مدت فضایی از نوع باز شناختی باشد که در حیوانات دیابتی (51 ± 4) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل (76 ± 6) بوده ($P<0.01$) و در گروههای دیابتی تحت درمان با بربرین 100 mg/kg (73 ± 3) نسبت به گروه دیابتی (51 ± 4) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$). در این خصوص، تجویز بربرین به گروه کنترل (73 ± 5) تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۳).

آزمایش‌های الکتروفیزیولوژیک: بررسی تأثیر دیابت بر روند LTP و حفظ آن با استفاده از میار دامنه پتانسیل‌های تجمعي (PS-LTP) نشان داد که میانگین دامنه PS-LTP پس از تحریک کرازی در گروه دیابتی (112 ± 12) در مقایسه با گروه کنترل (192 ± 14) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.01$). میانگین دامنه در گروه دیابتی تحت درمان با بربرین (100 mg/kg) (192 ± 10) در مقایسه با گروه دیابتی (112 ± 12) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0.01$).

از طرف دیگر، در گروه دیابتی تحت درمان با بربرین (100 mg/kg) (192 ± 10), پس از تحریک کرازی، افزایش قابل توجهی در دامنه PS مشاهده شد ($P<0.001$). همچنین تفاوت قابل توجهی بین گروه دیابتی تحت درمان با دوز 50 mg/kg در مقایسه با گروه دیابتی (126 ± 9) مشاهده نگردید (نمودار ۴).

بررسی نتایج تأثیر دیابت بر روند القای (LTP) و حفظ آن، با استفاده از میار شبیب پتانسیل پس سینپاپسی (fEPSP-LTP) نشان داد که میانگین شبیب fEPSP-LTP در گروه دیابتی تحت درمان با بربرین (100 mg/kg) (147 ± 3) در مقایسه با گروه دیابتی (121 ± 6) به طور معنی‌داری افزایش داشته است.

همچنین میانگین شبیب fEPSP-LTP در گروه دیابتی (121 ± 6) در مقایسه با گروه کنترل (167 ± 11) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.01$) (شکل ۱). همچنین تفاوت معنی‌داری نیز بین گروه کنترل (167 ± 11) و گروه کنترل تحت درمان با دوز (100 mg/kg) (168 ± 10) مشاهده نگردید (نمودار ۵).

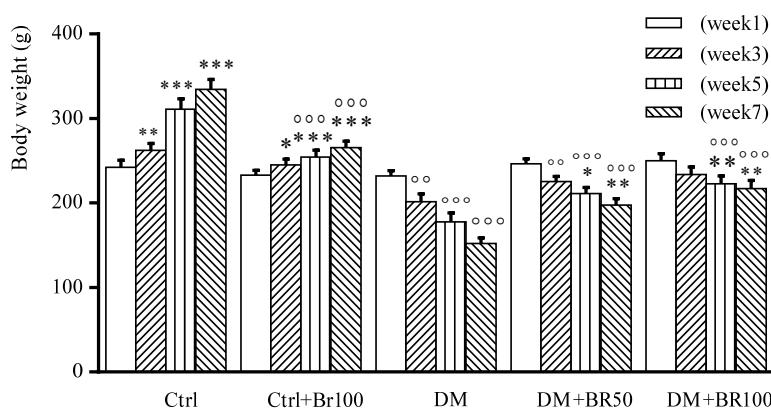
در مطالعه تحریک زوج (Paired Pulse) هر تحریک شامل دو موج مربعی تک فاز با فواصل تحریکی 30 ms و 50 ms میلی ثانیه در نظر گرفته شد (شکل ۳). پنهانی هر موج مربعی، 20 ms میلی ثانیه و فرکانس تحریک 1 Hz بود (10 Hz تحریک با فاصله 10 ms). شدت جریان تحریک زوج برای هر حیوان معادل همان شدت جریان تحریک آزمون بود. جهت محاسبه درصد شاخص تحریک زوج (PPI = $PS2/PS1 \times 100$) (PPI: Paired Pulse Index) استفاده شد که

$(PS_1 \times 100) / PS_2$ = شاخص تحریک زوج

در تحریک کرازی (High Frequency Stimulus, HFS) جهت القای LTP از الگوی تحریک 200 ms هرتز استفاده شد و 10 ms قطار تحریک با فواصل 10 ms به مسیر پروفورانت اعمال گردید. هر یک از قطارها، در برگیرنده 15 ms موج تحریک با پنهانی 0.2 ms میلی ثانیه و فرکانس 200 Hz بود. شدت تحریک استفاده شده، جهت القای LTP، معادل 80 ms درصد شدت حداکثر بود که بر اساس رابطه I/O بدست می‌آمد. در نظر گرفته شد.

