

## ยาต้านเบาหวานเมตฟอร์มินช่วยฟื้นฟูกระบวนการเรียนรู้ จดจำ ในสมองของหนูขาวที่มีภาวะอ้วน จากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง

### Metformin Improves Cognition of High Fat Diet Induced Obese Rats

เกรวรินทร์ จินาวงศ์ (Kewarin Jinawong)\* ดร.ณัฐยาภรณ์ อภัยใจ (Dr.Nattayaporn Apaijai)\*\*

ดร.นิพนธ์ ฉัตรทิพากร (Dr.Nipon Chattipakorn)\*\*\* ดร.สิริพร ฉัตรทิพากร (Dr.Siriporn Chattipakorn)\*\*\*\*

#### บทคัดย่อ

การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นเวลานานส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะอ้วนและดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของสมองที่บกพร่อง เมตฟอร์มินเป็นยาที่ใช้สำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคที่เกิดจากภาวะเมแทบอลิซึม ไคโรม เมตฟอร์มินสามารถฟื้นฟูความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย มีการศึกษาพบว่าเมตฟอร์มินช่วยให้การทำงานของสมองดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของเมตฟอร์มินต่อกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และส่วนที่นอกเหนือจากฮิปโปแคมปัสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาครั้งนี้ หนูขาวจำนวน 12 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ 4 ตัว และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูง 8 ตัว เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 13 หนูกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับการให้ยาหลอก และกลุ่มที่รักษาด้วยเมตฟอร์มินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าหนูที่รับประทานอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน เกิดภาวะอ้วนรวมทั้งการเรียนรู้และการจดจำของสมองบกพร่อง ซึ่งเมตฟอร์มินสามารถฟื้นฟูการทำงานของสมองที่บกพร่องได้

#### ABSTRACT

Long term high-fat diet (HFD) consumption induces obese-insulin resistance and cognitive impairments. Metformin is the first-line drugs for the treatment of type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. In addition, metformin exerts neuroprotection. However, the effects of metformin on hippocampal dependent and independent learning and memory behaviors have not been clearly elucidated. Twelve rats were fed with either normal-diet (n=4) or HFD (n=8) for 16 weeks. At week 13, HFD-fed rats were randomly treated with vehicle or metformin (n=4/group) for 4 weeks. We found that vehicle-treated HFD-fed rats developed obese-insulin resistant condition with cognitive decline. Metformin improved both the metabolic parameter and cognitive function in HFD-fed rats. These findings suggest that metformin has not only improved metabolic disturbance, but also both hippocampal-dependent and independent cognition.

**คำสำคัญ:** ภาวะอ้วน การเรียนรู้และจดจำบกพร่อง เมตฟอร์มิน

**Keywords:** Obesity, Cognitive impairment, Metformin

\* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\* อาจารย์ ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมสาขาโรคทางไฟฟ้าของหัวใจ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*\* ศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*\*\* ศาสตราจารย์ ภาควิชาประสาทวิทยาศาสตร์-ชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## บทนำ

โรคอ้วนเป็นภาวะหนึ่งของร่างกายที่เกิดจากการสะสมไขมันจำนวนมาก จนทำให้เกิดปัญหาต่อระบบการทำงานของร่างกาย และยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่น่าไปสู่การเกิดโรคเรื้อรัง เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Trivedi et al., 2018) มีการศึกษาที่รายงานว่า การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลานาน ส่งผลทำให้มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เกิดการสะสมของไขมันในช่องท้อง (visceral fat) ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นภาวะที่ร่างกายดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) (Krishna et al., 2016; Underwood, Thompson, 2016)

