

## تأثیر پیش‌درمانی با متفورمین بر روی اختلالات رفتاری ناشی از آسیب‌های ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز در موش صحرایی

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۵

پویا سعیدعسکری<sup>۱</sup>، ایمان فاطمی<sup>۲</sup>، الهام حکیمی‌زاده<sup>۳</sup>، آیت کائیدی<sup>۳</sup>، سوگند اسماعیل‌مقدم<sup>۱</sup>، محمد پاک‌هاشمی<sup>۱</sup>،  
محمد اله توکلی<sup>۳\*</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران ۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳. مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

### چکیده

**مقدمه و هدف:** متفورمین به عنوان یک داروی خوراکی ضد دیابت، دارای اثر ضد رادیکال آزاد و محافظت‌کننده نوروپی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات احتمالی پیش‌درمانی متفورمین در ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز در موش صحرایی انجام شد.

**روش کار:** در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر با نژاد ویستار (۲۲۰-۲۰۰ گرم) مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات به‌طور تصادفی در ۴ گروه ده‌تایی شامل: گروه ایسکمیک، گروه ایسکمیک+متفورمین و گروه متفورمین توزیع شدند. متفورمین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز تجویز شد سپس ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز در موش‌های صحرایی القا و درمان به مدت ۷ روز دیگر ادامه پیدا کرد. افسردگی، توسط آزمون شنای اجباری بررسی شد. اختلالات شناختی توسط ماز Y شکل و ماز آبی موریس مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در مغز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز باعث افسردگی، کاهش عملکرد شناختی ( $p<0/001$ )، همچنین کاهش سطح BDNF ( $p<0/001$ ) و فعالیت SOD ( $p<0/01$ ) در مغز می‌شود. پیش‌درمانی با متفورمین، رفتار افسردگی ( $p<0/05$ ) و اختلالات شناختی ( $p<0/001$ ) را در موش‌های ایسکمیک کاهش داد. علاوه بر این، پیش‌درمانی با متفورمین فعالیت SOD و سطح BDNF ( $p<0/001$ ) را در مغز حیوانات ایسکمیک افزایش داد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که پیش‌درمانی طولانی با متفورمین می‌تواند موجب کاهش عوارض ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز شود و می‌توان از متفورمین به عنوان یک رویکرد درمانی جدید برای درمان بیماری‌های ایسکمیک مغزی استفاده کرد.

**کلیدواژه‌ها:** متفورمین، ایسکمی سراسری، ریپرفیوژن، موش صحرایی

\***نویسنده مسئول:** دکتر محمد اله توکلی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

نمابر: ۰۳۴۳۱۳۱۵۰۰۳

تلفن: ۰۳۴۳۱۳۱۵۰۸۳

ایمیل: m\_alahavakoli@rums.ac.ir

## مقدمه

سکته مغزی، سومین علت شایع مرگ و میر در بسیاری از کشورهای توسعه یافته می‌باشد. سکته ایسکمیک مغزی، حدود ۸۰٪ از سکته‌های مغزی را شامل می‌شود که بیشتر به دلیل انسداد عروق خونی تغذیه‌کننده مغز صورت می‌گیرد. اغلب این انسدادها به دلیل تشکیل پلاک آترواسکلروتیکی بزرگ و یا به وسیله آمبولی‌های جدا شده از سایر نقاط بدن ایجاد می‌گردد (۱). ایسکمی گلوبال مغزی، زمانی رخ می‌دهد که خون‌رسانی به کل مغز و یا بخش عمده‌ای از مغز مختل شده باشد که در نتیجه محرومیت از اکسیژن و گلوکز، بافت مغز متحمل آسیب خواهد شد (۲). آسیب ایسکمی-رپرفیوژن مجدد، در واقع بیماری پیچیده‌ای است که باعث ایجاد یک سری از تغییرات سلولی و مولکولی همانند نقص در اکسیداسیون و احیا، اختلال مولکولی التهابی، کاهش شدید انرژی و عدم تعادل یونی می‌گردد که در اختلالات پاتولوژیکی شدید به اوج خود می‌رسد. همچنین شدت این تغییرات سلولی و مولکولی، رابطه‌ای مستقیم با شدت آسیب وارد شده دارد (۳، ۴). با این حال، هنوز یک استراتژی درمانی برای این نوع آسیب مغزی عرضه نشده است (۵). این نوع آسیب مغزی، با تولید رادیکال‌های آزاد، مسئول ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد (۶) که منجر به اثرات زیانباری در سیر بیماری می‌گردد (۷).