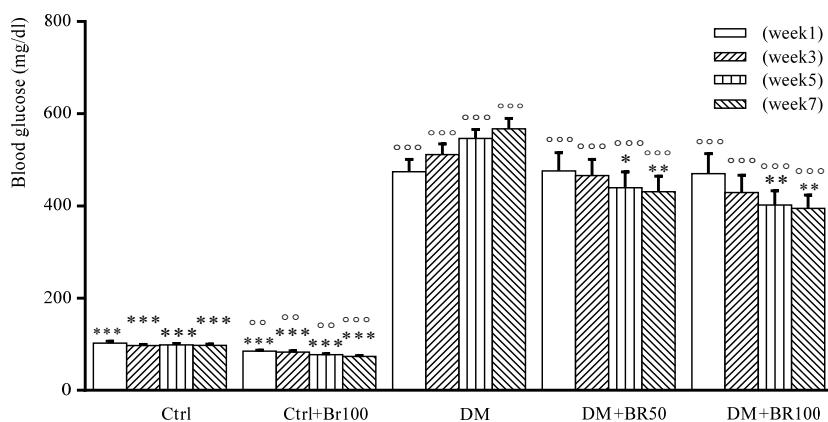
معیار القای LTP در مطالعات مختلف تا حدی متفاوت بیان شده است. معیار در این مطالعه برای القاء LTP شامل افزایش $\geq 10\%$ در شبیب و EPSP و دامنه PS بود (۲۹). توان پتانسیل برانگیخته میدانی با کمک شبیب EPSP و دامنه پتانسیل تجمعي (PS) ارزیابی شد. با تحریک مسیر پروفورانت، پتانسیلهای برانگیخته میدانی از ناحیه شکنج دندانه ای ثبت گردید. در این مطالعه، در شروع آزمایش، مسیر پروفورانت با تک موجهای مربعی تک فاز با پنهانی 0.2 ms میلی ثانیه و با فواصل 10 ms تحریک می‌شدند. دستور تحریک بعد از تعریف در برنامه نرم افزاری، به قسمت Data Acquisition ارسال و بعد از گذشتن از ایزولاتور، توسط الکترود دو قطبی به مسیر پروفورانت اعمال می‌گردید (شکل ۳-۵). برای رسیدن به ثبت مطلوب و پایدار از ناحیه شکنج دندانه ای، گاهی ضرورت داشت جای الکترود تحریکی و ثبات چندین بار عوض شود تا بهترین نقاط تحریک و ثبت حاصل گردد. برای به حداقل رساندن ترومما به بافت مغز، الکترودها با سرعت کم جابجا شدند. پس از پایدار شدن پاسخ سینپاپسی، جهت محاسبه شدت جریان مورد نیاز برای TS, PP و I/O ابتدا رابطه I/O برای هر حیوان بدست آمد. به این ترتیب که، مسیر پروفورانت با شدتها 100 ms میکروآمپر، تحریک و پاسخ برانگیخته میدانی ثبت گردید. بعد از تعیین حداکثر دامنه پتانسیل میدانی، شدتی که در آن اندازه دامنه معادل 40 ms درصد دامنه حداکثر بود برای ثبت TS و PP و 80 ms درصد آن به عنوان شدت جریان HFS در نظر گرفته شد. آنچه در مورد محاسبه رابطه I/O بیان شد، در مورد هر یک از حیوانات بی هوش در همان روز ثبت انجام شد. پاسخ بر انگیخته شده توسط TS و PP بعد از تقویت ($gain=1000$) و فیلتر شدن (باند عبور: 1 Hz تا 10 kHz) با فرکانس 10 kHz هرتز نمونه برداری و در کامپیوتر ذخیره گردید. تجزیه و تحلیل به صورت off line بر روی پاسخهای ذخیره شده انجام گرفت.

