



## The effects of nitric oxide production blockage by aminoguanidine on passive avoidance memory and expression of Bcl-2 family genes in diabetic rats

Maryam Arab Firouzjaei<sup>1</sup>, Mohammad Reza Jafari<sup>2</sup>, Iraj Jafari Anarkoli<sup>3</sup>, Mehdi Eskandari<sup>2</sup>, Mohsen Alipour<sup>2\*</sup>

1. Dept. of Physiology and Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2. Dept. of Physiology and Pharmacology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
3. Dept. of Anatomy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Received: 21 Nov 2013

Accepted: 2 Dec 2013

### Abstract

**Introduction:** Memory impairment is one of the complications of diabetes which may accompany with changes in expression of apoptotic and antiapoptotic genes. The aim of the present study was the evaluation of intra-hippocampal injection of aminoguanidine (AG), as an antioxidant and inducible nitric oxide synthase inhibitor, on passive avoidance memory and Bcl-2 family genes expression in diabetic rats.

**Methods:** Diabetes was induced in male rats using streptozotocin (STZ) (50 mg/kg, i.p). AG (10 and 90 µg/rat) was injected by intra-hippocampal implanted cannulae. Passive avoidance memory was assessed 7 weeks later. Then, animals were killed and hippocampus was removed. The expressions of Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Bax mRNA were measured using semi-quantitative RT-PCR technique.

**Results:** Diabetes caused significant impairment in passive avoidance memory. None of the AG doses improved the memory impairment. In diabetic rats, the levels of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> were decreased in hippocampus while the expression of Bax, Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-x<sub>L</sub> was increased. In comparison to diabetic control group, AG treatment increased the levels of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> but decreased Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-x<sub>L</sub>.

**Conclusion:** Although AG was not associated with the significant improvement of memory but it modified the expression of the apoptosis involved genes in hippocampus of STZ-induced diabetic rats.

**Key words:** Diabetes mellitus, aminoguanidine (AG), hippocampus, passive avoidance learning, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax

\* Corresponding author e-mail: alipourmohsen@yahoo.com  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## اثر بلوک تولید نیتریک اکساید در هیپوکمپ بر حافظه اجتنابی غیر فعال و بیان ژنهای خانواده Bcl-2 در نورون های هیپوکمپی موش صحرایی دیابتی

مریم عرب فیروزجائی<sup>۱</sup>، محمدرضا جعفری<sup>۲</sup>، ایرج جعفری انارکولی<sup>۳</sup>، مهدی اسکندری<sup>۲</sup>، محسن علیپور<sup>۳\*</sup>

۱. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل

۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳. گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

پذیرش: ۱۱ آذر ۱۳۹۲

دریافت: ۳۱ آبان ۱۳۹۲

### چکیده

**مقدمه:** یکی از عوارض دیابت اختلال در یادگیری و حافظه توسط آسیب نورون های هیپوکمپ است که ممکن با تغییر در بیان ژنهای آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک همراه باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی تزریق داخل هیپوکمپی آمینوگوانیدین به عنوان یک آنتی اکسیدان و نیز مهار کننده انتخابی آنزیم نیتریک اکساید سینتاز القایی بر حافظه اجتنابی غیرفعال و بیان ژنهای خانواده Bcl-2 در موش های صحرایی نر دیابتی بود.

**روش ها:** موش های صحرایی با تزریق داخل صفاقی ۵۰ mg/kg استرپتوزوسین دیابتی شدند. آمینوگوانیدین (۹۰ و ۱۰ μg/rat) از طریق کانول های کاشته شده، به داخل هیپوکمپ تزریق گردید. ۷ هفته بعد، حافظه اجتنابی غیر فعال ارزیابی شد. سپس حیوانات کشته شدند، هیپوکمپ آنها جدا گردید و میزان بیان Bcl-2، Bcl-x1 و Bax ناحیه هیپوکامپ از طریق تکنیک RT-PCR نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** دیابت همراه با اختلال معنی دار در حافظه بود. آمینوگوانیدین با هیچکدام از دوز ها باعث بهبود معنی دار حافظه نشد. سطوح Bcl-2 و Bcl-x1 در هیپوکمپ حیوانات دیابتی کاهش یافت. در حالیکه بیان Bax و نسبت های Bax/Bcl-2 و Bax/Bcl-x1 افزایش نشان دادند. درمان با آمینوگوانیدین باعث افزایش سطوح Bcl-2 و Bcl-x1 و نیز کاهش نسبت های Bax/Bcl-2 و Bax/Bcl-x1 در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد.

**نتیجه گیری:** هر چند آمینوگوانیدین باعث بهبود معنا دار حافظه در موش صحرایی دیابتی نشد، اما موجب تغییرات بیان ژن های دخیل در آپوپتوز در ناحیه هیپوکمپ موش های صحرایی دیابتی توسط استرپتوزوسین گردید.

واژه های کلیدی: دیابت ملیتوس، آمینوگوانیدین، هیپوکمپ، یادگیری اجتنابی غیرفعال، Bcl-2، Bcl-x1، Bax

### مقدمه

انسولین همراه با کاهش ترشح انسولین از سلول های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع ۲) باشد [۲۰، ۴۸] رشد این بیماری از سال ۱۹۸۵ گسترش چشمگیری داشته و تا سال ۲۰۱۱ تعداد افراد مبتلا، به ۳۴۷ میلیون نفر رسیده است [۳۳، ۶].

دیابت هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی را از طریق افزایش میزان آپوپتوز سلول های عصبی گرفتار می کند، افزایش قند خون ناشی از دیابت، عوارض میکروواسکولار

دیابت قندی شایع ترین اختلال متابولیک همراه با افزایش قند خون در انسان می باشد. دیابت می تواند ناشی از فقدان انسولین (دیابت نوع یک) یا مقاومت بافت های محیطی به

\* نویسنده مسئول مکاتبات: alipourmohsen@yahoo.com

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

شددیدی نظیر نوروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی ایجاد می کند. شایعترین عوارض دیابت، نوروپاتی های دیابتی هستند که اختلالات سیستم عصبی اتونوم و سیستم عصبی ارادی را به همراه دارند [۴۶]. اختلالات شناختی ناشی از آسیب نورون های هیپوکمپ نیز از دیگر عوارض دیابت است، به علاوه نقص در اعمال شناختی در افراد دیابتی شایعتر از افراد غیر دیابتی گزارش شده است [۲۸-۲۹، ۳۲].

هیپوکامپ به عنوان یک مرکز مهم در یادگیری و حافظه، نسبت به افزایش قند خون حساس می باشد و نورون های آن در دیابت نوع ۱ فوق العاده آسیب پذیر هستند [۴۰-۴۱]. هر چند مکانیسم های تخریب سلول های عصبی، ناشی از دیابت در هیپوکمپ کاملاً مشخص نگردیده است اما تحقیقات نشان داده اند که آتروفی دندریتی، تنظیم کاهش گیرنده های گلوکوکورتیکوئید، تغییر بیان گیرنده های فاکتور رشد شبه انسولینی، کاهش انتقال دهنده های گلوکز و القای آپوپتوز می توانند در این امر دخیل باشند [۴۷]. نتایج مطالعات قبلی بیانگر تأثیرات متفاوت آمینوگوانیدین در مدل های مختلف ارزیابی حافظه بوده است [۱۵، ۲۱، ۴۴-۴۵].