طی خون‌رسانی مجدد بعد از ایسکمی، در حالیکه عرضه اکسیژن و گلوکز از سر گرفته می‌شود، فسفریلاسیون اکسیداتیو نیز جهت تأمین انرژی لازم برای فرایندهای فیزیولوژیک صورت می‌گیرد که این خود باعث تولید آبشاری از فرایندهای بیوشیمیایی مضر می‌گردد که فواید خون‌رسانی مجدد را کاهش می‌دهد (۸). بافت سیستم عصبی مرکزی (CNS) حاوی سطح بالایی از غشاء و اسیدهای چرب می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان داده که حساسیت ترکیبات چربی غشاء در سیستم عصبی مرکزی به آسیب اکسیداتیو بسیار بالا است. علاوه بر این، به خوبی ثابت شده است که آسیب اکسیداتیو، نقش مهمی در پاتوژنز اختلالات مختلف سیستم عصبی مرکزی و اختلالات عصبی-رفتاری دارد. استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها در موش عملکرد یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۹). در واقع استرس اکسیداتیو نشان‌دهنده عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سیستم بیولوژیکی زداینده رادیکال‌های آزاد (سیستم آنتی اکسیدانی) می‌باشد. دفاع

آنتی اکسیدانی شامل هر دو مکانیسم آنزیمی و غیرآنزیمی است که از سلول در برابر ROS محافظت می‌کند (۱۰). سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از جمله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) نقش مهمی در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کند. بنابراین، یک افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت مغز می‌تواند برای بهبودی عصبی پس از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن مجدد سودمند باشد. مکانیسم‌های دفاعی عصبی در برابر استرس اکسیداتیو بر سیستم‌های آنتی اکسیدانی متمرکز شده‌اند (۱۱).

امروزه به خوبی ثابت شده است که آسیب‌های ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن باعث افسردگی و اختلالات شناختی می‌شود (۱۲). مدل ایسکمی-رپرفیوژن سراسری مغز برای تقلید شرایط بالینی مانند از کارافتادگی قلبی-عروقی که در آن جریان خون مغز متوقف می‌شود، استفاده می‌شود (۱۳). تاکنون هیچ داروی مورد تأییدی برای درمان سکته مغزی وجود ندارد و تمام تلاش‌ها برای محدود کردن کاهش عوارض بعد از وقوع سکته مغزی است. داروهای بیگوانید مانند متفورمین یک کلاس از داروهای خوراکی ضد دیابتی هستند که به طور گسترده‌ای برای درمان دیابت شیرین غیروابسته به انسولین تجویز می‌شوند. اگر چه مکانیزم دقیق این دارو در دیابت به طور کامل مشخص نیست؛ مطالعات قبلی برخی از اثرات غیر دیابتی آن مانند خواص محافظت‌کنندگی عصبی و ضد رادیکال آزاد را نشان داده‌اند (۱۴، ۱۵).

گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که متفورمین می‌تواند فعالیت‌ها و یا سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدان را افزایش دهد (۱۶). اثرات محافظت‌کنندگی عصبی این دارو در خونریزی داخل مغزی و بیماری‌های آلزایمر و پارکینسون مشخص شده است (۱۷). این دارو سطح فاکتور نوروتروپیک مشتق از مغز (BDNF<sup>۲</sup>) را افزایش می‌دهد که می‌تواند اثرات محافظت‌کننده عصبی از این دارو را توجیه کند (۱۸). اثرات محافظت‌کنندگی متفورمین در مقابل مدل‌های مختلف سکته مغزی در گزارش‌های قبلی مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، درمان تأخیری با متفورمین باعث کاهش اختلالات رفتاری در یک مدل ایسکمی مغزی در موش می‌شود (۱۹).

با توجه به اینکه تا امروز اثر پیش‌درمانی طولانی مدت و

<sup>1</sup> Superoxide dismutase

<sup>2</sup> Brain-derived neurotrophic factor

### مدل ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغز

طبق آنچه گفته شد، ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغزی القا شد (۲۰). به‌طور خلاصه، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و هر دو شریان کاروتید در معرض قرار گرفتند و اعصاب واگ از آنها جدا شد. شریان‌های کاروتید با استفاده از کلیپ‌های آنوریسم یاسارژیل<sup>۱</sup> به مدت ۲۰ دقیقه بسته شدند.

### ارزیابی‌های رفتاری

#### ماز Y شکل

از این روش برای ارزیابی حافظه کاری استفاده شد (روز ۲۲). این ماز شامل سه بازو با اندازه مساوی ( $40 \times 4/5 \times 12$  سانتی‌متر) است. هر حیوانی در یک بازوی قرار داده و فرکانس ورود به هر بازو به مدت ۸ دقیقه ثبت می‌شود. جابجایی‌های صحیح به صورت ورودی‌های متوالی به بازوهای جدید تعریف شد. نتایج به صورت درصد جابجایی‌های صحیح [(تعداد جابجایی‌های صحیح / تعداد کل ورود به بازوها)  $\times 100$ ] محاسبه شد.

