

Kepadatan Sel Hipokampus Insulin Imunoreaktif pada Formasi Hipokampus Mencit yang Diinduksi Berulang dengan Streptozotosin

(THE DENSITY OF HIPPOCAMPUS INSULIN IMMUNOREACTIVE CELLS
IN HIPPOCAMPUS FORMATION OF REPEAT STREPTOZOTOSIN INDUCED MICE)

Erwin¹, Tri Wahyu Pangestiningih², Sitarina Widayari³

¹Mahasiswa Pascasarjana Progam Studi Sain Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada;
Lab Klinik Hewan FKH Universitas Syiah Kuala
Jln Tgk Kreung Kalee No 4 Banda Aceh
Email: erwin2102@gmail.com

²Bagian Anatomi, ³Bagian Patologi, FKH UGM,
Jln Fauna No 2 Kampus UGM, Jogjakarta 55281

ABSTRAK

Keberadaan insulin dalam hipokampus menandakan keterlibatannya dalam fungsi kognisi otak, seperti fenomena belajar dan memori. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif pada formasi hipokampus mencit galur *Balb-C* yang diinduksi berulang dengan streptozotosin sebagai hewan model diabetes mellitus. Sebanyak 30 ekor mencit jantan galur *Balb-C*, umur 12-14 minggu dengan bobot badan 30-40 g dikelompokkan menjadi dua kelompok perlakuan, setiap kelompok terdiri dari 15 ekor. Kelompok I (KI) diberikan pelarut streptozotosin, sedangkan kelompok II (KII) diberikan streptozotosin dengan dosis 40 mg/kg bb dalam 50 mM sodium sitrat buffer pH 4,5 secara intra peritoneal sebanyak 0,5 ml selama lima hari berturut-turut. Mencit dari masing-masing kelompok dikorbankan sebanyak dua ekor pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan, dan diperfusi serta dikorbankan nyawanya dan dinekropsi untuk mengambil jaringan otak. Sampel otak diproses secara histologi dan dilanjutkan dengan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan antibodi *mouse* antiinsulin. Kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif pada formasi hipokampus KI lebih padat dibandingkan KII yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$), begitu juga dengan waktu pengamatan dan interaksi antara kelompok dan waktu pengamatan menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan induksi streptozotosin dosis rendah berulang menyebabkan penurunan kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif.

Kata-kata kunci: streptozotosin, diabetes mellitus, insulin, formasi hipokampus, hewan model.

ABSTRACT

The presence of insulin in the hippocampus may indicate its involvement in brain cognitive function, such as learning and memory phenomena. The purpose of this study was to find out the density of hippocampus insulin immunoreactive cells in hippocampus formation in *Balb-C* mice which treated with streptozotosin repeated as the animal model of diabetes mellitus. Thirty male mice *Balb-C* strain, aged 12-14 weeks, weight 30-40 g, divided into 2 treatment groups, each group consisted of 15 individuals. Group I (KI) was treated with sodium citrate buffer, while group II (K2) was treated with streptozotosin at dose 0,5 ml of 40 mg/kg bw in 50 mM sodium citrate buffer pH 4.5 in intra-peritoneal of for five consecutive days. Every two animals from each group euthanasia and necropsied on day 7, 14, 21 and 28 respectively after the administration of treatment. Subsequently, the brain tissues were collected and fixated in NBF 10%. Brain sampel were the processed immunohistochemically using anti-insulin mouse antibody. The density of hippocampus insulin immunoreactive cells in hippocampus formation in group 1 were higher compared to group 2. This comparasion as well as the time of observation and interaction between group and time showed significant differences ($p<0.05$). it can be concluded that low-dose induction of repeated streptozotosin may cause a decrease in density of hippocampus insulin imunoreaktif cell.