آپوپتوز یک نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده است که در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف نقش داشته و با خصوصیات مورفولوژیک نظیر چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته، تورم غشاء سلول و قطعه قطعه شدن DNA نوکلئوزومی مشخص می گردد [۲۳]. به رغم کثرت عوامل دخیل در فرآیند آپوپتوز، عناصر کلیدی آن را می توان به دو گروه محدود نمود که شامل کاسپازها و پروتئین های خانواده Bcl-2 می باشند [۴۳]. دو گروه از پروتئین های تنظیمی در خانواده Bcl-2 وجود دارد که دارای اثرات متضادی بر آپوپتوز هستند: گروهی آنتی آپوپتوتیک (Bcl-2, Bcl-xL) که سلولها را در مقابل برخی اشکال آپوپتوز محافظت می کنند در حالیکه گروهی دیگر پروآپوپتوتیک (Bax, Bcl-xS) که مرگ برنامه ریزی شده سلولی را به راه می اندازد [۱۷، ۲۵]. اما آنچه سرنوشت نهایی سلولها به سمت مرگ یا زندگی را مشخص می کند، نسبت بیان پروتئین های پروآپوپتوتیک به آنتی آپوپتوتیک می باشد [۴۹]. از طرف دیگر استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از علل اصلی تغییرات دژنراتیو مزمن در دیابت مطرح گردیده و نشان داده شده است که آنتی اکسیدان ها از

بروز برخی عوارض دیابت می کاهند [۲۴]. آمینوگوانیدین دارای اثرات بیولوژیک از قبیل مهار آنزیم آمین اکسیداز و نیتریک اکساید سینتاز القایی (iNOS)، مهار تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون و از بین برنده گونه های فعال اکسیژن می باشد. باید دانست که آمینوگوانیدین به عنوان یک آنتی اکسیدان به دلیل اثر مهاری آن در گلیکوزیلاسیون پروتئینها، دارای یک پتانسیل درمانی برای جلوگیری از عوارض بافتی مزمن ناشی از دیابت قندی و همچنین مشکلات مربوط به فرایند پیری می باشد [۱۱]. اخیراً خواص نوروپروتکتیو آمینوگوانیدین در تعدادی از مدل های تجربی سکتة مغزی و آسیب قشری در حیوانات مشخص شده است [۹، ۵۴].

نتایج مطالعات نشان می دهد آمینوگوانیدین با فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار iNOS سبب بهبود علائم نورولوژیکی و بافتی در موش های صحرایی دچار آسیب مغزی می شود [۴۳]. همچنین آمینوگوانیدین بر روی سمیت نورونی القاء شده توسط آهن و کلرید آلومینیوم در موش های صحرایی سبب محافظت نورون ها و بهبود حافظه و یادگیری آسیب دیده از سمیت القاء شده می شود [۵۱].

علاوه بر این، مطالعات محدود انجام شده نشان داده است که آمینوگوانیدین باعث کاهش آپوپتوز و مهار ژن Bax در ماست سل های موش های دیابتی گردیده است [۸]. با این حال تا جایی که بررسی های ما نشان می دهد، تاکنون مطالعه ای در خصوص اثرات آنتی اکسیدانی آمینوگوانیدین، در پیشگیری از آپوپتوز و بیان ژن های خانواده Bcl-2 در ناحیه هیپوکمپ و نیز تأثیر آن در اختلالات شناختی به ویژه حافظه در موش صحرایی دیابتیک منتشر نشده است، فرض می شود تزریق داخل هیپوکمپی آمینوگوانیدین در ناحیه CA1 هیپوکمپ، با مکانیسم مهار آنزیم iNOS و خاصیت آنتی اکسیدانی خود بتواند سبب کاهش آپوپتوز نورون های این ناحیه و بهبود یادگیری و حافظه در موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین شود. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات آمینوگوانیدین هیدروکلراید بر حافظه اجتهابی غیر فعال با استفاده از دستگاه شاتل باکس و همچنین نقش آن در پیشگیری از آپوپتوز ناحیه هیپوکمپ موش های صحرایی دیابتی نوع ۱ از طریق بررسی تغییرات میزان بیان ژنهای خانواده Bcl-2، انجام گرفت.

## مواد و روش ها

داخل صفاقی برای مطالعات ایسکمی ریپرفیوژن استفاده کرده‌اند، الگو برداری و پس از تبدیل انتخاب شده است.

بعد از کنترل و ثبت وزن، سطح گلوکز خون همه حیوانات از طریق ورید دمی و با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Bioname, UK) اندازه گیری شد. موش‌های صحرایی گروه های دیابتی پس از طی ۱۲ ساعت گرسنگی با یکبار تزریق داخل صفاقی (IP) داروی استرپتوزوسین (STZ) به مقدار ۵۰ mg/kg دیابتی گردیدند. جهت تزریق، استرپتوزوسین در بافر سیترات سدیم با pH ۴/۵ (10mmol/L) حل گردید. تزریق STZ در ساعت ۸ صبح و در شرایط ناشتا به موش‌های صحرایی گروه های مورد نظر (دیابتی) انجام گردید. سه روز (۷۲ ساعت) بعد از تزریق STZ، قند خون حیوانات گروه های دیابتی اندازه گیری و یادداشت گردید. ملاک برای دیابتی بودن موش های صحرایی قند خون بالای ۲۵۰ mg/dl در نظر گرفته شد، بنابراین موش های صحرایی که قند خون بالای ۲۵۰ mg/dl نداشتند از مطالعه حذف گردیدند. پس از اثبات دیابتی شدن در گروه های مورد نظر، حیوانات برای ادامه آزمایشات و تزریق به کار گرفته می‌شدند. تزریق داخل هیپوکامپی آمینوگوانیدین (AG) با استفاده از سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتری و به مقدار ۱ میکرولیتر محلول تزریقی (در هر طرف ۰/۵ میکرولیتر) در مدت ۶۰ ثانیه به هر حیوان انجام شد. برای اطمینان از انتشار کامل دارو به داخل ناحیه CA1 هیپوکامپ، کانول تزریق با تاخیر ۶۰ ثانیه ای پس از تزریق خارج گردید.

پس از گذشت ۷ هفته از دیابتی شدن موش های صحرایی، جهت ارزیابی یادگیری اجتنابی غیر فعال و حافظه، از دستگاه شاتل باکس (Shuttle Box) ۲۴ ساعت پس از آموزش استفاده شد. در این تست ۴ معیار برای سنجش یادگیری اجتنابی غیر فعال و حافظه ثبت گردید که عبارتند از:

- ۱- میزان تاخیر ورود به محفظه تاریک در مرحله یادگیری (Step-Through Latency in the acquisition trial)
- ۲- تعداد رفت و برگشت حیوان بین دو محفظه (Number of Trial)
- ۳- میزان تاخیر ورود به محفظه تاریک در زمان تست (Step-Through Latency in the Retention Trial)
- ۴- مدت زمان سپری شده در محفظه تاریک دستگاه در مدت ۱۰ دقیقه (Time in Dark Compartment). پس از انجام

جهت انجام آزمایشات از ۴۹ سر موش صحرایی سفید نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن تقریبی ۳-۴ ماه استفاده شد. موش های صحرایی از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری و در حیوانخانه دانشکده پزشکی زنجان با شرایط محیطی (دما ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی) نگهداری شدند. در شروع کار، هریک از حیوانات با تزریق داخل صفاقی کنامین و زیلازین به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۵ بیپهوش شدند و جهت کاشت کانول ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ، در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند. محل قرار گیری کانول ها با استفاده از مختصات  $AP = \pm 2mm, VD = 2.8-3 mm$  تعیین گردید. این مختصات از مبداء برگما علامت گذاری و سپس توسط دریل سوراخ و کانول ها در محل جاگذاری شدند. در نهایت اطراف کانول ها توسط سیمان دندانپزشکی پر شده و نوار المنت به اندازه کانول هدایتی در داخل این کانول ها قرار داده شد تا از ورود مواد و گرد و غبار در طی مدت بهبودی جلوگیری شود. موش های صحرایی پس از اعمال جراحی تا انتهای دوره ی بهبودی (یک هفته) در قفس های انفرادی نگه داری شدند.