#### ماز آبی موریس

از این روش برای ارزیابی حافظه و یادگیری فضایی استفاده شد (روزهای ۲۷-۲۳). این ماز شامل یک استخر دایره‌ای شکل سیاه رنگ (قطر ۱۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر) و یک سکوی دایره‌ای شکل سیاه رنگ (قطر ۱۰ سانتی‌متر) است. استخر با آب پر شده و به چهار بخش مساوی (ربع) تقسیم می‌شود. سکو در مرکز یک ربع (که به آن ربع هدف می‌گویند) ۲ سانتی‌متر زیر آب قرار می‌گیرد. از کاغذهایی با اشکال مختلف در دیوار اتاق آزمایش به عنوان نشانگر برای حیوانات در یافتن سکو استفاده می‌شود. حیوانات ۴ بار در روز برای ۴ روز متوالی در ماز انداخته شدند و مدت زمان رسیدن به سکو (زمان تأخیر) اندازه‌گیری شد. هر حیوان از ۴ مکان مختلف در آب انداخته شد و حداکثر زمان برای هر آزمایش ۱۲۰ ثانیه بود. اگر موش‌ها سکو را در زمان تعیین شده پیدا نکردند، توسط آزمایش‌کننده به سکو هدایت شده و ۱۵ ثانیه در آنجا می‌مانند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سکو برداشته شد و حیوانات در ماز انداخته شدند. سرعت شنا، تعداد عبور از ربع هدف و مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد.

ادامه درمان با متفورمین بعد از سکتة مغزی انجام نگرفته است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات متفورمین بر روی مدل ایسکمی-ریپرفیوژن سراسری مغزی انجام گرفت.

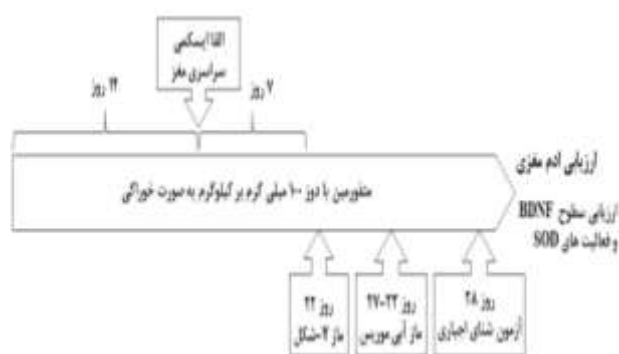
### روش کار

#### حیوانات

در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر با نژاد ویستار (۲۲۰-۲۰۰ گرم) مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام گرفت. تمام تلاش‌ها برای به حداقل رساندن درد و ناراحتی انجام شد و حداقل تعداد حیوانات استفاده شد.

#### گروه‌های مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه شامل تقسیم‌بندی زیر بود: گروه شم: موش‌های صحرایی این گروه تحت استرس جراحی قرار داشتند و تمام مراحل القا سکتة به جز بستن دو شریان کاروتید بر روی آنها انجام گرفت. گروه ایسکمیک: در موش‌های صحرایی این گروه فقط القا سکتة بدون هیچ مداخله دارویی انجام گرفت. گروه ایسکمیک+متفورمین: موش‌های صحرایی این گروه ابتدا به مدت ۱۴ روز تحت درمان با ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین قرار گرفتند. سپس در این حیوانات، سکتة سراسری مغزی القا شد و مجدداً به مدت ۷ روز تحت درمان با متفورمین قرار گرفتند. گروه متفورمین: در موش‌های صحرایی این گروه فقط متفورمین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز تجویز شد. شکل ۱ یک نمودار زمانی برای تسهیل بهتر درک روش انجام مطالعه را نشان می‌دهد.



شکل ۱. نحوه درمان و انجام آزمایشات

<sup>1</sup> Yasargil aneurysm clips

## آزمون شنای اجباری

از این روش برای ارزیابی رفتار افسردگی استفاده شد (روز ۲۸ آزمایش). آزمایش شامل یک استخر (قطر ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۵ سانتی‌متر) پر از آب شیرین (درجه سانتیگراد  $1 \pm 34$ ) به عمق ۴۵ سانتی‌متر است. هر حیوان به مدت ۵ دقیقه در استخر قرار داده‌شد. زمان بی‌حرکتی (شناور بودن در آب بدون مبارزه) اندازه‌گیری شد.

## جمع‌آوری نمونه

پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین آزمایش رفتاری، حیوانات به وسیله گیوتین کشته و مغزها به سرعت برداشته شدند. در هر گروه، ۵ نمونه مغز برای ارزیابی ادم مغزی استفاده شد. ۵ نمونه دیگر مغز در بافر فسفات سالین (PBS) هموژن و سپس سانتریفوژ شده ( $16000 \text{ rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه) و برای ارزیابی سطح BDNF و فعالیت SOD در فریزر نگهداری شدند.