Keywords: *streptozotosin, diabetes mellitus, insulin, hippocampus formation, animal model.*

PENDAHULUAN

Kencing manis atau *Diabetes mellitus* (DM) adalah suatu gangguan metabolik yang ditandai dengan keadaan hiperglikemia yang berkaitan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. *Diabetes mellitus* ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah yang melebihi batas normal akibat peningkatan glukoneogenesis dan glikogenolisis. Menurut data *World Health Organization* (WHO), prevalensi DM di seluruh dunia diproyeksikan meningkat dari 2,8 % pada tahun 2000 menjadi 4,4% pada tahun 2030 dan jumlah tersebut diperkirakan terus meningkat (Wild *et al.*, 2004). Berdasarkan etiologinya DM dibagi menjadi DM tipe 1 dan DM tipe 2. *Diabetes mellitus* tipe 1 disebabkan oleh reaksi autoimun terhadap sel beta Langerhans pankreas, sehingga produksi insulin sangat sedikit. *Diabetes mellitus* tipe 2 paling sering ditemukan, terutama yang disebabkan oleh berkurangnya jumlah reseptor insulin pada permukaan sel. *Diabetes mellitus* yang tidak dikelola dengan baik, mengakibatkan terjadinya berbagai komplikasi, terutama yang didasari oleh mekanisme mikroangiopati. Manifestasi yang timbul antara lain penyakit serebrovaskuler, kardio-vaskuler, retinopati, nefropati, dan neuropati. Neuropati sering muncul berupa hilangnya rasa akibat gangguan pada saraf yang pada akhirnya menyebabkan kematian neuron yang bersifat *irreversible* (Suyono *et al.*, 2007).

Jiang *et al.*, (2008) melaporkan penemuan insulin di jaringan otak pada tahun 1978 membuktikan tersebarnya insulin secara luas dalam sistem saraf pusat (SSP) yang berperan dalam metabolisme energi di otak, meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan saraf, mengatur aktivitas saraf, dan pelepasan neurotransmitter. Keberadaan insulin dalam hipokampus dan korteks serebral menandakan keterlibatannya dalam fungsi kognisi otak seperti fenomena belajar dan memori. Insulin telah terbukti dapat memberikan suatu peningkatan memori pada manusia dan hewan, namun demikian keberadaan insulin di perifer seperti pada jaringan adiposa, otot, dan hati lebih berperan untuk mengatur homeostasis glukosa (Zhao dan Alkon, 2001).

Pada hewan model, DM sering disebabkan akibat pemberian streptozotosin (STZ), aloksan, asam urat, asam dehidroaskorbat, asam dialurat, dan asam ksanturenat yang dapat

mengakibatkan kerusakan pada sel beta Langerhans pankreas. Streptozotosin bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), akibatnya terjadi gangguan produksi insulin oleh sel beta Langerhans pankreas dan sintesis insulin secara lokal oleh neuron di otak (Wilson dan LeDoux, 1989; Rowland dan Bellush; 1989; Izumi *et al.*, 2003). Pemberian STZ dengan dosis rendah berulang dapat menginduksi apoptosis dan menyebabkan nekrosis sel beta Langerhans pankreas (Bolzan dan Bianchi, 2002). Mekanisme apoptosis sel beta Langerhans pankreas berhubungan dengan sintesis insulin secara lokal di otak dan distribusi insulin melalui pembuluh darah ke otak. Pada kondisi DM jumlah insulin yang beredar di dalam darah menuju ke otak akan berkurang, sedangkan kadar glukosa darah meningkat. Insulin berperan penting dalam metabolisme glukosa di saraf, seperti aktivasi sinaps, pelepasan neurotransmitter, pelepasan kalsium/ Ca^{2+} intraseluler, dan neuropeptida (Jonas *et al.*, 1997). Izumi *et al.*, (2003) melaporkan dalam upaya pengembangan hewan model untuk DM yang diinduksi dengan STZ untuk mempelajari penurunan fungsi kognisi pada pasien DM, telah diamati bahwa tikus yang diinduksi STZ menunjukkan terjadinya gangguan pada sinaptik plastisitas dan belajar. *Long-term potentiation* (LTP) secara luas dianggap sebagai model sinaptik untuk pengolahan informasi yang mendasari pembentukan memori dan belajar, korelasi antara perubahan dan gangguan kinerja LTP dalam tes pembelajaran spasial telah dilaporkan dalam beberapa penelitian. Gangguan sintesis insulin dan aktivitas insulin menyebabkan defisit dalam belajar dan pembentukan memori (Zhao dan Alkon, 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif (H-IIR) mencit galur *Balb-C* yang diinduksi berulang dengan STZ untuk membuat perlakuan DM menggunakan *mouse* antibodi terhadap insulin dengan pewarnaan imunohistokimia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif pada formasi hipokampus mencit galur *Balb-C* yang menderita DM. Data yang diperoleh diharapkan bermanfaat dalam mempelajari peran insulin dalam belajar dan memori.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit jantan galur *Balb-C* umur 12-14 minggu dengan bobot badan 30-40 g. Hewan percobaan secara acak dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, masing-masing kelompok berjumlah 15 ekor mencit. Kelompok dua hanya diberikan sodium sitrat buffer pH 4,5 sebagai kontrol negatif, sedangkan kelompok II diberi perlakuan DM melalui injeksi streptozotisin 40 mg/kg BB dalam sodium sitrat buffer pH 4,5 secara intra peritoneal sebanyak 0,5 ml selama lima hari berturut-turut. Hewan percobaan dari masing-masing kelompok dikorbankan sebanyak dua ekor pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan. Mencit tersebut diperfusi, dikorbankan nyawanya dan dinekropsi untuk mengambil jaringan otak, kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Irisan otak yang telah diwarnai dengan antibodi *mouse antiinsulin* dilakukan penilaian dengan cara menghitung kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif (H-IIR) (berwarna coklat) pada seluruh formasi hipokampus dengan pembesaran 40X. Kepadatan sel H-IIR dihitung berdasarkan jumlah sel yang imunoreaktif dari 100 sel yang dihitung.

