

Thesis Title Effects of Metformin and Vildagliptin on Learning and Memory Behaviors and Brain Mitochondrial Functions in High-Fat Diet Induced Insulin Resistant Rats

Author Miss Hiranya Pintana

Degree Master of Science (Physiology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn	Advisor
Prof. Dr. Nipon Chattipakorn	Co-advisor
Dr. Krekwit Shinlapawittayatorn	Co-advisor
Dr. Wassana Prachayasakul	Co-advisor

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder, and the early onset of T2DM is associated with insulin resistant condition. Our previous studies have shown that 12-weeks of high-fat diet (HFD) consumption induced not only peripheral but also neuronal insulin resistance. Furthermore, previous studies demonstrated that HFD consumption has been associated with the cognitive dysfunction. In the normal physiological condition, mitochondria is crucial organelle to produce energy for cellular function. Byproducts of the mitochondrial respiratory

chains from such as reactive oxygen species (ROS) can damage the cells and lead to various pathological conditions such as neurodegenerative disease. Previous studies demonstrated the correlation between mitochondrial dysfunction and neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease. Our recent study also found that 12-week of HFD consumption caused brain mitochondrial dysfunction. Therefore, drugs with effective glycemetic control as well as with neuroprotective effects, should have great therapeutic benefit in diabetes patients with neurodegenerative disorder. However, the possible neuroprotective effects of metformin, drug of choice for treatment of T2DM, and vildagliptin, a novel anti-diabetic agent, spatial learning behavior and brain mitochondrial function in insulin resistant condition induced by HFD consumption have never been investigated.

Therefore, the hypotheses of this study are that 1) metformin and vildagliptin improve peripheral insulin resistance via improving insulin sensitivity, 2) metformin and vildagliptin administration improves learning and memory behaviors measured by Morris Water Maze (MWM) test and 3) metformin and vildagliptin administration attenuates brain oxidative stress and prevents brain mitochondrial dysfunction. To determine all hypotheses, forty-eight male Wistar rats were fed with either a normal diet (ND; 19.7% energy from fat) or a high-fat diet (HFD; 59.3 % energy from fat) for 12 weeks, blood sample was collected monthly for biochemical analysis. At 12th week, all rats were tested for the measurement of locomotor activity, using Open-field test (OFT) and using MWM test for learning and memory behaviors. After that, each group (ND group and HFD group) was divided into 3 subgroups, including subgroup treated with vehicle, subgroup treated with metformin (15 mg/kg BW b.i.d) or subgroup treated with vildagliptin (3 mg/kg BW per day) for 21 days. At the end of

treatment, all rats were tested with MWM test again. At the end of protocol, rats were sacrificed, brain was removed to determine brain mitochondrial function and brain oxidative stress levels. We found that 12-week HFD consumption caused peripheral insulin resistance, as shown by increased HOMA index. The locomotor activity between 12-week HFD-fed rats and ND-fed rats were not different. However, 12-week HFD-fed rats had significantly impaired in learning and memory compared to 12-weeks ND-fed rats. We also demonstrated that metformin and vildagliptin had equally beneficial effects to improve peripheral insulin sensitivity and decrease plasma and brain oxidative stress levels caused by HFD consumption. Both metformin and vildagliptin completely prevent the impairment of learning and memory induced by HFD consumption. In addition, metformin and vildagliptin significantly improved brain mitochondrial dysfunction caused by HFD consumption.

Our findings demonstrated that metformin and vildagliptin improve not only insulin sensitivity but also learning and memory behaviors, possibly via improve peripheral insulin resistance, improve brain mitochondrial function and decrease plasma and brain oxidative stress levels.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของยามทฟอร์มินและวิลคาลิปทินต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความ
จำและการทำงานของไมโทคอนเดรียของสมองในหนูที่มีภาวะคีโตต่อ
อินซูลินจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง

ผู้เขียน นางสาวหิรัญญา ปันตนา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.ทพญ. สิริพร ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.ดร.นพ. นิพนธ์ ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร.นพ. เกริกวิเศษ ศิลปวิทยาทร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. วาสนา ปรัชญาสกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานประเภทที่ 2 จัดเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของระบบเมตาบอลิก
ของร่างกาย ปัจจุบันพบว่าระยะเริ่มแรกของการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 มีความเกี่ยวข้องกับ
การที่ร่างกายมีภาวะคีโตอินซูลิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง
เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ไม่เพียงทำให้เกิดภาวะคีโตอินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลายเท่านั้น แต่ยัง
ส่งเสริมให้เกิดภาวะคีโตอินซูลินในระบบประสาทอีกด้วย นอกจากนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่ง
พบว่าการรับประทานอาหารไขมันสูง มีความเกี่ยวข้องกับการสูญเสียความทรงจำ ในภาวะปกติไม่

โตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีหน้าที่หลักในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ อย่างไรก็ตามพบว่าของเสียที่เกิดจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย สามารถก่อให้เกิดผลเสียโดยการทำลายเซลล์และนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ไปจนถึงการเกิดโรคทางความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า การรับประทานอาหารไขมันสูง เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลต่อความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในสมอง ดังนั้นยาที่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดร่วมกับการป้องกันความเสื่อมของระบบประสาทได้ จึงน่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการรักษาผู้ป่วยเบาหวานที่มีโรคทางความเสื่อมของระบบประสาทร่วมด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษาถึงผลของยามาเมทฟอร์มิน ซึ่งเป็นยาทางเลือกชนิดแรกที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 และยาวิลาโดลิติน ซึ่งเป็นยากลับใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 เช่นเดียวกัน ในแง่ผลดีต่อการเรียนรู้และความทรงจำ รวมไปถึงผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองในผู้ที่มีภาวะคือต่ออินซูลินแต่อย่างใด จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยมีสมมติฐานในการศึกษาคือ 1) ยามาเมทฟอร์มินและยาวิลาโดลิตินทำให้การตอบสนองต่ออินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลายดีขึ้น 2) ยามาเมทฟอร์มินและยาวิลาโดลิตินสามารถช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำเมื่อทดสอบด้วยแบบทดสอบมอร์ริสวอเตอร์เมซ 3) ยามาเมทฟอร์มินและยาวิลาโดลิตินช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชันและป้องกันความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในสมองได้ ในการศึกษาที่ใช้หนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์จำนวน 48 ตัว แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มอาหาร ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (พลังงานจากไขมันคิดเป็นร้อยละ 19.7 ของพลังงานทั้งหมด) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (พลังงานจากไขมันคิดเป็นร้อยละ 59.3 ของพลังงานทั้งหมด) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และในระหว่างนี้ทำการเก็บเลือดจากหางทุกเดือน ในสัปดาห์ที่ 2 หนูทุกตัวจะถูกทดสอบการเคลื่อนไหวด้วยแบบทดสอบโอเพนฟิลด์ และทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยแบบทดสอบมอร์ริสวอเตอร์เมซ จากนั้นหนูในแต่ละกลุ่มอาหารจะถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับยามาเมทฟอร์มิน 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 2 ครั้งต่อวัน และกลุ่มที่ได้รับยาวิลาโดลิติน 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 1 ครั้งต่อวัน โดยการรับประทาน เป็นเวลา 21 วัน หลังสิ้นสุดการได้รับยาหนูทุกตัวจะถูกทดสอบด้วยแบบทดสอบมอร์ริสวอเตอร์เมซอีกครั้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองหนูทุกตัวจะถูกทำารุณฆาต และนำสมองไปศึกษาการทำงานของไมโทคอนเดรียและวัดระดับความเครียดออกซิเดชันในสมอง จากผลการศึกษาพบว่า การรับประทานอาหาร

ไขมันสูงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำให้เกิดความต้านทานต่ออินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลาย โดยจะเห็นได้จากดัชนีชี้วัดคือ การมีค่าโฮมาอินเด็กซ์ที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถของการเรียนรู้และความจำในหนูที่มีภาวะคือต่ออินซูลินจากการรับประทานอาหารไขมันสูงมีความบกพร่องอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารสูตรปกติ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของหนูทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน การศึกษาถึงผลของยามเทฟอรัมินและยาลิวคาลิปทินยังพบว่าทั้ง 2 ชนิดให้ผลดีเท่าเทียมกันโดยสามารถฟื้นฟูภาวะต้านทานต่ออินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลายดีขึ้น, ช่วยลดระดับความเครียดออกซิเดชันทั้งในเลือดและในสมอง, ช่วยป้องกันความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ นอกจากนี้ยังช่วยลดความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในสมองที่เกิดจากการรับประทานอาหารไขมันสูง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่ายามเทฟอรัมินและลิวคาลิปทินไม่ได้มีเพียงผลดีในแง่ของการช่วยฟื้นฟูการทำงานของอินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลายให้ดีขึ้นเท่านั้น แต่ยังมีผลดีในด้านช่วยฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำ โดยกลไกที่สำคัญอาจมาจากความสามารถที่ช่วยฟื้นฟูภาวะต้านทานต่ออินซูลินในเนื้อเยื่อส่วนปลายให้ดีขึ้น, ช่วยลดระดับของความเครียดออกซิเดชันทั้งในเลือดและสมอง รวมทั้งจากผลการฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองที่ดีขึ้น