برای داده‌های الکتروفیزیولوژیکی، از آزمون Repeated Measure Two-Way ANOVA، برای ارزیابی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون PRISM استفاده شد. داده‌ها با نرم افزار آماری Mann-Whitney و Kruskal-Wallis تجزیه و تحلیل شدند و $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.



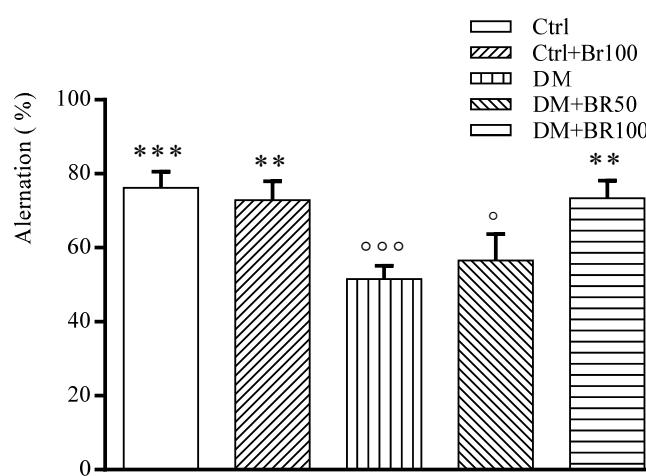
نمودار ۱. مقایسه وزن بدن حیوانات در هفته اول، سوم، پنجم و هفتم.

تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی در سطح ($P<0.05$) را با * و در سطح ($P<0.01$) را با ** و تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح ($P<0.001$) را با *** و در سطح ($P<0.0001$) را با **** نشان داده شده است.



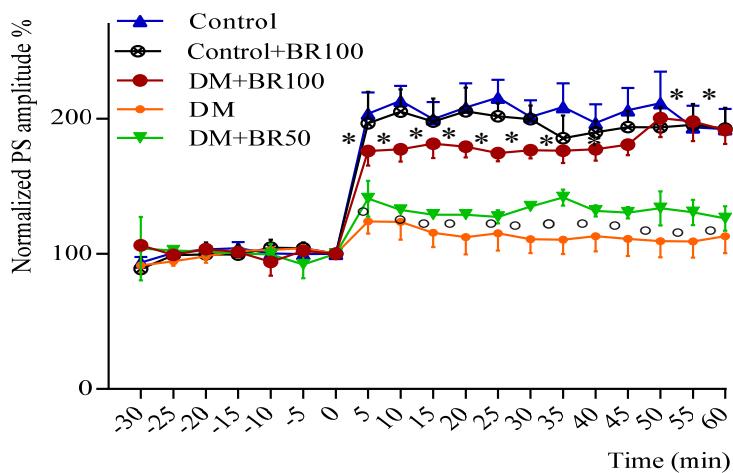
نمودار ۲. مقایسه قند خون حیوانات در هفته اول، سوم، پنجم و هفتم.

تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی در سطح ($P<0.05$) را با * و در سطح ($P<0.01$) را با ** و در سطح ($P<0.001$) را با *** و تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح ($P<0.0001$) را با **** نشان داده شده است.



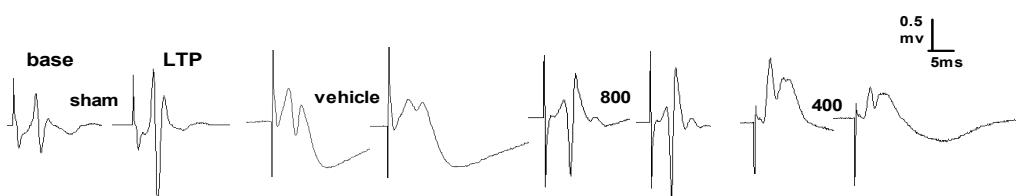
نمودار ۳. مقایسه درصد تابوب حیوانات، ۸ هفته پس از القای دیابت در گروه‌های مختلف با آزمون ماز-Y.

نتایج به صورت (میانگین ± انحراف معیار) بیان شده است. تفاوت معنی‌دار با گروه دیابتی در سطح ($P<0.01$) را با ** و در سطح ($P<0.001$) را با *** و تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح ($P<0.05$) را با ○ و در سطح ($P<0.01$) را با ○○ و در سطح ($P<0.001$) را با ○○○ نشان داده شده است.