การศึกษาก่อนหน้านี้จากทางทีมผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของการรับประทานอาหารไขมันสูงในสัตว์ทดลอง พบว่าการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำให้เกิดภาวะร่างกายดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ด้วยการมีระดับอินซูลินในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperinsulinemia) ร่วมกับระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) (Pipatpipoon et al., 2012; Pratchayasakul et al., 2015) มากไปกว่านั้น การรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงยังทำให้การทำงานของตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) ในสมองลดลง ส่งผลให้เกิดภาวะสมองดื้อต่ออินซูลิน (brain insulin resistance) ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของจุดปรับเปลี่ยนประสานประสาท (synaptic plasticity), การลดลงของ dendritic spine และการลดลงของความสามารถในการเรียนรู้จดจำของสมอง (cognitive function) (Pratchayasakul et al., 2011; Pratchayasakul et al., 2015) โดยที่พฤติกรรมการเรียนรู้จดจำสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น Novel Object Recognition (NOR) test, Novel Object Location (NOL) test และ Morris Water Maze test (MWMT) เป็นต้น โดยที่วิธีการทดสอบเหล่านี้ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 แบบ คือ การเรียนรู้จดจำที่ขึ้นกับการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal dependent learning and memory) เช่น NOL และ MWMT และชนิดที่ 2 คือ การเรียนรู้จดจำที่ไม่ขึ้นกับการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal independent learning and memory) เช่น NOR (Vogel, Wood, 2014) โดยที่การศึกษาในหนูอ้วนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลานาน พบว่าเกิดการทำงานของสมองบกพร่อง โดยที่มีการลดลงของพฤติกรรมการเรียนรู้จดจำของสมองทั้งส่วนที่ขึ้นกับฮิปโปแคมปัสและสมองส่วนที่ไม่ใช่ฮิปโปแคมปัส (Mantor et al., 2018)

เมตฟอर्मิน เป็นยาที่ใช้สำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือโรคที่โรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย (peripheral metabolic syndrome) ที่นิยมใช้บ่อยที่สุด โดยมีกลไกการทำงานคือ สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างน้ำตาลในตับ ร่างกายมีการนำกลูโคสกลับเข้าไปในเซลล์และสามารถนำกลูโคสไปใช้ได้เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ (He et al., 2009; Labuzek et al., 2010) การศึกษาก่อนหน้านี้จากทางทีมผู้วิจัยพบว่า การใช้เมตฟอर्मินในการรักษาแบบระยะยาว มีผลช่วยลดภาวะร่างกายดื้อต่ออินซูลิน และลดความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Apaijai et al., 2012; Pintana et al., 2012) นอกจากนี้ผลดีที่เกิดขึ้นจากการลดลงของความผิดปกติข้างต้นยังสามารถป้องกันการเสื่อมของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสด้านการเรียนรู้และจดจำ ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้จากการทดสอบ MWMT (Pintana et al., 2012)

ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้จะยืนยันถึงประโยชน์ของเมตฟอर्मินต่อการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส แต่อย่างไรก็ตาม ผลของเมตฟอर्मินต่อการทำงานของสมองส่วนที่ไม่ขึ้นกับฮิปโปแคมปัสยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานไว้ว่าเมตฟอर्मินจะสามารถลดความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย และยังมีผลต่อการทำงานของสมอง ในด้านป้องกันการลดลงของกระบวนการเรียนรู้จดจำของสมองทั้งส่วนฮิปโปแคมปัส และส่วนที่นอกเหนือการทำงานของฮิปโปแคมปัส

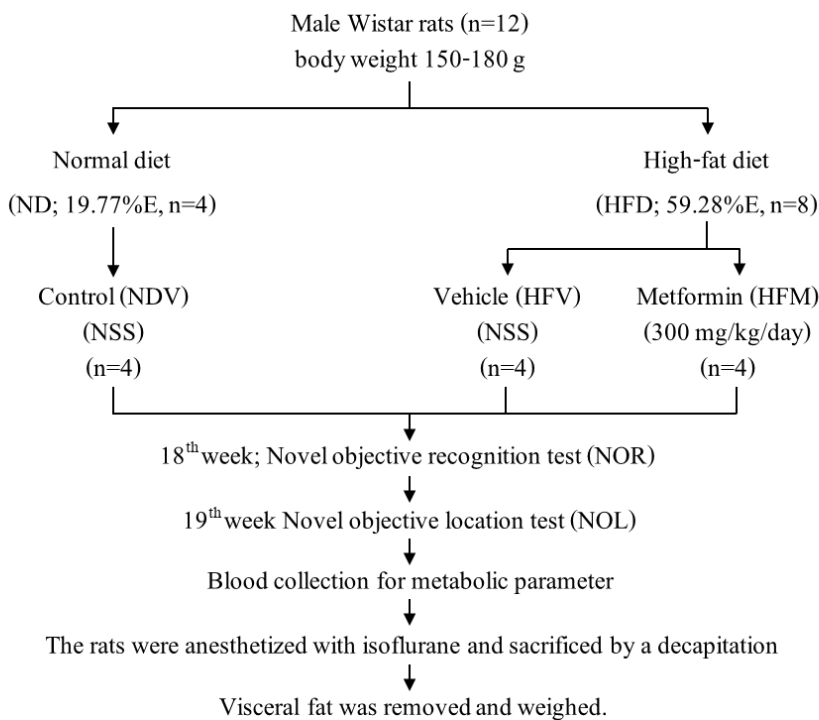
## วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการรักษาด้วยเมตฟอร์มินต่อกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และสมองส่วนที่นอกเหนือฮิปโปแคมปัส ในหนูอ้วนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลานาน

## วิธีการวิจัย

### การเตรียมสัตว์ทดลองและจริยธรรม

วิธีการวิจัยได้ผ่านความเห็นชอบโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการศึกษาหนูขาวเพศผู้จำนวนทั้งหมด 12 ตัว ถูกแบ่งกลุ่มด้วยการสุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (Normal diet; ND, n=4) ซึ่งมีปริมาณไขมันอยู่ร้อยละ 19.77 และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูง (high-fat diet; HFD, n=8) ซึ่งมีปริมาณไขมันอยู่ร้อยละ 59.28 เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 13 หนูแต่ละกลุ่มจะถูกเก็บเลือด และทำการประเมินการความผิดปกติของพฤติกรรมการเรียนรู้จดจำด้วย NOR และ NOL tests หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 14 หนูกลุ่มอาหารปกติ ได้รับการรักษาด้วยสารละลาย normal saline (NDV) ส่วนหนูกลุ่มอาหารไขมันสูงถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่ม vehicle ที่ได้รับการรักษาด้วยสารละลาย normal saline (HFV, n=4) และกลุ่มที่ได้รับเมตฟอร์มิน (HFM, n=4) ที่ขนาด 300 มก/กก/วัน โดยวิธีให้สารทางปาก ผ่านการ gavage feeding โดยหนูทุกตัวได้รับการรักษาเป็นเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์ หลังจากนั้น หนูทุกตัวได้ถูกทดสอบกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดย NOL test และกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนที่นอกเหนือจากฮิปโปแคมปัสโดย NOR test ช่วงสุดท้ายของการทดลอง หนูทุกตัวถูกงดอาหารเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากปลายหาง สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันคอเลสเตอรอลในเลือด น้ำหนักตัวถูกบันทึกเป็นรายสัปดาห์ ในขั้นตอนสุดท้าย หลังจากการทำารุณขมات ผู้วิจัยได้มีการบันทึกน้ำหนักไขมันในช่องท้อง ซึ่งวิธีการทั้งหมดได้สรุปไว้ใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนผังสรุปการทดลอง

### การวัดปริมาณไขมันคอเลสเตอรอลในเลือด

วิเคราะห์ปริมาณพลาสมาคอเลสเตอรอลด้วย commercial colorimetric assay kit (ERBA Mannheim, Mannheim, Germany)

### การทดสอบกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสด้วย NOL

การทดสอบนี้ถูกดัดแปลงเพื่อใช้วิเคราะห์กระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยการทดสอบทำในกล่องทรงสูง 50 เซนติเมตร ฐานวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 เซนติเมตร เปิดด้านบน การทดสอบประกอบด้วย 3 ช่วงเวลา ดังนี้ วันที่ 1 habituation phase หนูแต่ละตัวถูกวางลงตรงกลางของกล่อง และปล่อยให้เดินสำรวจพื้นที่ภายในกล่องได้โดยอิสระ เป็นเวลา 10 นาที; วันที่ 2 familiarization phase หนูแต่ละตัวถูกวางลงตรงกลางของกล่องที่บรรจุด้วยวัตถุที่เหมือนกันสองชิ้นภายในกล่อง และปล่อยให้สำรวจวัตถุภายในกล่องเป็นเวลา 10 นาที; วันที่ 3 test phase วันสุดท้ายของการทดสอบ ผู้วิจัยวางหนูลงในกล่องเพื่อให้สำรวจวัตถุ 2 ชิ้นภายในกล่องเป็นเวลา 10 นาที โดยที่วัตถุ 1 ชิ้นภายในกล่องจะถูกวาง ณ ตำแหน่งใหม่ โดยที่ตำแหน่งใหม่จะอยู่ตรงข้ามกับวัตถุชิ้นแรกแบบสมมาตร ผู้วิจัยทำการบันทึกเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น และคำนวณร้อยละของเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น โดยเปรียบเทียบวัตถุที่วางอยู่ตำแหน่งเดิมและตำแหน่งใหม่ (Vogel, Wood, 2014)

### การทดสอบกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนที่นอกเหนือฮิปโปแคมปัสด้วย NOR

การทดสอบนี้ถูกดัดแปลงเพื่อใช้วิเคราะห์กระบวนการเรียนรู้และจดจำที่ไม่ขึ้นกับการทำงานสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยการทดสอบทำในกล่องทรงสูง 50 เซนติเมตร ฐานวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 เซนติเมตร เปิดด้านบน การทดสอบประกอบด้วย 3 ช่วงเวลา ดังนี้ วันที่ 1 habituation phase หนูแต่ละตัวถูกวางลงตรงกลางของกล่อง และปล่อยให้เดินสำรวจพื้นที่ภายในกล่องได้โดยอิสระ เป็นเวลา 10 นาที; วันที่ 2 familiarization phase หนูแต่ละตัวถูกวางลงตรงกลางของกล่องที่บรรจุด้วยวัตถุที่เหมือนกันสองชิ้นภายในกล่อง และปล่อยให้สำรวจวัตถุภายในกล่องเป็นเวลา 10 นาที; 3 test phase หลังจากพักจากช่วง familiarization 5 นาที หนูจะถูกวางลงในกล่องอีกครั้งเพื่อให้สำรวจวัตถุ 2 ชิ้นภายในกล่องเป็นเวลา 10 นาที โดยที่วัตถุ 1 ชิ้นภายในกล่องจะถูกเปลี่ยนเป็นวัตถุชิ้นใหม่ โดยที่ขนาด พื้นผิว และวัสดุมีความแตกต่างจากวัตถุชิ้นแรก ผู้วิจัยทำการบันทึกเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น และคำนวณร้อยละของเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น โดยเปรียบเทียบวัตถุเดิมและวัตถุใหม่ (Mantor et al., 2018)

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดนำเสนอด้วย mean  $\pm$  SEM โดยเปรียบเทียบข้อมูลแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc test ด้วยระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

### สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมสาขาโรคทางไฟฟ้าของหัวใจ (CERT Center) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระยะเวลาในการวิจัย 1 ปี

## ผลการวิจัย

### ผลของการรักษาด้วยเมตฟอร์มินต่อกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย ในหนูอ้วนจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง

การศึกษาผลของการรับประทานอาหารที่ไขมันสูงของหนูในกลุ่ม HFV พบว่ามีการผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย บ่งชี้โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว น้ำหนักไขมันในช่องท้อง และการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันคอเลสเตอรอลในเลือดเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม NDV (ดังแสดงในตารางที่ 1) หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาเมตฟอร์มิน (HFM) พบว่า น้ำหนักตัว และปริมาณไขมันช่องท้องลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม HFV นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับปริมาณไขมันคอเลสเตอรอลในเลือดให้กลับมาสู่ระดับปกติได้ (ดังแสดงในตารางที่ 1) ผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเมตฟอร์มินสามารถฟื้นฟูความผิดปกติกระบวนการเผาผลาญของร่างกายในหนูอ้วนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงได้