گروه بندی موش های صحرایی به شرح زیر انجام شد:

- ۱- گروه کنترل (C)، حیوانات سالم ۲- گروه جراحی کنترل (sham)، حیوانات جراحی-سالم، دریافت کننده نرمال سالین ۳- گروه جراحی-سالم دریافت کننده داروی آمینوگوانیدین هیدروکلراید با دوز  $10 \mu g/rat$  (C-AG10)، ۴- گروه جراحی-سالم، دریافت کننده داروی آمینوگوانیدین با دوز  $90 \mu g/rat$  (C-AG90)، ۵- گروه جراحی-دیابتی، دریافت کننده نرمال سالین (D)، ۶- گروه جراحی-دیابتی، دریافت کننده داروی آمینوگوانیدین با دوز  $10 \mu g/rat$  (D-AG10)، ۷- گروه جراحی-دیابتی، دریافت کننده داروی آمینوگوانیدین با دوز  $90 \mu g/rat$  (D-AG90).

دوزهای دوگانه فوق در این مطالعه بر اساس محدود مطالعاتی که آمینوگوانیدین را به صورت داخل بطنی در مغز استفاده کرده‌اند و همچنین مطالعاتی که این دارو را به صورت

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات حاصل از PCR آنها

Gene	Primers	Product size
F: 5'-CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG-3' R: 5'-GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG-3'	228 bp	Bcl-2
F:5'-AGG CTG GCG ATG AGT TTG AA-3' R: 5'-TGA AAC GCT CCT GGC CTT TC-3'	357 bp	Bcl-xL
F:5'- TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC -3 R: 5'- GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG-3'	173 bp	Bax
F: 5'-GGC CAA GAT CAT CCA TGA CAA CT-3' R: 5'-ACC AGG ACA TGA GCT TGA CAA AGT-3'	461 bp	GAPDH

های Bcl-2، Bcl-xL و Bax، و نیز ۱۰ پیکومول از پرایمر ژن GAPDH بعنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). اطلاعات رفتاری مربوط به حافظه و یادگیری اجتنابی غیر فعال حیوانات به روش مشاهده از طریق دستگاه شاتل باکس انجام شد و معیارهای زمانی با استفاده از زمان سنج ثبت شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. داده‌های مربوط به میزان بیان ژن‌های Bcl-2، Bcl-xL و Bax در سطح mRNA به روش RT-PCR نیمه کمی مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور با استفاده از نرم افزار Gel Quant NET باندهای محصولات PCR حاصل از الکتروفورز مورد تراکم سنجی قرار گرفت. داده‌های کمی هر کدام از ۳ ژن Bcl-2، Bcl-xL و Bax با داده‌های کمی ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی نرمال شدند.

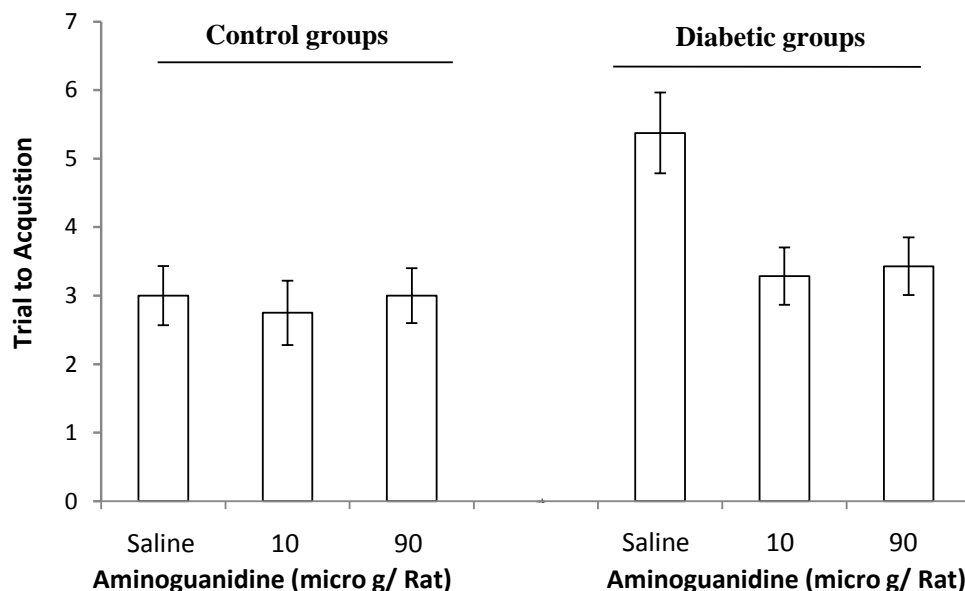
داده‌های حاصل از مطالعات رفتاری و مولکولی با استفاده از آزمونهای آماری پارامتری ANOVA، Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در تمام آزمون‌های آماری مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

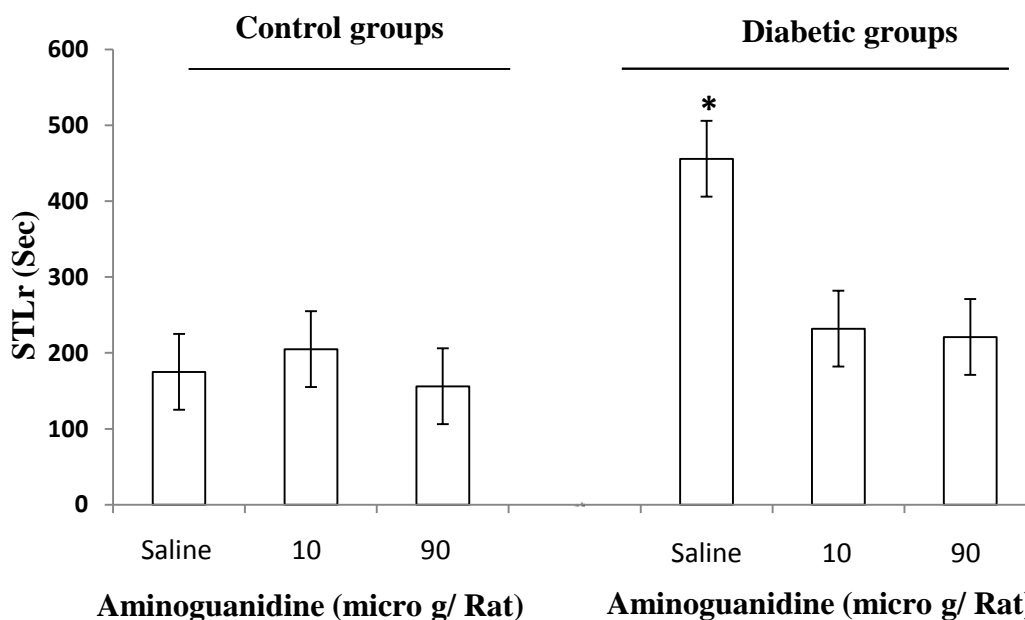
**نتایج آزمون رفتاری سنجش حافظه و یادگیری اجتنابی غیر فعال:** میزان تأخیر ورود در مرحله اکتساب Step-Through Latency in the acquisition trial (STLa) جهت اطمینان از عدم وجود اختلالات حسی و

تست‌های رفتاری و ثبت گلوکز خون و وزن نهایی، موش‌های صحرایی با استفاده از کلروفورم بیهوش و کشته شده، مجموعه آنها در طول خط وسط باز و مغز آنها خارج و روی تخته برش یخ بسته قرار داده و پرده‌های منتر به دقت برداشته شدند و سپس هیپوکامپ‌ها به دقت تشریح، جدا و در داخل کرایوتیوپ قرار داده شدند و بلافاصله به داخل تانک ازت مایع منتقل گردیدند. در نهایت بافت‌ها در دمای °C ۷۰- جهت استخراج RNA ذخیره گردیدند. RNA تام از نمونه بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی با استفاده از کیت استخراج Fast pure RNA، Cat No (9091) بر اساس پروتکل مربوطه جداسازی شد. میزان جذب نوری RNA استخراج شده به وسیله دستگاه Nanodrop2000 (Thermoscientific) انجام شد. ساخت C-DNA با استفاده از کیت C-Revert Aid First strand DNA synthesis Kit (Cat No. (K1621) شرکت Fermentas طبق دستورالعمل کیت، انجام شد.