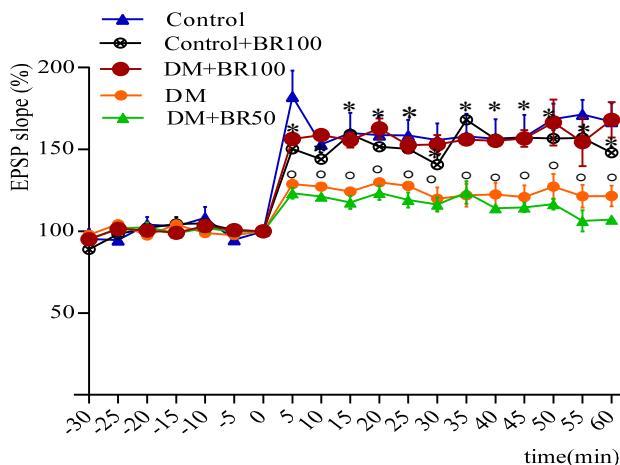


نمودار ۴. مقایسه میانگین دامنه پتانسیل‌های تجمعی (PS-LTP) بین گروه‌های مختلف.

در این شکل ثبت LTP به مدت ۶۰ دقیقه متعاقب HFS نشان داده شده است. هر ثبت میانگینی از ۱۰ ثبت متوالی در طی ۱۰۰ ثانیه با فواصل ۱۰ میلی ثانیه‌ای است.



شکل ۱. پتانسیل‌های پس‌سیناپسی بین گروه‌های مختلف.



نمودار ۵ مقایسه میانگین شب پتانسیل‌های پس‌سیناپسی بین گروه‌های مختلف.

ثبت LTP به مدت ۶۰ دقیقه متعاقب HFS نشان داده شده است. هر ثبت میانگینی از ۱۰ ثبت متوالی در طی ۱۰۰ ثانیه با فواصل ۱۰ ثانیه ای است.

درمان با بربرین (100 mg/kg) به دست آمد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و دیابتی تحت درمان (100 mg/kg) از نظر القاء LTP و ابقای آندرناجیه شکنج دندانه‌دار وجود ندارد. همچنین درمان مزمن با بربرین، افزایش قابل‌توجهی در بهبود اختلال‌های رفتاری ناشی از دیابت در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ایجاد نمود. بربرین آلکالوئیدی ایزوکوئینولین است که به عنوان یک داروی خوراکی سالیان متمادی در چین استفاده گردیده و آثار

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که دیابت قادر است به طور معنی‌داری شکل-پذیری سیناپسی را در نورون‌های ناحیه شکنج دندانه‌دار مختل کند و درمان با بربرین به ویژه در دوز 100 mg/kg به طور معنی‌داری این اختلال در عملکرد سیناپسی و حافظه را بهبود می‌بخشد. این نتیجه گیری بر اساس کاهش شب PS-LTP و EPSP-LTP در گروه دیابتی و بهبود آن در گروه دیابتی تحت

با توجه به انتساب نتایج مطالعه حاضر با آثار آنتی اکسیدانی بربرین به نظر مرسد، بربرین پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش داده، به عنوان یک جمع کننده رادیکال های آزاد عمل نموده و با جلوگیری از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و استرس اکسیداتیو، از کاهش عملکرد شناختی هیپوکمپ ناشی از دیابت در موشهای صحرایی دیابتی جلوگیری کرده است (۴۰ و ۴۰). علاوه بر این، مطالعات قبلی نشان داده که بربرین با مهار فعلی آنزیماستیل کولیناستراز می‌تواند در مدل موشهای صحرایی مبتلا به آزالیم نقش مهمی در بهبود اختلال های حافظه ای ایفا کند (۱۵ و ۲۳). همچنین بربرین با مهار سیکلوکسیتاناز (COX2) (دارای خواص ضدالتهابی است، به تازگی مشخص شده که مهار کننده‌های COX2 به سبب ویژگی ضد التهابی دارای نقش حفاظت نورونی می‌باشد (۴۱ و ۴۰)، لذا تصور می‌شود که بربرین ممکن است به سبب توانایی در مهار بیان سیکلوکسیتاناز و در نتیجه کاهش تولید پروستاگلاندین‌های مختلف از جمله PGE2 در درمان اختلال های عصبی مفید واقع شود (۴۰ و ۴۲). همچنین مشخص شده که در مراحل اولیه القای دیابت با STZ، با افزایش غلظت خارج سلولی گلوتامات در مغز آثار نورو توکسیک ایجاد می شود (۴۳ و ۴۴)، از سوی دیگر یو و همکاران نشان دادند که بربرین در نورون‌های هیپوکامپ موشهای صحرایی دیابتی، سمیت سلولی ناشی از NMDA را در قشر مغز کاهش می‌دهد (۴۵ و ۴۱).