Perfusi Sampel

Mencit dibius dengan ketamin hidroklorida dengan dosis 20 mg/kg bobot badan secara intramuskular. Dalam keadaan teranastesi rongga toraks dibuka dan diperfusi secara intrakardial dengan NaCl fisiologi yang ditambah EDTA dengan kecepatan 5 mL/menit pada suhu 38°C sebagai *pre-rinse* melalui ventrikel kiri. Setelah jantung membesar terisi larutan *pre-rinse*, maka atrium kanan dibuka dengan cara digunting untuk mengeluarkan larutan *pre-rinse*. Apabila larutan yang keluar tidak lagi mengandung darah, larutan perfusi diganti dengan *paraformaldehid* 2% dalam *phosphate buffered* 0,1 M sebagai larutan perfusi. Setelah proses perfusi selesai hewan didekapitasi, kemudian medulla spinalis diambil sampai ke pangkal dan disimpan dalam larutan fiksasi *paraformaldehid* 2% dalam *phosphate buffered* 0,1 M.

Pewarnaan Imunohistokimia

Penelitian ini menggunakan metode *streptavidin peroksidase* produk Lab Vision. Metode ini merupakan modifikasi dari metode

tidak langsung, antigen yang telah berikatan langsung dengan antibodi primer, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinilasi (terkonjugat dengan biotin). Pada setiap ujung tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat mengikat molekul avidin. Dengan meneteskan larutan *streptavidin peroksidase*, maka antibodi sekunder membentuk ikatan kompleks dengan avidin melalui biotin. Biotin pada *streptavidin* diikat dengan peroksidase dan enzim tersebut divisualisasikan melalui ikatannya dengan substrat yang telah diberi kromogen. Potongan jaringan otak yang telah terfiksasi pada gelas objek dipanaskan selama dua jam pada suhu 60°C. Deparafinasi dan rehidrasi dengan xilol I, xilol II, xilol III, dan etanol absolut I, II dan III, etanol 90%, etanol 80%, dan etanol 70%. Preparat tersebut dicuci dengan larutan *phosfat buffer solution* (PBS), *blocking endogenous* peroksidase dengan larutan H_2O_2 3% dalam aquades selama 30 menit, kemudian dicuci dengan larutan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. *Ultra V block* selama 5 menit dengan *goat serum* dan teteskan antibodi primer *mouse antiinsulin* (1:300) dan diinkubasikan selama satu malam dalam lemari es, kemudian dicuci dengan larutan PBS. Antibodi sekunder yang digunakan adalah *biotinylated goat anti-polyvalent* yang ditetaskan pada jaringan selama 10 menit, kemudian dicuci dengan larutan PBS. Tahap berikutnya adalah pemberian konjugat enzim *streptavidin peroksidase* selama 10 menit dan dicuci kembali dengan larutan PBS. Substrat dan kromogen DAB ditetaskan, lalu diinkubasikan selama 10 menit pada suhu ruangan dalam suasana gelap. Langkah terakhir adalah pencucian jaringan dengan larutan aquades dan untuk mendapatkan hasil yang baik dilakukan *counter stain* dengan hematoksin selama 10 detik, dan kemudian dicuci dengan air mengalir dan aquades. Tahap akhir adalah dehidrasi jaringan dengan etanol bertingkat, *clearing* dengan xilol, dan *mounting permanent* jaringan dengan balsem kanada (Lab Vision, Cat#MS-1378-PO). Untuk memperoleh data kuantitatif kepadatan sel H-IIR dilakukan uji statistika menggunakan sidik ragam, sedangkan untuk melihat perbedaan, antara masing-masing waktu pengamatan dilanjutkan dengan uji Duncan. Semua data tersebut diolah dengan program SPSS 18.