برای تعیین میزان mRNA ژنهای Bcl-2، Bcl-xL و Bax، واکنش RT-PCR نیمه کمی مولتی پلکس انجام شد. برای انجام PCR از کیت Multiplex PCR شرکت کیائز با Cat No. (206143) استفاده شد. مخلوط RT-PCR (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) شامل ۲ میکرولیتر C-DNA، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی بافر Qiagen، (Multiplex PCR 2x Qiagen Germany)، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های Bcl-2، Bcl-xL و Bax، همچنین ۱۰ پیکومول از پرایمرهای اختصاصی ژن



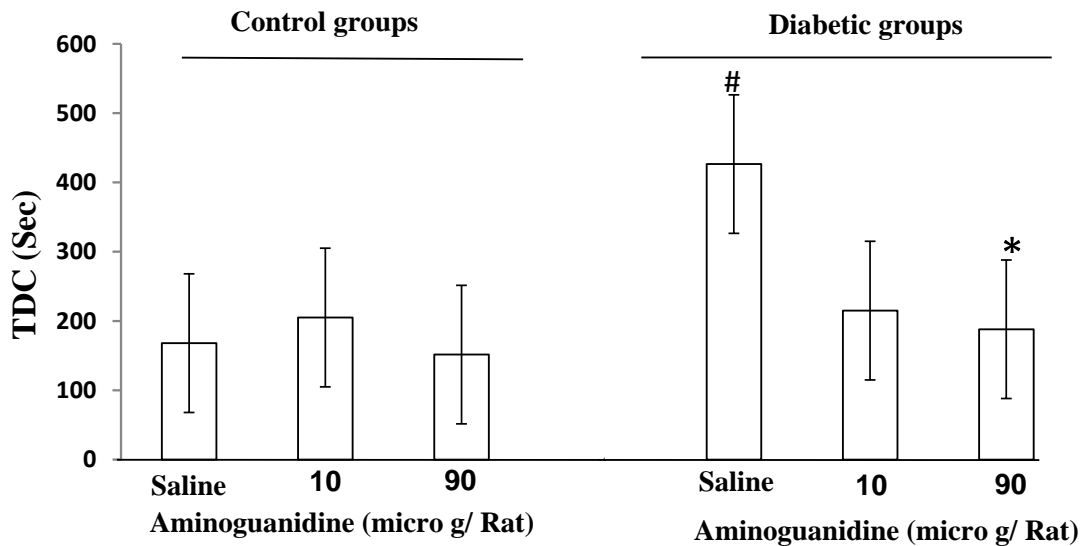
شکل ۱- اثر تزریق داخل هیپوکامپی آمینوگوانیدین بر روی تعداد رفت و برگشت حیوان در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال در گروه های کنترل (جراحی شده و غیر دیابتی) و دیابتی. ستون ها نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای استاندارد می باشند.  $P < 0.05$  \* مقایسه بین گروه دیابتی- سالینی و گروه کنترل غیر دیابتی- سالینی



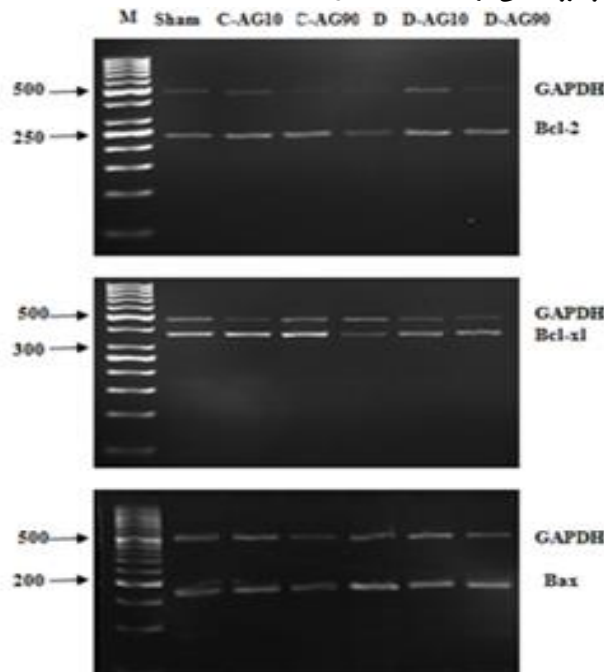
شکل ۲- اثر تزریق داخل هیپوکامپی آمینوگوانیدین بر روی میزان تأخیر ورود در مرحله تست (STLR) در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال در گروه های کنترل (جراحی شده و غیر دیابتی) و دیابتی. ستون ها نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای استاندارد می باشند.  $P < 0.05$  \* مقایسه بین گروه دیابتی- سالینی و گروه کنترل غیر دیابتی- سالینی.

که تعداد رفت و برگشت حیوان بین دو محفظه‌ی تاریک و روشن (Trial to Acquisition (TA) در مقایسه داخل گروهی (در گروه های غیر دیابتی یا دیابتی دریافت کننده دارو) اختلاف معنی دار وجود ندارد. مقایسه آماری نشان داد که بین گروه دیابتی بدون درمان با گروه کنترل سالم (غیر

حرکتی در حیوانات، میزان تأخیر اولیه محاسبه و با هم مقایسه شدند. مقایسه بین گروهی نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان تأخیر ورود در مرحله اکتساب step-through و یا تأخیر قبل از اکتساب آزمایش بین گروه‌ها وجود ندارد. تست سنجش حافظه ۲۴ ساعت پس از آموزش نشان داد