براساس پژوهش های دیگری مشخص شده که گیرنده‌های GLP-1 دارای خواص مشابه فاکتور رشد بوده، نقش مؤثری در اختلال عملکرد شناختی، یادگیری ناشی از دیابت ایفا می‌کنند. GLP-1 با تعدیل انتقال سیناپسی، ایجاد می‌شود (۴۵). همچنین نتایج دیگری نشان دادند که آسیب‌های مغزی ناشی از دیابت توسط فرایندی چندعاملی کنترل می‌شود (۳۴). در این راستا، LTP را نیز افزایش می‌دهد. همچنین GLP-1 از طریق تعديل رهایش انتقال دهنده‌های عصبی می‌تواند بر فعلیت نورون‌ها تأثیر گذارد (۴۶ و ۴۷). در مطالعه دیگری نشان شده که تزریق GLP-1 میزان شلیک خودبخودی نورون‌ها را در هیپوکامپ به شدت افزایش می‌دهد (۴۸). در برخی از پژوهش‌ها مشخص شده که GLP-1 نه تنها بطور مستقیم در آزاد شدن انتقال دهنده‌های عصبی و تشکیل LTP مداخله می‌کند بلکه سیناپس‌ها را در برابر آثار مضر عقطات بتامیلوبنید نیز محافظت می‌کند (۴۹ و ۵۰) از آنجایی که بربرین آزاد شدن GLP-1 و بیوسترن آن را در حیوانات دیابتی افزایش می‌دهد (۴۵ و ۵۲) به نظر مرسد بربرین می‌تواند اختلال عملکرد شناختی ناشی از دیابت را از طریق تعديل گیرنده GLP-1 بهبود بخشد. لذا به نظر می‌رسد بربرین اثر محافظتی خود بر عملکرد حافظه در آزمون مازا، به عنوان شاخص پلاستیته کوتاه مدت و بهبود القای LTP به عنوان شاخص حافظه ای باشد. این اثر محافظتی فوق وساحت می‌کند. در این راستا برای اولین بار، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بازسازی LTP هیپوکامپ می‌تواند یکی از مکانیسم‌هایی باشد که بوسیله آن بربرین عملکرد شناختی و عصبی را در بیماران دیابتی بهبود بخشد. اگرچه برای روشن شدن مکانیسم دقیقاً انجام آزمایش‌های تکمیلی بیشتری ضرورت می‌یابد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات خانم نوروزی مسئول آزمایشگاه دانشکده بهداشت شهرهود، خانم داوردوست و خانم فضلی کارشناسان محترم آزمایشگاه دانشکده بهداشت شاهرود، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ضد اضطرابی، ضد دردی، ضد التهابی، ضد افسردگی و ضد فراموشی آن گزارش شده است (۱۰-۱۲). از آن جا که 100 mg/kg/day و 50 mg/kg/day و نحوه تجویز گواه به مصرف بالینی دارو نزدیکتر بوده و نسبت به تزریق سیاهگی و یا درون صفاتی غیربهجاگی‌تر است برای مطالعه روی تغییرات شکل‌پذیری سیناپسی، در نظر گرفته شد (۱۰ و ۱۲ و ۲۳). علاوه بر این، درمان مزمن با بربرین (100 mg/kg) (۵۰) منجر به کاهش سطح گلوكز خون، و افزایش وزن بدن در موشهای صحرایی دیابتی گردید که این نتایج مشابه سایر پژوهش‌ها در این زمینه است (۳۱ و ۳۰ و ۲۰ و ۱۸). نورون‌های موجود در هیپوکامپ نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارند و نقش شکنجه دندانه‌ای بعنوان مسیر ورود پیام‌ها به هیپوکامپ حائز اهمیت است (۳۲ و ۳۳). پیام عصبی از کورتکس انتورینال به ترتیب وارد سلول‌های گرانولی شکنجه دندانه‌دار، لایه پیرامیدال ناحیه CA3 و سپس لایه پیرامیدال CA1 و در انتهای وارد سایکولوم شده و مجدداً به کورتکس انتورینال وارد می‌شود. مطالعات نشان داده است که تغییرات سیناپسی کوتاه مدت و بلند مدت در این مدارها عامل اصلی ایجاد رگه‌های حافظه در هیپوکامپ محسوب می‌شوند. در صورتیکه سلول‌های گرانولی شکنجه دندانه‌دار قادر به تولید پتانسیل عمل نباشند پیام‌ها قادر به ورود به مسیرهای هیپوکامپ نبوده و حافظه مختل می‌شود.