## ارزیابی ادم مغزی

برای محاسبه ادم مغزی از محتوای آب مغز استفاده شد. ابتدا مغزها وزن (وزن مرطوب) و در اتوکلاو نگهداری شدند (در دمای  $60-70^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت) و دوباره وزن شدند (وزن خشک). درصد ادم مغزی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: درصد ادم مغزی =  $((\text{وزن خشک} - \text{وزن مرطوب}) / \text{وزن مرطوب}) \times 100$

## ارزیابی سطوح BDNF و فعالیت‌های SOD

سطح BDNF و فعالیت SOD با کیت‌های شرکت Zellbio (آلمان) و با توجه به دستورالعمل آن اندازه‌گیری شد. (SOD Cat No: ZB-10290S-M9648, BDNF Cat No: ZB-10013S-M9648)

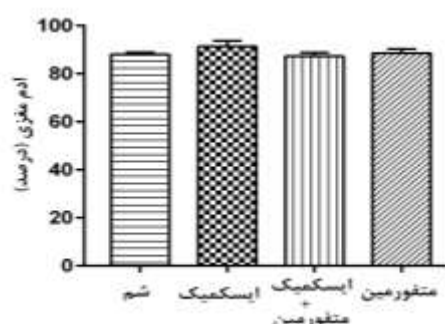
## تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده‌است. برای مقایسه زمان تأخیر در آزمون ماز آبی از آزمون آنالیز واریانس مکرر و به دنبال آن پس‌آزمون توکی استفاده شد. برای مقایسه باقی نتایج از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و به دنبال آن پس‌آزمون توکی استفاده شد.  $p < 0.05$  به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

### ادم مغزی

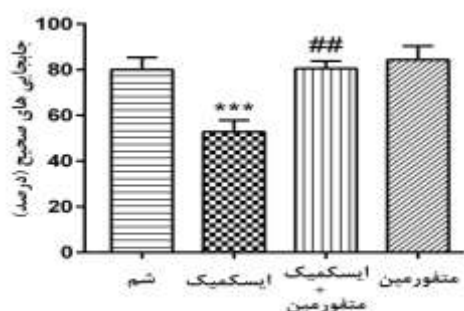
شکل ۲ نتایج ادم مغزی را نشان می‌دهد. اگرچه القاء ایسکمیک، درصد ادم مغزی را نسبت به گروه سالم افزایش داد، اما این تغییر از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این، پیش‌درمان با متفورمین با دوز  $100 \text{ میلی‌گرم بر کیلوگرم}$ ، درصد ادم مغزی را نسبت به گروه ایسکمیک کاهش نداد. علاوه بر این مشاهده شد که متفورمین ( $100 \text{ میلی‌گرم بر کیلوگرم}$ ) این شاخص را در موش‌های سالم تغییر نداد.



شکل ۲. اثر متفورمین بر ادم مغزی در گروه‌های مختلف مطالعه.

### اختلالات شناختی

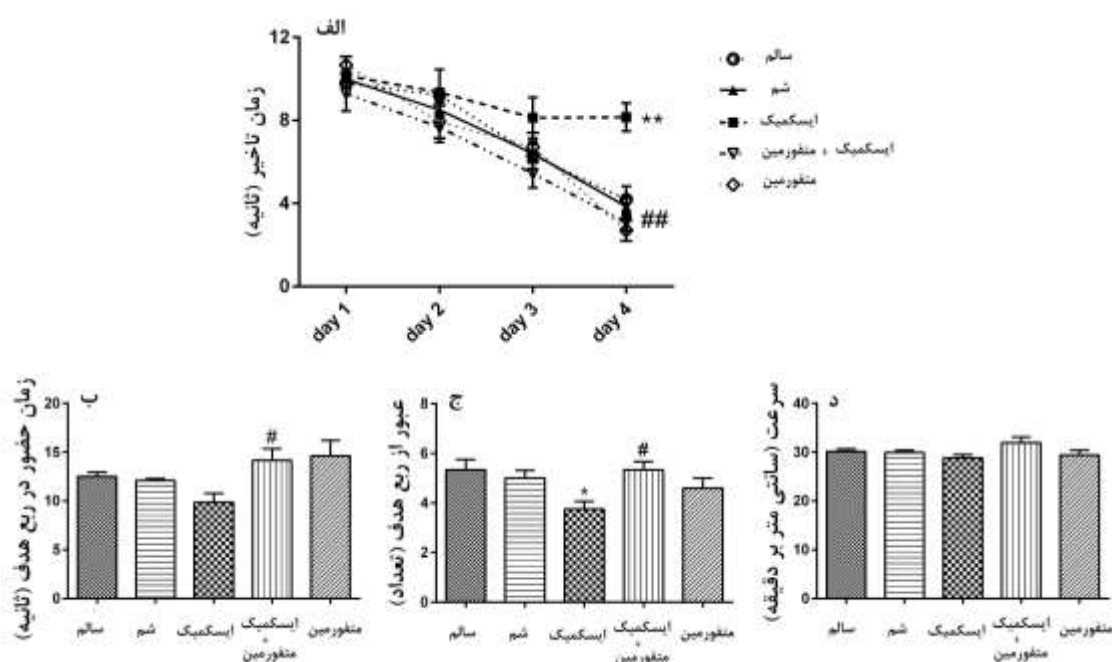
شکل ۳ نتایج حاصل از ماز Y شکل را نشان می‌دهد. القاء ایسکمی سراسری در مغز، درصد تغییرات صحیح را نسبت به گروه سالم کاهش داد ( $p < 0.001$ ). علاوه بر این، پیش‌درمان متفورمین ( $100 \text{ میلی‌گرم بر کیلوگرم}$ ) در حیوانات ایسکمیک، درصد تغییرات صحیح را نسبت به گروه ایسکمیک افزایش داد ( $p < 0.001$ ). همچنین مشاهده شد که متفورمین این شاخص را در موش‌های سالم تغییر نداد.