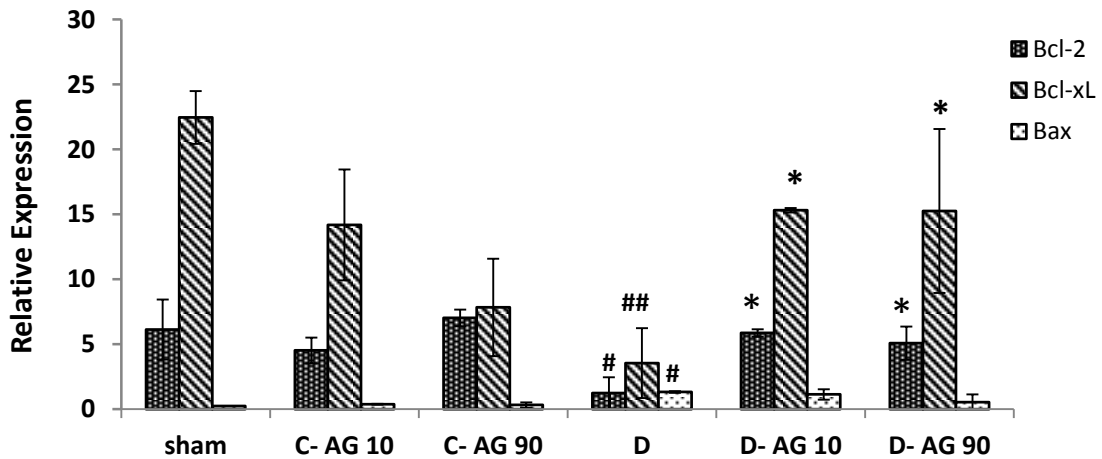
**شکل ۳-** اثر تزریق داخل هیپوکامپی آمینوگوانیدین بر روی کل مدت زمان سپری شده در محفظه تاریک در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال در گروه‌های کنترل (جراحی شده و غیر دیابتی) و دیابتی. ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای استاندارد می باشد.  $P < 0.05$  # مقایسه بین گروه دیابتی - سالینی و گروه کنترل غیر دیابتی - سالینی.  $P < 0.05$  \* مقایسه بین گروه دیابتی - سالینی و گروه دیابتی دریافت کننده ۹۰ micro g/Rat.



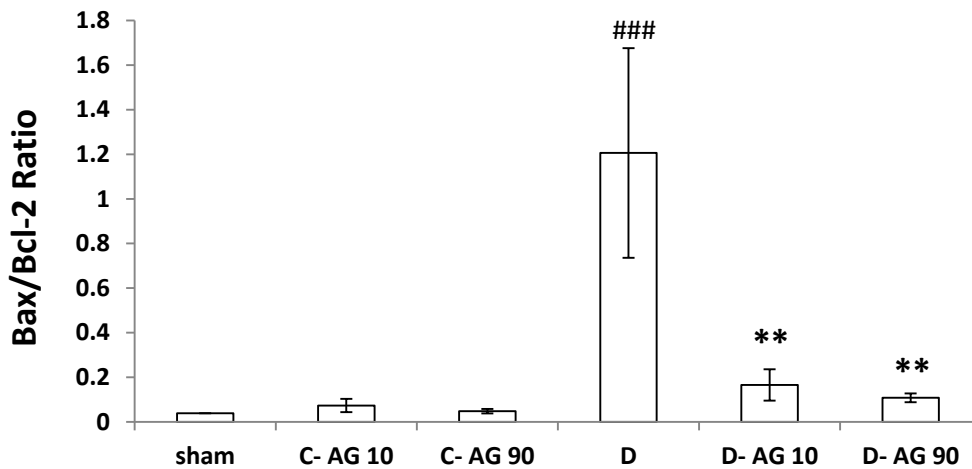
**شکل ۴-** بررسی اثر آمینوگوانیدین بر بیان ژن‌های Bcl-2، Bcl-xL و Bax در سطح mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی. میزان بیان mRNA به روش RT-PCR پس از کمی سازی باندها، داده‌ها با ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی نرمال سازی شد. گروه کنترل - جراحی (Sham)، کنترل سالم دریافت کننده (C-AG 10) AG 10 $\mu$ g/Rat، کنترل سالم دریافت کننده (C-AG 90) ۹۰  $\mu$ g/Rat، دیابتی بدون درمان (D)، دیابتی دریافت کننده (D-AG 10) AG 10 $\mu$ g/Rat، دیابتی دریافت کننده (D-AG 90) AG 90 $\mu$ g/Rat.

دریافت کننده دوز های ۱۰ و ۹۰  $\mu$ g/Rat با گروه دیابتی بدون درمان، با وجود نشان دادن کاهش ظاهری در تعداد رفت و برگشت حیوان، اختلاف آماری معنی دار نبود.

دیابتی) اختلاف معنی دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ) که نشان می‌دهد القای دیابت سبب افزایش تعداد رفت و برگشت حیوان بین دو محفظه شده است. ولی مقایسه گروه‌های دیابتی



**شکل ۵-** بررسی اثر آمینوگوانیدین بر روی بیان نسبی ژن‌های Bcl-2، Bcl-xL، Bax در سطح mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی.  $P < 0.05$  \* مقایسه بین گروه‌های دیابتی درمان شده و گروه دیابتی بدون درمان.  $P < 0.05$  # مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه کنترل.  $P < 0.01$  ## مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه کنترل. داده‌ها بصورت  $Mean \pm S.E.M$  بیان شده‌اند. گروه کنترل-جراحی (Sham)، کنترل سالم دریافت کننده  $AG 10\mu g/Rat$  (C-AG 10)، کنترل سالم دریافت کننده  $AG 90\mu g/Rat$  (C-AG 90)، دیابتی بدون درمان (D)، دیابتی دریافت کننده  $AG 10\mu g/Rat$  (D-AG 10)، دیابتی دریافت کننده  $AG 90\mu g/Rat$  (D-AG 90).



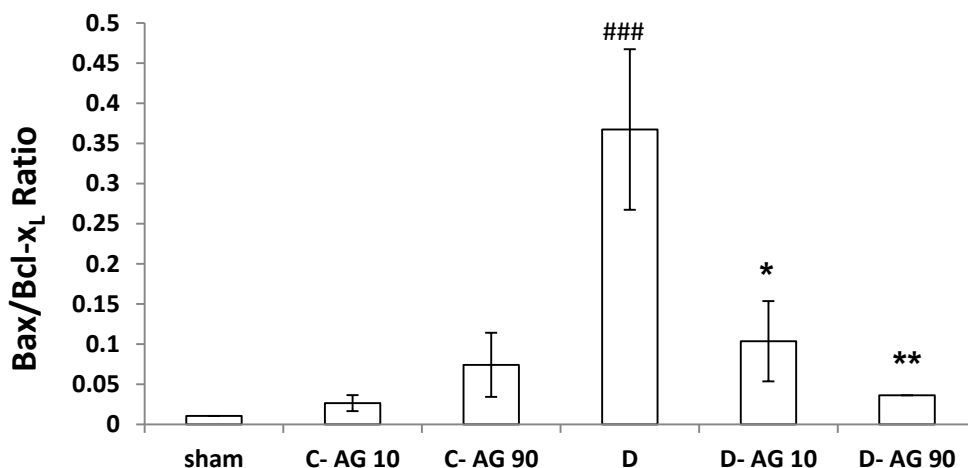
**شکل ۶-** بررسی اثر آمینوگوانیدین بر روی نسبت Bax/ Bcl-xL در سطح mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی.  $P < 0.001$  ### مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه کنترل.  $P < 0.01$  \*\* مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه‌های دیابتی دریافت کننده دارو. داده‌ها بصورت  $Mean \pm S.E.M$  بیان شده‌اند. گروه کنترل-جراحی (Sham)، کنترل سالم دریافت کننده  $AG 10\mu g/Rat$  (C-AG 10)، کنترل سالم دریافت کننده  $AG 90\mu g/Rat$  (C-AG 90)، دیابتی بدون درمان (D)، دیابتی دریافت کننده  $AG 10\mu g/Rat$  (D-AG 10)، دیابتی دریافت کننده  $AG 90\mu g/Rat$  (D-AG 90).

می‌شود ولی مقایسه گروه‌های دیابتی دریافت کننده دوزهای  $10\mu g/Rat$  و  $90\mu g/Rat$  با گروه دیابتی بدون درمان، بیانگر عدم اختلافات معنی‌دار بین آنها بود (شکل ۲).