دیابت ملیوتوبه شدت با اختلال های عملکردی در سیستم اعصاب مرکزی همراه است (۱). شواهد متعددی نشان داده است که پس از القاء دیابت به تدریج اختلال عملکرد شناختی و شکل‌پذیری سیناپسی در شکنجه دندانه‌دار هیپوکامپ ظاهر می‌شود (۴۵). همچنین نتایج دیگری نشان دادند که آسیب‌های مغزی ناشی از دیابت توسط فرایندی چندعاملی کنترل می‌شود (۳۴). در این راستا، LTP توسط محققین زیادی، به عنوان یک مکانیسم سیناپسی مهم برای ارزیابی طولانی مدت شکل‌پذیری سیناپسی در جوندگان در نظر گرفته شده است. در حقیقت تقویت انتقال سیناپسی بعد از تحریک کزاوی است که در نتیجه شکل‌پذیری سیناپسی ایجاد می‌شود و در سطح کورتکس و زیر کورتکس به عنوان مکانیسم پایه سلولی برای حافظه و یادگیری محسوب می‌شود (۳۵ و ۳۶). به عبارت دیگر، LTP افزایش طولانی مدت در قدرت سیناپسی است (۳۳) که از طریق مشارکت در شکل‌پذیری سیناپسی با یادگیری و حافظه مرتبط است (۲۶ و ۲۷) و حداقل یک گروه از محققین، به طور مستقیم، واستگی LTP را با حافظه فضایی نشان دادند (۳۷). لذا در شرایط آزمایشگاهی با تحریک با فرکانس بالا (بیشتر از ۱۰۰ هرتز) و به دنبال آن ثبت LTP به خوبی می‌توان حافظه طولانی مدت را ارزیابی کرد (۵). نتایج این مطالعه نشان داد که در حیوانات دیابتی دامنه پتانسیل تجمیعی و شبیه پتانسیل میدانی پس از تحریک با فرکانس بالا در گروه مبتلا به دیابت کاهش می‌یابد و در گروه‌های دیابتی تحت درمان با برین در یک روند وابسته به دوز افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، در حیوانات دیابتی، بعد از تحریک با فرکانس بالا، شبیه fEPSP و دامنه PS به طور معنی‌داری مهار می‌شود. لذا با توجه به زنده بودن سلول‌های گرانولی، این اختلال در انتقال شکل‌پذیری سیناپسی ممکن است به دلیل مختل شدن عملکرد سیناپس‌های این منطقه باشد که منطبق بر مطالعات قبلی در این زمینه است (۳۸). اگرچه تعدادی از تحقیقات بالینی و پیش بالینی اثمار مفید بربرین در کاهش عوارض ناشی از دیابت را نشان داده اند فرضیه‌های ذیل در خصوص نقش بربرین در پیشگیری از اختلال عملکرد شناختی ناشی از دیابت محتمل به نظر می‌رسد که با نتایج بدست آمده در این پژوهش هم‌خوانی داشته و مؤید آن است (۱۷ و ۳۱).

Effect of Berberine Chloride on Long Term Potentiation (LTP) at Dentate Gyrus in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats

H. Kalalian Moghaddam (PhD)^{1*}, T. Baluchnejadmojarad (PhD)², M. Roghani (PhD)³, M. Khaksari (PhD)¹,
 A. Ronaghi (MSc)⁴, M. Mesripour Alavijeh (MSc)⁵

1. Department of Physiology, School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

2. Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

4. Department of Physiology, School of Paramedical Science, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Department of Physiology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Damghan, Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(6); Jun 2014; pp: 33-42

Received: Jun 21st 2013, Revised: Sep 22nd 2013, Accepted: Jan 5th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Berberine, an isoquinoline alkaloid is reported to exhibit an anti-diabetic and antioxidant effect. Thus, this research study was conducted, for the first time, to evaluate the effect of berberine on synaptic plasticity at dentate gyrus (DG) of streptozotocin- induced diabetic rats.