ตารางที่ 1 ผลของเมตฟอร์มินต่อกระบวนการเผาผลาญของร่างกายในหนู ND และ HFD

Parameters	NDV	HFV	HFM
Body weight (g)	462.500 ± 9.570	587.500 ± 12.583*	495.000 ± 12.910* <sup>†</sup>
Visceral fat (g)	28.659 ± 7.104	66.141 ± 8.969*	41.238 ± 5.355* <sup>†</sup>
Plasma cholesterol (mg/dl)	61.232 ± 5.098	79.306 ± 14.306*	62.324 ± 7.158 <sup>†</sup>

หมายเหตุ: \*p<0.05 vs. NDV, <sup>†</sup>p<0.05 vs. HFV

NDV: normal diet rats with vehicle treatment

HFV: high-fat diet rats with vehicle treatment

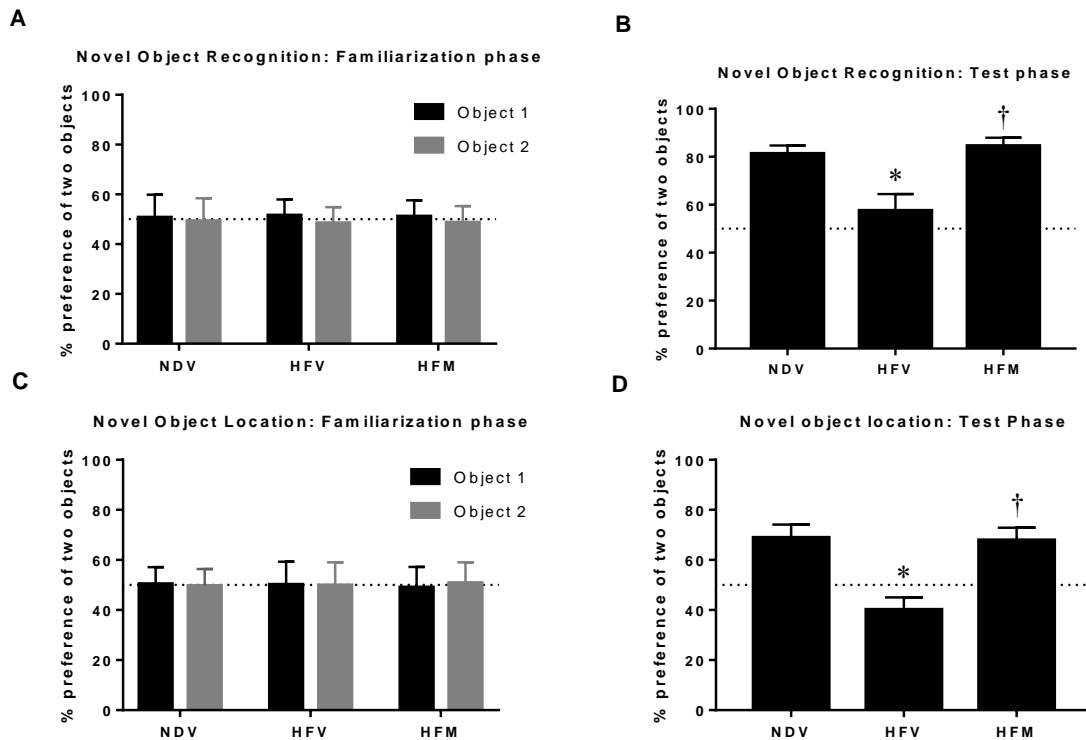
HFM: high-fat diet rats with metformin treatment

### ผลของการรักษาด้วยเมตฟอร์มินต่อการฟื้นฟูกระบวนการเรียนรู้และจดจำของการทำงานของสมองทั้งส่วนฮิปโปแคมปัสและส่วนที่นอกเหนือฮิปโปแคมปัส ในหนูอ้วนจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง

จากการทดสอบด้วย NOL พบว่าในช่วง familiarization phase เวลาที่หนูแต่ละกลุ่มใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้น ไม่มีความแตกต่างกัน และเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุไม่มีความแตกต่างจากระดับร้อยละ 50 (ดังแสดงในภาพที่ 2A) ต่อมาในช่วง test phase ระยะเวลาของการสำรวจในตำแหน่งใหม่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม HFV เมื่อเทียบกับ NDV (ดังแสดงในภาพที่ 2B) และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเมตฟอร์มินพบว่าสามารถเพิ่มระยะที่ใช้ในการสำรวจวัตถุ ณ ตำแหน่งใหม่ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม HFV (ดังแสดงในภาพที่ 2B)