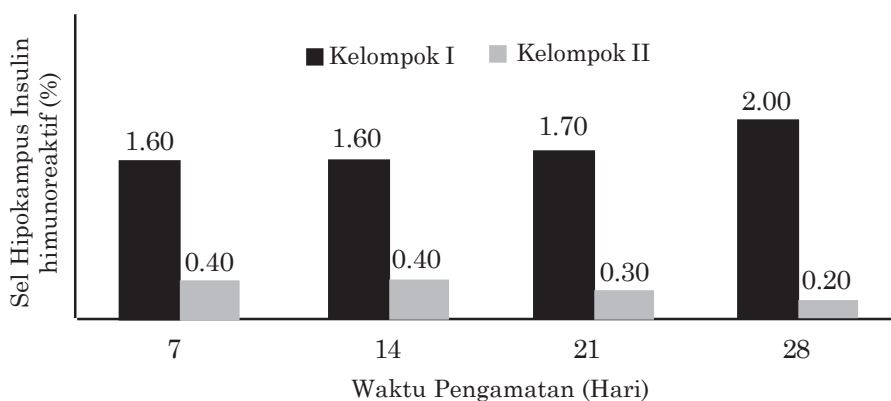
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan kepadatan sel H-IIR ditemukan pada membran sel, dendrit sel pyramidal, dan granuler yang diperlihatkan dengan terbentuknya warna coklat kuat atau lemah (Gambar 2). Pada kelompok I, sel-sel yang imunoreaktif terhadap insulin terlihat lebih banyak (warna coklat) dibandingkan kelompok II (Gambar 1). Kepadatan sel H-IIR antara kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Penurunan kepadatan sel H-IIR hari ke-7 pada kelompok II menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok I ($P < 0,05$). Kepadatan sel H-IIR turun pada hari ke-14, 21, dan terus menurun sampai hari ke-28 yang berbeda signifikan dengan kelompok I ($P < 0,05$) (Gambar 1). Secara statistik kepadatan sel H-IIR di masing-masing waktu pengamatan kelompok I dan kelompok II tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) (Gambar 1).

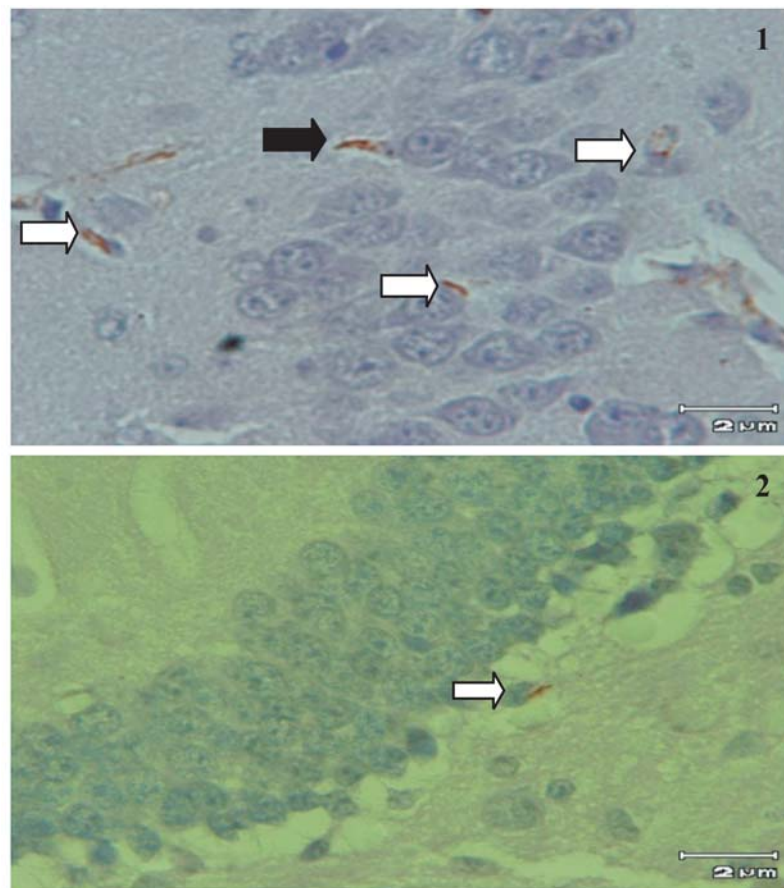
Kepadatan sel H-IIR menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok perlakuan ($P < 0,05$) berupa penurunan kepadatan sel H-IIR pada mencit kelompok II yang diinduksi STZ, namun tidak terjadi perbedaan yang signifikan pada waktu pengamatan ($P > 0,05$). Penurunan kepadatan sel H-IIR hari ke-7 mencit kelompok II berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan mencit kelompok I. Kepadatan sel H-IIR terus menurun sampai hari ke-28. Menurunnya kepadatan sel H-IIR menandakan berkurangnya sintesis insulin oleh sel-sel neuron hipokampus, akibat induksi STZ