نتایج آماری نشان داد که در مدت زمان سپری شده در محفظه تاریک در مدت ۱۰ دقیقه Time in Dark Compartment (TDC) میان گروه‌های غیر دیابتی در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده سالین اختلاف معنی‌دار وجود ندارد اما در گروه‌های دیابتی دریافت کننده دارو اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ). از طرف دیگر مقایسه آماری

تست سنجش حافظه ۲۴ ساعت پس از آموزش نشان داد که میزان تاخیر در زمان تست Step-Through Latency (STLr) در مقایسه‌ی داخلی گروه‌های غیر دیابتی دریافت کننده‌ی دارو و دیابتی دریافت کننده‌ی دارو معنی‌دار نبود. این عدم اختلاف معنادار نشان داد که تزریق آمینوگوانیدین در موش‌های صحرایی سالم اثری بر میزان تأخیر ندارد. مقایسه میان گروه‌های غیر دیابتی و دیابتی (دریافت کننده سالین) حاکی از اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ) که نشان می‌دهد القای دیابت سبب کاهش تاخیر در زمان تست





**شکل ۷-** بررسی اثر آمینوگوانیدین بر روی نسبت Bax/ Bcl-2 در سطح mRNA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی.  $P < 0.001$  ##### مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه کنترل.  $P < 0.05$  \* و  $P < 0.01$  \*\* مقایسه بین گروه دیابتی بدون درمان و گروه‌ها دیابتی دریافت کننده دارو. داده‌ها بصورت  $Mean \pm S.E.M$  بیان شده‌اند. گروه کنترل-جراحی (Sham)، کنترل سالم دریافت کننده (C-AG 10) AG 10µg/Rat، کنترل سالم دریافت کننده (C-AG 90) AG 90µg/Rat، دیابتی بدون درمان (D)، دیابتی دریافت کننده (D-AG 10) AG 10µg/Rat، دیابتی دریافت کننده (D-AG 90) AG 90µg/Rat.

نشان داد که بین گروه‌های کنترل غیر دیابتی و دیابتی (عدم دریافت دارو) و همچنین بین گروه دیابتی دریافت کننده آمینوگوانیدین با دوز ۹۰ µg/Rat و گروه دیابتی - سالینی که به جای دارو سالین دریافت کرده بودند، تفاوت معنی دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).

**نتایج مربوط به مطالعات RT-PCR:**

بر اساس نتایج این مطالعه، میزان بیان ژن های Bcl-2 و Bcl-xL در سطح mRNA در ناحیه هیپوکامپ موش های صحرایی گروه دیابتی بدون درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) ولی بیان ژن های Bax در سطح mRNA افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ) در مورد حیوانات سالمی که دارو دریافت کرده بودند نسبت به کنترل تفاوتی مشاهده نشد.

شکل ۵ نشان می‌دهد که بیان ژن های Bcl-2 و Bcl-xL در سطح mRNA در ناحیه هیپوکامپ گروه های دیابتی دریافت کننده آمینوگوانیدین با دوز های ۹۰ µg/Rat و ۱۰ نسبت به گروه دیابتی بدون درمان افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ) ولی در میزان بیان ژن Bax در سطح mRNA تغییر معنی داری مشاهده نمی‌شود.

نسبت Bax/Bcl-2 در ناحیه هیپوکامپ موش های صحرایی گروه کنترل دیابتی نسبت به موش های صحرایی گروه کنترل غیر دیابتی افزایش نشان داد ( $P < 0.01$ ). اما درمان با آمینوگوانیدین در گروه های دیابتی با دوز های

۹۰ و ۱۰ باعث کاهش معنی دار نسبت Bax/Bcl-2 (شکل ۶). همچنین نسبت Bax/Bcl-xL در ناحیه هیپوکامپ موش های صحرایی گروه کنترل دیابتی نیز نسبت به موش های صحرایی گروه کنترل غیر دیابتی نشان داد ( $P < 0.01$ )، در حالیکه درمان با آمینوگوانیدین در گروه های دیابتی با دوز های ۹۰ و ۱۰ باعث کاهش معنی دار آن نسبت به گروه دیابتی بدون درمان شد (به ترتیب  $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.01$ ) (شکل ۷).

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد در موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین، اعمال شناختی دچار اختلال می‌شود. در این مطالعه، در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال، میانگین تعداد رفت و برگشت حیوانات بین محفظه تاریک و روشن دستگاه در گروه دیابتی افزایش یافت که نشان دهنده - ی نقص یادگیری در این حیوانات است. در آزمون حافظه، STLr کاهش و TDC افزایش یافت که بیانگر نقایص القاء شده توسط دیابت بر روی حافظه می باشد. نقایص یادگیری و حافظه هم در حیوانات دیابتی شده و هم در انسان ها گزارش شده است [۳، ۲۶، ۳۶، ۴۱، ۵۲]. در سالیان اخیر مطالعات انسانی و حیوانی زیادی در مورد عوارض ناشی از دیابت بر

می باشد. در راستای نتایج بدست آمده در این مطالعه، گزارشات متعددی نشان داده اند که افزایش بیان Bax می تواند آپوپتوز را در سلول ها، هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* القا کند [۳۸] همچنین نشان داده شده است که هیپرگلیسمی باعث القای آپوپتوز در بلاستوسیت های موش از طریق افزایش بیان پروتئین Bax شده است [۳۴] علاوه بر این، وجود آپوپتوز در سلول های نوروبلاست کشت داده شده و تحت تیمار با سرم افراد دیابتی گزارش شده است [۵۰]. در نورون های اولیه گانگلیون ریشه خلفی نخاع موش های صحرایی دیابتی نیز کاهش تنظیمی Bcl-2 و شواهدی از آپوپتوز مشاهده گردیده است [۴۲]. مطالعاتی که بر روی نورون های قشر مغز موش های صحرایی تازه متولد شده انجام شده، نشان داده است که هیپرگلیسمی در موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوسین از طریق افزایش نسبت Bax/Bcl-2 سبب القای آپوپتوز می گردد [۱۲].

از آنجا که ناحیه CA1 هیپوکامپ نقش مهمی در فرایند یادگیری و حافظه دارا می باشد، از این رو مرگ سلولی در این ساختار، به طور واضح در اختلالات شناختی دخالت می کند [۴-۵] به طوری که ۶-۵ هفته پس از القای دیابت، مرگ نورونی وسیعی در نواحی مختلف هیپوکامپ و همچنین افزایش بیان ژن Bax در هیپوکامپ، تجمع کروماتین، آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری به داخل سیتوپلاسم و همچنین جابجایی Bax از سیتوپلاسم به میتوکندری اتفاق می افتد که منجر به کاهش تعداد نورون های هیپوکامپ و در نتیجه نقص در اعمال شناختی در حیوانات دیابتی می شود [۲۷، ۵۶]. بنابراین به نظر می رسد که دژنراسیون و آپوپتوز نورون های هیپوکامپ، نقش کلیدی در نقایص یادگیری و حافظه در بسیاری از بیماری های سیستم اعصاب مرکزی بازی می کند [۵۵] لذا در این مطالعه نقص حافظه از طریق افزایش بیان ژنهای دخیل در آپوپتوز در موش های دیابتی می تواند قابل توجه باشد.

بر اساس یافته های این تحقیق، درمان با آمینوگوانیدین در گروه های دیابتی سبب افزایش معنی دار در بیان ژن های Bcl-2 و Bcl-x<sub>L</sub> می شود. اگر چه کاهش بیان ژن Bax، تفاوت معنا داری را بین گروه های دیابتی تحت درمان با آمینوگوانیدین در مقایسه با گروه دیابتی بدون درمان نشان

روی یادگیری و حافظه همراه با اختلالات ساختاری و عصبی شیمیایی سیستم عصبی انتشار یافته است [۱، ۶، ۲۶، ۳۶]. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ۷ هفته پس از القای دیابت، حیواناتی که آمینوگوانیدین با دوز ۱۰ و ۹۰  $\mu\text{g}/\text{Rat}$  به صورت داخل هیپوکامپی در شروع دیابت، دریافت کرده بودند، تفاوت معنی داری را در هیچکدام از معیارهای رفتاری سنجش یادگیری و حافظه در دستگاه شاتل باکس در مقایسه با گروه دیابتی بدون درمان، نشان ندادند.