นอกจากนี้ผลจากการทดสอบด้วย NOR พบว่า ผลที่เกิดขึ้นเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการทดสอบด้วย NOL โดยที่การทดสอบในช่วง familiarization phase นั้นไม่มีความแตกต่างของระยะเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้น (ดังแสดงในภาพที่ 2C) ต่อมาเมื่อทำการทดสอบในช่วง test phase พบว่าเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม HFV เมื่อเทียบกับกลุ่ม NDV (ดังแสดงในภาพที่ 2D) ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเมตฟอร์มินพบว่า เมตฟอร์มินสามารถช่วยเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม HFV (ดังแสดงในภาพที่ 2D) ซึ่งผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า การรับประทานอาหารไขมันสูงในระยะยาวทำให้เกิดการเรียนรู้และจดจำของสมองบกพร่อง ทั้งสมองในส่วนฮิปโปแคมปัส และสมองส่วนที่นอกเหนือจากฮิปโปแคมปัส และการ

รักษาด้วยเมตฟอร์มินจะทำให้การทำงานของสมองทั้งสองส่วนดีขึ้นในหนูที่มีภาวะอ้วนจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง



ภาพที่ 2 ผลของเมตฟอร์มินในการทดสอบการเรียนรู้และจดจำด้วยแบบทดสอบ NOR และ NOL (A): novel object location test in familiarization phase; (B) novel object location test in test phase; (C) novel object recognition test in familiarization phase; (D) novel object recognition test in test phase

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  vs. NDV, † $p < 0.05$  vs. HFV

NDV: normal diet rats with vehicle treatment

HFV: high-fat diet rats with vehicle treatment

HFM: high-fat diet rats with metformin treatment

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของภาวะอ้วนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการรับประทานอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน และผลการรักษาด้วยเมตฟอร์มินต่อความสามารถในการเรียนรู้จดจำของสมอง พบว่ามีความสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการรับประทานอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะอ้วนร่วมกับระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และส่งผลให้ความสามารถในการเรียนรู้จดจำลดลง การรักษาด้วยเมตฟอร์มินนั้นสามารถลดความผิดปกติของระบบการเผาผลาญของร่างกายได้ และช่วยให้การทำงานของสมองในส่วนฮิปโปแคมปัสดีขึ้น (Pintana et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ได้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าการรักษาด้วยเมตฟอร์มินนั้นยังสามารถช่วยทำให้การทำงานของสมองส่วนที่นอกเหนือฮิปโปแคมปัสทำงานได้ดีขึ้นเช่นกัน ในโมเดลของหนูที่มีภาวะอ้วนและดื้อต่ออินซูลิน

การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันในปริมาณสูง เป็นที่ทราบกันดีว่าคือสาเหตุของการนำไปสู่ภาวะอ้วน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า หนูที่รับประทานอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงของระบบเผาผลาญของร่างกายที่ผิดปกติไป โดยพบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและมีการสะสมไขมันในช่องท้อง (Pintana et al., 2012; Pratchayasakul et al., 2011) มากไปกว่านั้นการรับประทานอาหารไขมันสูงยังทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงกว่าปกติ จากการรับประทานอาหารไขมันสูงผ่านระบบย่อยอาหารเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไลโปไมครอน (chylomicron) และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลโปโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase enzyme) ที่อยู่ในหลอดเลือด นำเข้าสู่ตับในรูป cholesterol remnant ภายในตับมีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยเริ่มจาก acetoacetyl-CoA และถูก HMG-CoA reductase enzyme เปลี่ยนให้เป็น mevalonic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยปกติแล้วคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างจากตับจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จึงต้องอาศัยโปรตีนที่ชื่อว่า ไลโปโปรตีน (lipoprotein) ที่ทำหน้าที่ขนย้ายคอเลสเตอรอล ไปกับกระแสเลือด (Nguyen et al., 2008) ดังนั้นเมื่อตับมีการรับเอาสารตั้งต้นที่เป็นไขมันเข้าไปมากขึ้นจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง จึงมีการสร้างคอเลสเตอรอลเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงกว่าปกติ เป็นที่น่าสนใจที่การศึกษานี้ กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเมตฟอร์มินพบว่า ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลให้กลับมาสู่ระดับปกติได้นอกจากนี้แล้ว ผลจากการรักษาด้วยเมตฟอร์มินในการศึกษานี้ยังพบว่าสามารถลดน้ำหนักตัว และปริมาณไขมันในช่องท้องในหนูอ้วนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง เนื่องจากกลไกของเมตฟอร์มินที่ไปยับยั้งการทำงานของ complex I ของไมโทคอนเดรียในตับ ทำให้การสร้าง ATP ลดลง กระตุ้นการทำงานของ AMPK ส่งผลให้ลดกระบวนการสร้างไขมันและคอเลสเตอรอลจากตับ ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง อีกทั้งการสร้าง ATP ที่ลดลงในตับ (Rena et al., 2013) กระตุ้นให้ร่างกายเกิดการสลายไขมันเพื่อนำไปสร้างเป็นพลังงานมากขึ้น ส่งผลให้น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันลดลง