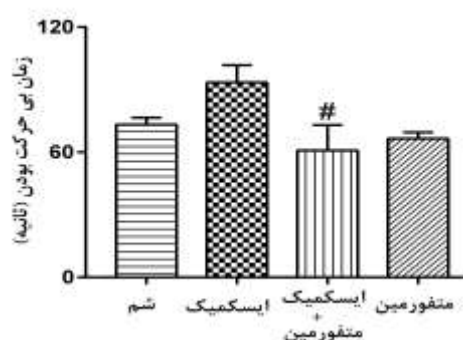
شکل ۳. اثر متفورمین بر حافظه کاری در گروه‌های مختلف مطالعه. \*\*\*:  $p < 0.001$  نسبت به گروه سالم. ##:  $p < 0.01$  نسبت به گروه ایسکمیک.

مدت ۷ روز بعد از سکته، این زمان را نسبت به گروه ایسکمیک افزایش داد ( $p < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان داد که فرکانس عبور از ربع هدف در گروه ایسکمیک در مقایسه با حیوانات سالم کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) (شکل ۴-ج). پیش‌درمانی با متفورمین تعداد دفعات عبور را نسبت به گروه ایسکمیک افزایش داد ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد که سرعت در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت آماری معناداری نداشت. علاوه بر این مشاهده شد که متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) این شاخص‌ها را در موش‌های سالم تغییر نداد.

نتایج ماز آبی موریس نشان داد که القاء ایسکمی سراسری در مغز، زمان تأخیر را در مقایسه با گروه سالم افزایش داد ( $p < 0.01$ ) (شکل ۴-الف). پیش‌درمانی با متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در حیوانات ایسکمیک زمان تأخیر را نسبت به حیوانات ایسکمیک کاهش داد ( $p < 0.01$ ). اگرچه القای ایسکمی سراسری در مغز زمان حضور در ربع هدف را در مقایسه با گروه سالم کاهش داد؛ اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۴-ب). علاوه بر این، پیش‌درمانی با متفورمین در حیوانات ایسکمیک به مدت ۱۴ روز و ادامه آن به



شکل ۴. اثر متفورمین بر یادگیری و حافظه فضایی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. \*:  $p < 0.05$  نسبت به گروه سالم. \*\*:  $p < 0.01$  نسبت به گروه سالم. #:  $p < 0.05$  نسبت به گروه ایسکمیک. ##:  $p < 0.01$  نسبت به گروه ایسکمیک.



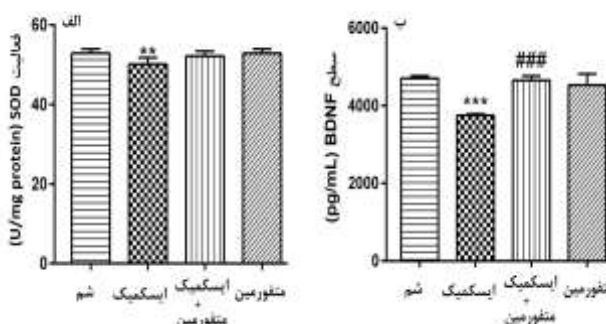
شکل ۵. اثر متفورمین بر رفتار افسردگی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. #:  $p < 0.05$  نسبت به گروه ایسکمیک.

## رفتار افسردگی

نتایج آزمون شنای اجباری در شکل ۵ آمده‌است. اگرچه القاء ایسکمی سراسری، زمان بی‌حرکت بودن را نسبت به گروه سالم افزایش داد، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این، پیش‌درمانی با متفورمین زمان بی‌حرکتی را نسبت به گروه ایسکمیک کاهش داد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این مشاهده شد که متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) این شاخص را در موش‌های سالم تغییر نداد.