بر اساس گزارشات موجود بهبود حافظه توسط آمینوگوانیدین از طریق افزایش نیتریک اکساید در مدل ایسکمی مغزی در موش صحرایی مشاهده شده است [۳۵]. این دارو اختلال در حافظه گذشته نگر بدنال هیپوکسی را در موش صحرایی بهبود بخشیده است [۵۳] و همچنین تأثیر مفید نارینجین بر حافظه را در موش سوری تقویت نموده است [۳۱]. از طرف دیگر عدم تأثیر آمینوگوانیدین در بهبود حافظه فضائی بدنال هیپوپرفیوژن مغزی [۱۳] و تشنج [۳۰] نیز گزارش شده است همچنین آمینوگوانیدین اثرات مفید آتورواستاتین بر نقص حافظه ناشی از اسکوپولامین را افزایش نداده است [۳۹] و نیز تقویت حافظه حاصل از پیوگلیتازون در نقص حافظه ناشی از تجویز مرفین در حافظه اجتنابی غیرفعال توسط آمینوگوانیدین تغییر پیدا نکرده اما در ارزیابی حافظه توسط Y-maze اثر پیوگلیتازون را مهار نموده است [۲]. علاوه بر این اثر تقویتی گرانیسرون بر نقص حافظه حاصل از اسکوپولامین توسط آمینوگوانیدین مهار شده است [۲۲]. مطالعات ذکر شده در فوق اثر تزریق داخل صفاقی آمینوگوانیدین را با دوز های متفاوت و در مدل های متفاوت و با نتایج متفاوت نشان می دهند. اما مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات تزریق مستقیم داخل هیپوکامپی دارو را بر حافظه اجتنابی غیر فعال در موش های صحرایی دیابتیک بررسی نموده است. بنابراین تفاوت های مشاهده شده ممکن است ناشی از تفاوت در نحوه تزریق، دوز دارو، نژاد حیوان، آزمون رفتاری و مدل ایجاد شده در حافظه مورد ارزیابی باشد.

با این وجود، در مطالعه حاضر افزایش بیان ژن Bax، کاهش بیان ژن های Bcl-2 و Bcl-x<sub>L</sub> در هیپوکامپ، و همچنین افزایش نسبت Bax/Bcl-x<sub>L</sub> و Bax/Bcl-2 در حیوانات دیابتی نسبت به گروه کنترل بیانگر وقوع آپوپتوز

دیگر آمینوگوانیدین به عنوان یک مهار کننده انتخابی iNOS می‌تواند از طریق کاهش تولید NO و همچنین کاهش فعالیت متیل گلیوزال و به دنبال آن کاهش محصولات انتهایی گلیکاسیون پیشرفته (Advanced glycation end products)، باعث تعدیل بیان ژن‌های ذکر شده در بالا و لذا کاهش آپوپتوز گردد [۵۸]. علاوه بر این، آمینوگوانیدین قادر است در مقادیر فارماکولوژیک خود با مهار آنزیم‌های پلی آمین اکسیداز و دی آمین اکسیداز و همچنین توسط خنثی کردن رادیکال‌های آزاد (به عنوان یک آنتی اکسیدان) در محافظت مغز در مقابل نوروپاتی دیابتی ایفای نقش نماید [۵۶, ۵۷]. لازم به ذکر است که با توجه به امکانات موجود، عدم سنجش پارامترهای ذکر شده از محدودیت‌های این تحقیق محسوب می‌شود و این مطالعه که برای اولین بار با این نوع طراحی انجام شده است، بیشتر برای بررسی اثرات جامع آمینوگوانیدین و راهیابی به مکانیزم اثر آن و نیز یافتن دوز بهینه این دارو می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به طور خلاصه در این مطالعه، دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوسین سبب اختلال در حافظه اجتنابی غیرفعال و افزایش بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در موش‌های صحرایی شد. آمینوگوانیدین در دوزهای به کار رفته تغییری در حافظه ایجاد نکرد ولی موجب کاهش نسبت ژن‌های دخیل در آپوپتوز گردید.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان که حمایت مالی این پژوهش را بر عهده داشتند تشکر می‌گردد.

داد. اما نسبت Bax/Bcl-2 و Bax/Bcl-x<sub>L</sub> به طور قابل ملاحظه ای در این گروه‌ها نسبت به گروه دیابتی بدون درمان کاهش نشان داد. از آنجا که نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl-2 یا Bcl-x<sub>L</sub> تعیین کننده مرگ یا زندگی سلول می‌باشد [۴۹] لذا نتایج حاصل از مقایسه نسبت های Bax/Bcl-x<sub>L</sub> و Bax/Bcl-2 در مطالعه حاضر می‌تواند بیانگر اثر مهار آمینوگوانیدین بر روی آپوپتوز ناشی از القای دیابت نوع ۱ در ناحیه هیپوکمپ موش های صحرایی دیابتی باشد.

هر چند مطالعاتی در خصوص برخی آنتی اکسیدانها و نقش آنها در پیشگیری از آپوپتوز در سیستم عصبی موش های صحرایی دیابتی انجام شده است [۳۷]. اما با توجه به منابع تحقیقاتی در دسترس، مطالعه ای در خصوص بررسی نقش ضد آپوپتوزی آمینوگوانیدین بر روی ناحیه هیپوکمپ موش های صحرایی دیابتی، منتشر نشده است. بر اساس یافته‌های موجود، آمینوگوانیدین به عنوان یک آنتی اکسیدان و همچنین مهار کننده انتخابی آنزیم inducible Nitric oxide Synthase (iNOS) سبب بهبود علائم نورولوژیکی و بافتی در موش های صحرایی با مدل آسیب مغزی ناشی از جراحی شده است [۱۴]. آمینوگوانیدین سمیت نورونی القاء شده توسط آهن و نیز کلرید آلومینیوم در موش های صحرایی را کاهش داده و باعث محافظت نورون ها و بهبود حافظه و یادگیری ناشی از مسمومیت شده است [۷]. مطالعات نشان داده اند که در شرایط استرس اکسیداتیو از جمله دیابت بیان mRNA مربوط به iNOS [۱۰] و به تبع آن مقادیر نیتریک اکساید (NO) به عنوان یک اکسید کننده [۱۹] و همچنین مقدار یک اکسید کننده دیگر بنام متیل گلیوزال [۱۴] افزایش می‌یابند که می‌توانند توسط افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان ژنهای Bcl-2 و Bcl-x<sub>L</sub> باعث القای آپوپتوز در هیپوکمپ موش های دیابتی شوند [۱۸]. از طرف

## References

[1] Allen DA, Yaqoob MM, and Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J NutrBiochem* 16 (2005) 705-

13.

[2] Babaei R, Javadi-Paydar M, Sharifian M, Mahdavian S, Almasi-Nasrabadi M, Norouzi A, and Dehpour AR. Involvement of nitric oxide in pioglitazone memory improvement in morphine-induced memory impaired mice. *PharmacolBiochemBehav* 103 (2012) 313-21.