นอกจากการรับประทานอาหารไขมันสูงจะทำให้เกิดความผิดปกติของระบบเผาผลาญพลังงานของร่างกายแล้ว ยังส่งผลเสียต่อระบบประสาทส่วนกลางด้านการเรียนรู้จดจำของสมอง โดยจากที่กล่าวมาข้างต้นนั้น การที่มีคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือดเพิ่มสูงมากขึ้น ทำให้เซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายเกิดการนำคอเลสเตอรอลและไขมันเข้าไปเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างพลังงาน และการหายใจระดับเซลล์ ผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเหล่านี้คือการเกิดอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species) ขึ้นในเซลล์ ตัวอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถไปทำลายระบบต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติไป เช่น ทำให้ไมโทคอนเดรียเสียหาย, กระตุ้นให้เซลล์หลั่งสารสื่ออักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นนี้ไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อระบบของร่างกาย แต่ยังส่งผลกระทบต่อสมอง โดยที่การเพิ่มขึ้นของไขมันร่วมกับสารสื่ออักเสบในเลือด สามารถเข้าสู่สมอง และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในสมอง การทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองลดลง (Chunchai et al., 2018; Gimenez da Silva-Santi et al., 2018; Pintana et al., 2012; Pipatpiboon et al., 2013; Pipatpiboon et al., 2012) โดยสมองส่วนที่ได้รับผลกระทบนั้น เกิดได้ทั้งสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่มีหน้าที่ในเรื่องของการเรียนรู้จดจำ และสมองส่วนคอร์เทกซ์ (cortex) ที่ช่วยในด้านการเรียนรู้ที่นอกเหนือจากการทำงานของฮิปโปแคมปัส ซึ่งส่งผลให้การปรับเปลี่ยนจุดประสานประสาท (neuroplasticity) ลดลง จนทำให้การเรียนรู้จดจำของสมองลดน้อยลง (Mantor et al., 2018) ซึ่งการเรียนรู้จดจำของสมองนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือการเรียนรู้จดจำที่ขึ้นกับสมองส่วนฮิปโปแคมปัส หรือที่เรียกว่า ความจำชัดแจ้ง (explicit memory) เป็นประเภทหนึ่งของความจำระยะยาว ซึ่งกระบวนการเรียนรู้จดจำของความจำชนิดนี้ต้องอาศัยการรับรู้ การรู้สึกตัว และความตั้งใจในขณะที่เรียนรู้และจดจำ เช่น ความจำในรูปแบบของเหตุการณ์ หรือความจริง (facts) เป็นต้น ส่วนการเรียนรู้จดจำที่ไม่ขึ้นกับสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เรียกว่า ความจำโดยปริยาย (implicit memory) หมายถึงความจำที่ไม่ได้อยู่ได้