(McGavin dan Zachary, 2007). Zhao dan Alkon (2001) mengemukakan meskipun asal insulin di otak telah menjadi isu kontroversial untuk beberapa tahun, bukti-bukti menunjukkan bahwa insulin diangkut ke otak dari jaringan perifer melalui cairan serebro-spinal. Selain itu insulin juga disintesis secara lokal oleh neuron dalam otak. Hal tersebut serupa dengan hasil pengamatan kepadatan sel H-IIR dalam penelitian ini. Marks *et al.*, (1988) dan Schwartz *et al.*, (1992) melaporkan konsentrasi mRNA insulin terlihat paling tinggi pada sistem limbik, dan hipokampus merupakan salah satu bagian dari sistem limbik.

Pada formasi hipokampus, kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif turun pada hari ke-7 dan terus menurun hingga hari ke-28. Penurunan kepadatan sel H-IIR tersebut diakibatkan oleh induksi STZ, namun sel saraf tidak sama dengan sel beta Langerhans pankreas yang dapat beregenerasi dan kembali mensintesis insulin. Sel saraf merupakan jenis sel yang sulit beregenerasi, sehingga sintesis insulin masih rendah pada hari ke-28 (McGavin dan Zachary, 2007). Penurunan kepadatan sel H-IIR menandai terjadinya gangguan pembentukan memori pada mencit dengan kondisi DM. Hipokampus merupakan komponen utama dari sistem limbik, yang memiliki area-area dengan fungsi berbeda dalam menjalankan aktivitasnya. Area *cornu ammonis* 3 dari hipokampus tikus merupakan area yang berperan penting dalam belajar dan pembentukan memori jangka panjang (Izumi *et al.*, 2003).



Gambar 1: Rataan kepadatan sel H-IIR (%). Berdasarkan uji statistik kepadatan sel H-IIR pada formasi hipokampus KI lebih padat dibandingkan KII yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), begitu juga dengan periode waktu pengamatan dan interaksi antara kelompok dan waktu pengamatan menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan induksi streptozotosin dosis rendah berulang menyebabkan penurunan kepadatan sel hipokampus insulin imunoreaktif.



Gambar 2: Mikrografi sel H-IIR hari ke-21 dengan pewarnaan imunohistokimia. Kelompok I dan Kelompok II. Tanda panah hitam menunjukkan sel yang imunoreaktif terhadap insulin pada dendrit, sedangkan tanda panah putih menunjukkan sel yang imunoreaktif terhadap insulin pada membran sel.

Insulin di samping berperan dalam pengaturan glukosa darah, juga berperan dalam pengaturan fungsi sistem saraf. Indikasi peran insulin dalam sistem saraf telah dibuktikan dengan ditemukannya insulin dan reseptor insulin dalam area kognisi utama di otak. Aktivitas insulin di otak berkaitan dengan *dementia* yang merupakan sindrom yang berhubungan dengan penurunan kemampuan kognisi *ability*, insulin juga mengatur kemampuan memori dengan merangsang pusat lokus spesifik dan injeksi insulin secara intraserebroventrikuler dapat meningkatkan memori pada tikus (Jiang *et al.*, 2008). Dalam belajar dan memori, insulin memodulasi *sinaptik plastisitas* dengan bertindak pada reseptor glutamatergic dan GABAergic. Pada hipotalamus insulin dapat memainkan peran tidak langsung dalam regulasi metabolisme glukosa perifer, proses belajar, dan memori terutama yang terletak di hipokampus. Peran ini lebih cenderung disebabkan oleh modulasi langsung dari aktivitas reseptor di neuron dan sel-sel glia. Bukti telah