## سطح BDNF و فعالیت SOD

مطابق یافته‌های شکل ۶-الف، القا ایسکمی سراسری مغز به طور معنی‌داری فعالیت SOD را نسبت به گروه سالم کاهش داد ( $p < 0.01$ ). در مقابل، پیش‌درمانی با متفورمین اثری بر روی فعالیت این آنزیم نداشت. علاوه بر این متفورمین (۱۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم) این شاخص را در موش‌های سالم تغییر نداد. سطح BDNF در گروه ایسکمی در مقایسه با حیوانات سالم کاهش یافت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۶ ب). استفاده از متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در حیوانات ایسکمیک سطح BDNF را بهبود بخشید ( $p < 0.001$ ). علاوه بر این مشاهده شد که متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) این شاخص را در موش‌های سالم تغییر نداد.



شکل ۶. الف) اثر متفورمین بر فعالیت SOD و ب) سطح BDNF. \*\*\*:  $p < 0.01$  نسبت به گروه سالم. \*\*:  $p < 0.01$  نسبت به گروه ایسکمیک. ###:  $p < 0.001$  نسبت به گروه سالم. \*\*\*\*:  $p < 0.001$  نسبت به گروه ایسکمیک.

## بحث

بر اساس یافته‌های این مطالعه، پیش‌درمانی با متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) می‌تواند به طور قابل توجهی باعث بهبود اختلالات حافظه، کاهش رفتار افسردگی و همچنین افزایش سطح BDNF پس از القا I-R سراسری مغزی در موش صحرایی شود. این موضوع به خوبی ثابت شده که آسیب‌های ناشی از I-R مجدد باعث شکستن سد خونی مغزی (BBB<sup>۱</sup>) و افزایش نفوذپذیری مویرگ‌های مغزی می‌شود که این موارد منجر به ادم مغزی می‌شود (۲۱).

نتایج مطالعه نشان داد که درصد ادم مغزی در موش‌های صحرایی ایسکمیک با وجود افزایش، تفاوت معنی‌داری با

حیوانات سالم ندارد. علاوه بر این، مشخص شد پیش‌درمانی با متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش ادم مغزی در حیوانات ایسکمیک نمی‌شود. طبق نتایج تحقیقات دیگر متفورمین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز، نفوذپذیری BBB در موش‌های سوری پس از انسداد شریان مغزی میانی کاهش می‌دهد (۲۲). دلیل این تفاوت در نتایج را می‌توان به تفاوت در دوز تجویزی، نحوه تجویز (پیش‌درمانی در مقابل درمانی) و مدت درمان ربط داد.

نتایج این مطالعه نشان داد که القاء ایسکمی سراسری باعث کاهش سطح BDNF می‌شود. همچنین درمان با متفورمین در رت‌های ایسکمیک به طور قابل توجهی سطح BDNF را در مقایسه با حیوانات در گروه ایسکمیک بهبود بخشید. نقش حیاتی BDNF در عملکردهای شناختی مانند یادگیری و حافظه می‌تواند به طور مستقیم و یا به طور غیرمستقیم از طریق کاهش آپوپتوز سلول‌های عصبی و اثرات نظارتی بر پلاستیسیته سیناپسی انجام شود (۲۳). کاهش سطح BDNF در بیماریه‌های عصبی مانند آلزایمر با اختلال شناختی همراه است (۲۴). نتایج مطالعه حاضر در مورد اثرات متفورمین در افزایش سطح BDNF توسط مطالعات قبلی تأیید می‌شود. به طور مثال، درمان با متفورمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز)، اختلالات عصبی را در مدل سگته مغزی از طریق مسیرهای BDNF کاهش می‌دهد (۲۵). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که تجویز مزمن متفورمین ممکن است از طریق افزایش سطح BDNF عوارض پاتولوژیک مرتبط با سن کاهش دهد (۱۵). بر این اساس، به نظر می‌رسد که اثر محافظتی متفورمین در اختلالات شناختی مرتبط با ایسکمی سراسری مغز ممکن است در اثر افزایش سطح BDNF باشد.