อำนาจจิตใจ ไม่อาศัยการรับรู้หรือรู้สึกตัวขณะทำงาน เช่นทักษะต่าง ๆ , การขับรถ, การตอบสนองต่อความกลัว เป็นต้น (Dharani, 2015)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การรักษาด้วยเมตฟอร์มินสามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และจดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และส่วนที่ไม่ขึ้นกับฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นคาดว่าเป็นผลจากการรักษาด้วยเมตฟอร์มินส่งผลทำให้ปัจจัยต่าง ๆ ดีขึ้น ได้แก่ การที่คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง และกระบวนการเผาผลาญพลังงานของร่างกายดีขึ้น การผลิต oxidative stress ในสมองลดลง ไมโทคอนเดรียในสมองทำงานได้ดีขึ้น ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของจุดปรับเปลี่ยนประสานประสาทในสมอง จากการรักษาด้วยเมตฟอร์มิน ด้วยเหตุนี้ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าเมตฟอร์มินมีผลช่วยในด้านการฟื้นฟูระบบเผาผลาญของร่างกาย และช่วยฟื้นฟูการทำงานของสมองในหนูอ้วนที่ถูกให้น้ำด้วยอาหารไขมันสูง

จากทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า การรับประทานที่มีไขมันสูง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทั้งในเรื่องของระบบเผาผลาญของร่างกาย และการทำงานของสมอง ซึ่งเมตฟอร์มินมีผลในการช่วยลดความรุนแรงของภาวะอ้วน และความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบของร่างกาย โดยสามารถรักษาระดับของไขมันในเลือดให้ปกติ อีกทั้งยังสามารถฟื้นฟูการทำงานของสมองด้านการเรียนรู้จดจำของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และการเรียนรู้จดจำในส่วนที่ไม่ขึ้นกับการทำงานของฮิปโปแคมปัสได้อีกด้วย

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (RTA6080003 to SCC, TRG6080005 to NA), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) (to NC) และ Chiang Mai University Center of Excellence Award (to NC)

#### เอกสารอ้างอิง

- Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology* 2012; 153: 3878-85.
- Chunchai T, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The possible factors affecting microglial activation in cases of obesity with cognitive dysfunction. *Metab Brain Dis* 2018; 33: 615-35.
- Dharani K. *Memory the biology of thought: a neuronal mechanism in the generation of thought - a new molecular model*. USA: Academic Press; 2015.
- Gimenez da Silva-Santi L, Masetto MA, Mori MA, Biesdorf de Almeida-Souza C, Vergilio JV, Carbonera F, et al. Brain fatty acid composition and inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. *Nutrients* 2018; 10.
- He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, et al. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell* 2009; 137: 635-46.
- Krishna S, Lin Z, de La Serre CB, Wagner JJ, Harn DH, Pepples LM, et al. Time-dependent behavioral, neurochemical, and metabolic dysregulation in female C57BL/6 mice caused by chronic high-fat diet intake. *Physiol Behav* 2016; 157: 196-208.



- Labuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopien B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 956-65.
- Mantor D, Pratchayasakul W, Minta W, Sutham W, Palee S, Sripetchwande J, et al. Both oophorectomy and obesity impaired solely hippocampal-dependent memory via increased hippocampal dysfunction. *Exp Gerontol* 2018; 108: 149-58.
- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008; 92: 272-83.
- Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci* 2012; 91: 409-14.
- Pipatpiboon N, Pintana H, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption. *Eur J Neurosci* 2013; 37: 839-49.
- Pipatpiboon N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. PPARgamma agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology* 2012; 153: 329-38.
- Pratchayasakul W, Kerdphoo S, Petsophonsakul P, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. *Life Sci* 2011; 88: 619-27.
- Pratchayasakul W, Sa-Nguanmoo P, Sivasinprasasn S, Pintana H, Tawinvisan R, Sripetchwande J, et al. Obesity accelerates cognitive decline by aggravating mitochondrial dysfunction, insulin resistance and synaptic dysfunction under estrogen-deprived conditions. *Horm Behav* 2015; 72: 68-77.
- Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 2013; 56: 1898-906.
- Underwood EL, Thompson LT. High-fat diet impairs spatial memory and hippocampal intrinsic excitability and sex-dependently alters circulating insulin and hippocampal insulin sensitivity. *Biol Sex Differ* 2016; 7: 9.
- Vogel AC, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2014; 69: 8-17.