menunjukkan bahwa signal insulin memainkan peran penting dalam sinaptik plastisitas dengan bertindak pada transmisi kedua glutamatergic dan *gamma-aminobutyric acid* (GABA). Terpaparnya reseptor *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) menyebabkan insulin dalam waktu singkat memicu dengan cepat terhadap tanggapan potensial dari NMDA, yang dapat dimediasi oleh sub tipe reseptor NMDA. Reseptor NMDA berperan penting pada sinaptik plastisitas dalam pembelajaran dan pembentukan memori (Zhao *et al.*, 2004).

Biessels *et al.*, (1996) melaporkan bahwa pemberian senyawa STZ dapat menimbulkan kerusakan sel beta Langerhans pankreas tikus untuk induksi DM, sehingga akan menimbulkan penurunan yang parah dalam kemampuan belajar dan pembentukan memori. Penurunan tersebut telah dibuktikan dengan tes tugas labirin di air. Pemberian insulin pada kondisi ini juga secara jelas dapat mencegah kehilangan memori dan kerusakan sinaptik plastisitas.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil simpulan bahwa induksi STZ dengan dosis rendah secara berulang menyebabkan penurunan kepadatan sel H-IIR, begitu juga dengan waktu pengamatan yang berbeda memengaruhi kepadatan sel H-IIR pada mencit.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat efek diabetogenik dari streptozotosin dengan waktu pengamatan yang lebih lama. Disarankan bagi penderita *diabetes mellitus* untuk mengelola dengan baik guna mencegah berbagai komplikasi dengan cara mengatur pola makanan rendah karbohidrat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) melalui Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS), Rektor Universitas Syiah Kuala dan Pemerintah Provinsi Aceh atas bantuan beasiswa yang diberikan untuk melaksanakan studi pascasarjana pada tahun 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens WD, Gispen WH. 1996. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotosin-induced diabetic rats. *Diabetics* 45: 1259-1266.
- Bolzan AD, Bianchi MS. 2002. Genotoxicity of streptozotosin. Review. *Mutation Research* 512: 121-134.
- Izumi K, Yamada KA, Matsukawa M, Zorumski CF. 2003. Effect of insulin on long-term potentiation in hippocampal slices from diabetic rats. *Journal Diabetologia* 46: 1007-1012.
- Jiang L, Zhang Y, Wu Y, Song F, Guo D. 2008. Effect of insulin on the cognizing function and expression of hippocampal A β ₁₋₄₀ of rat with Alzheimer disease. *Chinese Medical Journal* 121: 827-831.
- Jonas E, Knox RJ, Smith TC, Wayne NL, Connor JA, Kaczmarek LK. 1997. Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature* 385: 343-346.
- Lab Vision, Cat#MS-1378-PO. Mouse antiinsulin. Immunohistochemistry product. Thermo Fisher Scientific Inc, Kalamazo, MI 49008.
- Marks JL, Maddison J, Eastman CJ. 1988. Subcellular localization of rat brain insulin binding sites. *Journal Neurochem* 50: 774-781.
- McGavin MD, Zachary JF. 2007. *Pathology basis of veterinary disease*. Academic Press. 4th edition. Missouri. Elsevier Mosby.
- Rowland NE, Bellush LL. 1989. Diabetes Mellitus: Stress. *Neurochemistry and Behavior. Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 13: 99-206.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte DJr. 1992. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energybalance. *Endocrine. Rev* 13: 387-414.
- Suyono S, Waspadji S, Soegondo S, Soewondo P. 2007. Kecenderungan peningkatan jumlah penyandang diabetes. Penatalaksanaan diabetes mellitus terpadu. Jakarta. Pusat Diabetes dan Lipid RSUP Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo. FKUI.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1453.
- Wilson GL, LeDoux SP. 1989. The Role of Chemical in The Etiology of Diabetes Mellitus. *Journal Toxicologic Pathology* 17: 357-362.
- Zhao WQ, Alkon D.L. 2001. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Jurnal Molecular and Cellular Endocrinology* 177: 125-134.
- Zhao WQ, Hui C, Quon MJ, Alkon DL. 2004. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European Journal of Pharmacology* 490: 71-78.