کاهش و برقراری جریان خون در I-R سراسری مغز با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و اثرات مخرب بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند SOD همراه است (۲۶، ۲۷). همانطور که اشاره شد تولید بیش از حد ROS و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند SOD موجب از دست دادن نورون‌ها شده و عوارض ناشی از سگته مغزی مانند افسردگی و اختلالات شناختی را افزایش می‌دهد (۲۱، ۲۷). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که درمان با متفورمین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۳ روز) فعالیت SOD را در مغز حیوانات دیابتی با استرس طولانی مدت را افزایش می‌دهد (۲۸). با این وجود یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که پیش‌درمانی با

<sup>1</sup> Blood-brain barrier

محافظة کننده عصبی و بقا نورونی در هیپوکمپ می‌شود (۳۳). بنابراین ممکن است پیش‌درمانی با متفورمین اختلالات شناختی ناشی از ایسکمی مغزی را از طریق مکانیسم‌های محافظت‌کنندگی عصبی ناشی از BDNF کاهش دهد.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیش‌درمانی با متفورمین باعث بهبود عملکرد شناختی، کاهش افسردگی و افزایش سطح BDNF در رت‌های مبتلا به ایسکمی-رپرفیوژن سراسری مغزی می‌شود. از آنجایی که متفورمین تجویز گسترده‌ای در بالین دارد، کاربرد آن در درمان بالینی سکتة ایسکمیک می‌تواند مفید باشد. با این وجود، هنوز هم پرسش‌های زیادی در مورد مکانیسم این دارو در ایسکمی وجود دارد که باید پاسخ داده شوند.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک مالی از سوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به شماره قرارداد RUMS.REC.1396.132 و با کد اخلاق ۳۱/۲۰/۱/۹۶۱۰۹ صورت پذیرفته است.

### تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

متفورمین باعث افزایش فعالیت SOD در مغز موش‌های ایسکمیک نمی‌شود.

همانطور که قبلاً ذکر شد، افسردگی پس از سکتة ایسکمیک مغزی افزایش می‌یابد (۲۱). این مشکل روانپزشکی در طول دوره پس از سکتة مغزی، باعث کاهش عملکرد فرد بیمار می‌شود. همچنین مطالعات حیوانی هم نشان می‌دهند که القاء ایسکمی-رپرفیوژن سراسری مغز باعث افزایش بیان رفتار افسردگی از طریق افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متفورمین میزان بیان افسردگی را در حیوانات ایسکمیک کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که متفورمین دارای اثرات ضد افسردگی در برابر افسردگی ناشی از متامفتامین می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که متفورمین این اثر را از طریق افزایش فعالیت SOD و سطح BDNF در مغز انجام می‌دهد (۲۹). از این رو، با توجه به نتایج قبلی این مطالعه به نظر می‌رسد که اثرات ضد افسردگی متفورمین از طریق مسیرهای وابسته به BDNF انجام می‌گیرد. در مطالعات قبلی گزارش شده‌است که یادگیری و حافظه در سکتة مغزی آسیب می‌بیند که ممکن است به دلیل از دست دادن سلول‌های عصبی در ناحیه خاصی از مغز باشد (۱۳، ۳۰). نتایج این مطالعه نشان داد که ایسکمی سراسری مغز، رفتارهای جستجوگرانه و همچنین یادگیری و حافظه فضایی را کاهش می‌دهد. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که پیش‌درمانی با متفورمین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز و ادامه آن به مدت ۷ روز) اختلالات شناختی را پس از القاء سکتة کاهش می‌دهد. متفورمین دارای اثرات مفیدی بر عملکرد شناختی در شرایط مختلف پاتولوژیک مانند پیری (۱۵)، اوارکتومی (۳۱) و دیابت (۳۲) است. نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که تجویز متفورمین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای ۵ روز باعث کاهش اثرات مخرب ایسکمی گذرای مغزی از طریق اثرات

## References

- Ostrowski RP, Stepien K, Pucko E, Matyja E. Hyperbaric oxygen modalities are differentially effective in distinct brain ischemia models. *Medical Gas Research*. 2016;6(1):39-47.
- Lee JC, Won MH. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. *Anatomy and Cell Biology*. 2014;47(3):149-56.
- Boys JA, Toledo AH, Anaya Prado R, Lopez Neblina F, Toledo Pereyra LH. Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*. 2010;58(7):875-82.