- [3] Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, and Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci* 73 (2003) 1907-16.
- [4] Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban JJ, Spruijt BM, Erkelens DW, and Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 45 (1996) 1259-66.
- [5] Biessels GJ, Kamal A, Urban JJ, Spruijt BM, Erkelens DW, and Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res* 800 (1998) 125-135.
- [6] Biessels GJ, Kerssen A, de Haan EH, and Kappelle LJ. Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care. *Prim Care Diabetes* 1(2007) 187-193.
- [7] Bostanci MO and Bagirici F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 76 (2008) 57-62.
- [8] Carvalho VF, Florim LT, de OBE, Torres RC, Batista MM, Amendoeira FC, Cordeiro RS, Martins MA, and PM ES. Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 669 (2011) 143-48.
- [9] Cash D, Beech JS, Rayne RC, Bath PM, Meldrum BS, and Williams SC. Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain. *Brain Res* 905 (2001) 91-103.
- [10] Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol Cell Biochem* 312 (2008) 39-46.
- [11] Chan AS, Cheung MC, Law SC, and Chan JH. Phase II study of alpha-tocopherol in improving the cognitive function of patients with temporal lobe radionecrosis. *Cancer* 100(2004) 398-404.
- [12] Chang SF, Sun YY, Yang LY, Hu SY, Tsai SY, Lee WS, and Lee YH. Bcl-2 gene family expression in the brain of rat offspring after gestational and lactational dioxin exposure. *Ann N Y Acad Sci* 1042(2005) 471-480.
- [13] de la Torre JC and Aliev G. Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. *J Cereb Blood Flow Metab* 25 (2005) 663-72.
- [14] Di F, Yan-Ting G, Hui L, Tao T, Zai-Hua X, Xue-Ying S, Hong-Li X, and Yun-Jie W. Role of aminoguanidine in brain protection in surgical brain injury in rat. *Neurosci Lett* 448 (2008) 204-7.
- [15] Diaz A, Mendieta L, Zenteno E, Guevara J, and Limon ID. The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 98 (2011) 67-75.
- [16] Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, and Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 47(1998) 1114-20.
- [17] Hengartner MO. Pharmacia Biotech & Science prize. Grand prize winner. Life and death decisions: ced-9 and programmed cell death in *Caenorhabditiselegans*. *Science* 270 (1995) 930-31.
- [18] Huang X, Wang F, Chen W, Chen Y, Wang N, and von Maltzan K. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Res* 1469 (2012) 82-91.
- [19] Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 2989 (1992) 446-51.
- [20] Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374 (1995) 814-16.
- [21] Javadi-Paydar M, Rayatnia F, Fakhraei N, Zakeri M, Mirazi N, Norouzi A, Dehpour AR. Atorvastatin improved scopolamine-induced impairment in memory acquisition in mice: involvement of nitric oxide. *Brain Res* 1386 (2011) 89-99.
- [22] Javadi-Paydar M, Zakeri M, Norouzi A, Rastegar H, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide in granisetron improving effect on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Brain Res* 1429 (2012) 61-71.
- [23] Kano T, Shimizu-Sasamata M, Huang PL, Moskowitz MA, Lo EH. Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. *Neuroscience* 86 (1998) 695-99.
- [24] Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser

- SL, Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005.
- [25] Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3 (1997) 614-20.
- [26] Kucukatay V, Agar A, Gumuslu S, Yargicoglu P. Effect of sulfur dioxide on active and passive avoidance in experimental diabetes mellitus: relation to oxidant stress and antioxidant enzymes. *Int J Neurosci* 117 (2007) 1091-107.
- [27] Li ZG, Britton M, Sima AA, Dunbar JC. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci* 76 (2004) 249-62.
- [28] Li ZG, Sima AA. C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp Diabetes Res* 5 (2004) 79-90.
- [29] Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946 (2002) 221-31.
- [30] Liu ZW, Zhang T, Yang Z. Involvement of nitric oxide in spatial memory deficits in status epilepticus rats. *Neurochem Res* 32 (2007) 1875-83.
- [31] Maratha SR, Mahadevan N. Memory enhancing activity of naringin in unstressed and stressed mice: possible cholinergic and nitriergic modulation. *Neurochem Res* 37 (2012) 2206-12.
- [32] Martinez-Tellez R, Gomez-Villalobos Mde J, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res* 1048 (2005) 108-15.
- [33] Marzo I, Brenner C, Kroemer G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* 52 (1998) 248-51.
- [34] Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4 (1998) 1421-24.
- [35] Mori K, Togashi H, Ueno KI, Matsumoto M, Yoshioka M. Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 120 (2001) 159-68.
- [36] Patil CS, Singh VP, Kulkarni SK. Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacological Reports* 58 (2006) 373-80.
- [37] Piotrowski P, Wierzbicka K, Smialek M. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants. *Folia Neuropathol* 39 (2001) 147-54.
- [38] Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, Lorenzi M. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 156 (2000) 1025-32.
- [39] Rayatnia F, Javadi-Paydar M, Allami N, Zakeri M, Rastegar H, Norouzi A, Dehpour AR. Nitric oxide involvement in consolidation, but not retrieval phase of cognitive performance enhanced by atorvastatin in mice. *Eur J Pharmacol* 666 (2011) 122-30.
- [40] Reagan LP. Insulin signaling effects on memory and mood. *Curr Opin Pharmacol* 7 (2007) 633-37.
- [41] Reagan LP, Magarinos AM, and McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 893 (1999) 126-37.
- [42] Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, and Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6 (1999) 347-63.
- [43] Saraste A and Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 528-37.
- [44] Sharma B, Sharma PM. Arsenic toxicity induced endothelial dysfunction and dementia: Pharmacological interdiction by histone deacetylase and inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol* 273 (2013) 180-88.
- [45] Sharma B, Singh N. Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, convalesce behavior and biochemistry of hypertension induced vascular dementia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 103 (2013) 821-30.
- [46] Sima AA. Diabetes underlies common neurological disorders. *Ann Neurol* 56 (2004) 459-61.
- [47] Sima AA, Nathaniel V, Bril V, McEwen TA, Greene DA. Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glial dysjunction in human

- diabetic neuropathy. *J Clin Invest* 81 (1988) 349-64.
- [48] Sreemantula S, Kilari EK, Vardhan VA, Jaladi R. Influence of antioxidant (L-ascorbic acid) on tolbutamide induced hypoglycaemia/antihyperglycaemia in normal and diabetic rats. *BMC Endocr Disord* 5 (2005) 2-6.
- [49] Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 49 (2000) 1932-38.
- [50] Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. *J Clin Invest* 102 (1998) 1454-62.
- [51] Stevanovic ID, Jovanovic MD, Colic M, Jelenkovic A, Bokonjic D, Ninkovic M. Nitric oxide synthase inhibitors protect cholinergic neurons against AIC13 excitotoxicity in the rat brain. *Brain Res Bull* 81 (2010) 641-46.
- [52] Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 537 (2006) 106-10.
- [53] Udayabanu M, Kumaran D, Nair RU, Srinivas P, Bhagat N, Aneja R, Katyal A. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res* 1230 (2008) 138-49.
- [54] Vakili A, Zahedi-Khorasani M. Effect of aminoguanidine on post-ischemic damage in rodent model of stroke. *Pak J Pharm Sci* 21(2008) 24-32.
- [55] Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME. The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 21(1998) 317-23.
- [56] Ye L, Wang F, Yang RH. Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 1411 (2011) 57-64.
- [57] Yildiz G, Demiryurek AT, Sahin-Erdemli I, Kanzik I. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol* 124 (1998) 905-10.
- [58] Yukioka F, Matsuzaki S, Kawamoto K, Koyama Y, Hitomi J, Katayama T, Tohyama M. Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int* 52 (2008) 683-87.