METHODS: In this study, the male Wistar rats (n=40) were randomly allocated into five groups: control, control berberine-treated (100mg/kg), diabetic, berberine-treated diabetic (50, 100mg/kg) groups. Diabetes was induced intraperitoneally administration at the dose of 55mg/kg. Berberine was orally administered at doses of 50 and 100mg/kg/day one week after STZ injection for a period of 7 weeks. Blood samples were taken from the tail vein 1, 3, 5, 7 weeks after STZ injection to measure blood glucose levels and Y maze task and passive avoidance test were used for assessment of learning and memory deficiency. Moreover electrophysiological evaluation including: field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) and Long-term potentiation (LTP) in perforate path-DG synapses was assessed in order to investigate the effect of berberine on synaptic plasticity. Field excitatory post-synaptic potential (fEPSP) slope and population spike (PS) amplitude were also measured.

FINDINGS: Increased blood glucose, reduced weight and short-term spatial memory in diabetic rats treated with berberine were improved ($p<0.01$). With respect to the control group (192±14), PS amplitude was significantly decreased in the diabetes group (112±12). In comparison to control group (112±12), chronic treatment with berberine (100mg/kg) (192±10) improved PS amplitude ($p<0.05$). In addition fEPSP amplitude was significantly decreased in the diabetes group (121±6) in comparison to control group (167±11). In comparison to control group (152±6), chronic treatment with berberine (100mg/kg) (147±3) improved fEPSP amplitude ($p<0.05$).

CONCLUSION: This study showed that berberine treatment in dose dependent manner ameliorates memory impairment and improves synaptic plasticity in STZ diabetic rats.

KEY WORDS: Berberine, Diabetes, Dentate gyrus, Learning and memory, Synaptic plasticity.

Please cite this article as follows:

Kalalian Moghaddam H, Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Khaksari M, Ronaghi A, Mesripour Alavijeh M. Effect of berberine chloride on long term potentiation (LTP) at dentate gyrus in streptozotocin- induced diabetic rats. J Babol Univ Med Sci 2014;16(6):33-42.

* Corresponding Author; H. Kalalian Moghaddam (PhD)

Address: Department of Physiology, School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

Tel: + 98 273 3395054

E-mail: h.kalalian@gmail.com

References

- 1.Northam EA, Rankins D, Lin A, et al. Central nervous system function in youth with type 1 diabetes 12 years after disease onset. *Diabetes Care* 2009;32(3):445-50.
- 2.Tesfaye S. Neuropathy in diabetes. *Medicine* 2010;38(12):649-55.
- 3.Artola A. Diabetes, stress and ageing related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex the same metaplastic process?" *Eur J Pharmacol* 2008;585(1):153-62.
- 4.Reisi P, Babri S, Alaei H, Sharifi MR, Mohaddes G, Lashgari R. Effects of treadmill running on short-term pre-synaptic plasticity at dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 2008;1211:30-6.
- 5.Reisi P, Babri S, Alaei H, et al. Treadmill running improves long-term potentiation (LTP) defects in streptozotocin-induced diabetes at dentate gyrus in rats. *Pathophysiology* 2010;17(1):33-8.
- 6.Magarinos AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(25):14002-8.
- 7.Reagan LP, Magarinos AM, Yee DK, et al. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res* 2000;862(1-2):292-300.
- 8.Trudeau F, Gagnon S, Massicotte G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1-3):177-86.
- 9.Biessels GJ, Kerssen A, de Haan EH, Kappelle LJ. Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care. *Prim Care Diabetes* 2007;1(4):187-93.
- 10.Imanshahidi M, Hosseini Zadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine." *Phytother Res* 2008;22(8):999-1012.
- 11.Kulkarni SK, Dhir A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride. *Eur J Pharmacol* 2008;589(1-3):163-72.
- 12.Kulkarni SK, Dhir A. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res* 2010;24(3):317-24.
- 13.Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. "Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 2006;55(8):2256-64.
- 14.Gu Y, Zhang Y, Shi X, et al. Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabolomics. *Talanta* 2010;81(3):766-72.
- 15.Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behav Brain Res* 2011;220(1):30-41.
- 16.Cok A, Plaisier C, Salie MJ, Oram DS, Chenge J, Louters LL. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1. *Biochimie* 2011 93(7): 1187-1192.
- 17.Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2008;57(5):712-17.
- 18.Zhang YF, Li XY, Zou D, et al. Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(7):2559-65.
- 19.Kong WJ, Zhang H, Song DQ, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism* 2009;58(1):109-19.
- 20.Zhou JY, Zhou SW, Tang J, et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009;606(1-3):262-8.
- 21.Huang L, Shi A, He F, Li X. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2010;18(3):1244-51.

- 22.Yoo JH, Yang EM, Cho JH, et al. Inhibitory effects of berberine against morphine-induced locomotor sensitization and analgesic tolerance in mice. *Neuroscience* 2006;142(4): 953-61.
- 23.Zhu FQ, Qian CY. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 2006;7:78.
- 24.Yu Y, Liu L, Wang X, et al. Modulation of glucagon-like peptide-1 release by berberine: in vivo and in vitro studies. *Biochem Pharmacol* 2010;79(7):1000-6.
- 25.Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006;129(Pt 7):1659-73.
- 26.Raymond CR. Different requirements for action potentials in the induction of different forms of long-term potentiation. *J Physiol* 2008;586(7):1859-65.
- 27.Raymond CR. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the long in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 2007;30(4):167-75.
- 28.Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press 2005; p: 83.
- 29.Taube JS, Schwartzkroin P. Mechanisms of long-term potentiation: a current-source density analysis. *J Neurosci* 1988;8(5):1645-55.
- 30.Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(4):496-502.
- 31.Tang LQ, Wei W, Chen LM, Liu S. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. *J Ethnopharmacol* 2006. 108(1): 109-115.
- 32.Aoyagi A, Saito H, Abe K, Nishiyama N. Early impairment and late recovery of synaptic transmission in the rat dentate gyrus following transient forebrain ischemia in vivo. *Brain Res* 1998;799(1):130-7.
- 33.Katsuta K, Umemura K, Ueyama N, Matsuoka N. Pharmacological evidence for a correlation between hippocampal CA1 cell damage and hyperlocomotion following global cerebral ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 2003;467(1-3):103-9.
- 34.Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001;44(11):1973-88.
- 35.Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361(6407):31-9.
- 36.Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH, Ramakers GM. Synaptic transmission changes in the pyramidal cells of the hippocampus in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Brain Res* 2006;1073-4: 276-80.
- 37.Tang YP, Shimizu E, Dube GR, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999;401(6748):63-9.
- 38.Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000;23(11): 542-9.
- 39.Ye L, Wang F, et al. Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 2011;1411:57-64.
- 40.Dhir A, Naidu PS, Kulkarni JK. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazole (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. *Seizure* 2007;16(8):691-7.
- 41.Yoo HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kim K, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of Saururus chinensis extract. *J Ethnopharmacol* 2008;120(2):282-6.

42. Shin S, Jeon JH, Park D, et al. Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of Angelica gigas in a Carrageenan-air pouch inflammation model. *Exp Anim* 2009;58(4):431-6.
43. Guyot LL, Diaz FG, O'regan MH, Song D, Phillis JW. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery* 2001;48(2): 385-90; discussion 390-1.
44. Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci* 2002;16(6):1107-16.
45. Lee T, Heo H, Kim Kwon Y. Effect of berberine on cell survival in the developing rat brain damaged by mk-801. *Exp Neurobiol* 2010;19(3):140-5.
46. McClean PL, Gault VA, Harriott P, Holscher C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2010;630(1-3):158-62.
47. Holscher C. The role of GLP-1 in neuronal activity and neurodegeneration. *Vitam Horm* 2010;84:331-54.
48. Abbas T, Faivre E, Holscher C. Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2009;205(1): 265-71.
49. Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging* 2010;31(2):224-43.
50. Gault VA, Hölscher C. GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *Eur J Pharmacol* 2008;587(1-3):112-17.
51. LuSS, Yu YL, et al. Berberine promotes glucagon-like peptide-1 (7-36) amide secretion in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 2009;200(2):159-65.
52. Liu LZ, Cheung SC, Lan LL, et al. Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells. *Mol Cell Endocrinol* 2010;317(1-2):148-53.