4. Deng T, et al. Pre-stroke metformin treatment is neuroprotective involving AMPK reduction. *Neurochemical Research*, 2016;41(10):2719-27.
5. Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, et al. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Research*. 2014;1559:46-54.
6. Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Zagrean AM, et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion a biochemical study in rat. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2001;5(2):163-70.
7. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001;21(1):2-14.
8. Burcu GB, Osman C, Aslı C, Namik OM, Nese BT. The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia-reperfusion in C57BL/J6 mouse. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;31(7):456-62.
9. Tejera Segura B, de Vera Gonzalez AM, Lopez Mejias R, Gonzalez Gay MA, Ferraz Amaro I. Serum cathepsin S and cystatin C: relationship to subclinical carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2016;34(2):230-5.
10. Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, Belele Baptista N, Carvalho Caixeta D, Vieira de Souza A, et al. The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; PMID: 27579154
11. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018;13:757-72.
12. Vicentini JE, Weiler M, Almeida SRM, de Campos BM, Valler L, Li LM. Depression and anxiety symptoms are associated to disruption of default mode network in subacute ischemic stroke. *Brain Imaging and Behavior*. 2017;11(6):1571-80.
13. Wu HS, Guo PP, Jin Z, Li XY, Yang X, Ke JJ, et al. Effects of lipoxin A4 pretreatment on cognitive function of aged rats after global Cerebral ischemia reperfusion. *Current Medical Science*. 2018;38(4):666-71.
14. Fatemi I, Heydari S, Kaeidi A, Shamsizadeh A, Hakimzadeh E, Khaluoi A, et al. Metformin ameliorates the age-related changes of d-galactose administration in ovariectomized mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2018;32(4):392-9.
15. Fatemi I, Khaluoi A, Kaeidi A, Shamsizadeh A, Heydari S, Allahtavakoli MA. Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2018;21(1):19-25.
16. Mansour HH, El Kiki SM, Galal SM. Metformin and low dose radiation modulates cisplatin-induced oxidative injury in rat via PPAR-gamma and MAPK pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017;616:13-9.
17. Wahlqvist ML, Lee MS, Hsu CC, Chuang SY, Lee JT, Tsai HN. Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with Type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort. *Parkinsonism Related Disorders*. 2012;18(6):753-8.
18. Qi B, Hu L, Zhu L, Shang L, Wang X, Liu N, et al. Metformin attenuates neurological deficit after intracerebral hemorrhage by inhibiting apoptosis, oxidative stress and neuroinflammation in rats. *Neurochemical Research*. 2017;42(10):2912-20.
19. Venna VR, Li J, Hammond MD, Mancini NS, McCullough LD. Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke. *The European Journal of Neuroscience*. 2014;39(12):2129-38.
20. Erfani S, Khaksari M, Oryan S, Shamsaei N, Aboutaleb N, Nikbakht F, et al. Visfatin reduces hippocampal CA1 cells death and improves learning and memory deficits after transient global ischemia-reperfusion. *Neuropeptides*. 2015;49:63-8.
21. Nabavi SF, Habtemariam S, Di Lorenzo A, Sureda A, Khanjani S, Nabavi SM, et al. Post-Stroke depression modulation and in vivo antioxidant activity of Gallic acid and its synthetic derivatives in a murine model system. *Nutrients*. 2016; 8(5):248.
22. Liu Y, Tang G, Li Y, Wang Y, Chen X, Gu X, et al. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11:177.
23. Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waskow M, Steliga A, Morys J. A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017; PMID: 28623429.
24. Beer MS, Sonnen J. Brain BDNF expression as a biomarker for cognitive reserve against Alzheimer disease progression. *Neurology*. 2016;86(8):702-3.
25. Ghadernezhad N, Khalaj L, Pazoki Toroudi H, Mirmasoumi M, Ashabi G. Metformin pretreatment enhanced learning and memory in cerebral

forebrain ischaemia: the role of the AMPK/BDNF/P70SK signalling pathway. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(10):2211-9.

26. Liu Z, Cai Y, Zhang X, Zhu Z, He J. High serum levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes are associated with post-stroke anxiety. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2018;39(6):999-1007.

27. Jiao L, Zhang J, Li Z, Liu H, Chen Y, Xu S. Edaravone alleviates delayed neuronal death and long dated cognitive dysfunction of hippocampus after transient focal ischemia in Wistar rat brains. *Neuroscience*. 2011;182:177-83.

28. Garabadu D, Krishnamurthy S. Diazepam potentiates the antidiabetic, antistress and anxiolytic activities of metformin in type 2 diabetes mellitus with cooccurring stress in experimental animals. *BioMed Research International*. 2014;2014:693074.

29. Keshavarzi S, Kermanshahi S, Karami L, Motaghinejad M, Motevalian M, Sadr S. Protective

role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways. *Neurotoxicology*. 2019;72:74-84.

30. Salehpour F, Farajdokht F, Mahmoudi J, Erfani M, Farhoudi M, Karimi P, et al. Photobiomodulation and coenzyme Q10 treatments attenuate cognitive impairment associated With model of transient global brain ischemia in artificially aged mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:74.

31. Fatemi I, Delrobaee F, Bahmani M, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M. The effect of the anti-diabetic drug metformin on behavioral manifestations associated with ovariectomy in mice. *Neuroscience Letters*. 2019;690:95-8.

32. Oliveira WH, Nunes AK, Franca ME, Santos LA, Los DB, Rocha SW, et al. Effects of metformin on inflammation and short term memory in streptozotocin induced diabetic mice. *Brain Research*. 2016;1644:149-60.

## Pretreatment effects of metformin on behavioral manifestations of global ischemia/reperfusion injury in rats

Received: 7 Oct 2019

Accepted: 20 Sep 2020

Pooya Saeed Askari<sup>1</sup>, Iman Fatemi<sup>2</sup>, Elham Hakimizadeh<sup>3</sup>, Ayat Kaeidi<sup>3</sup>, Sogand Esmaeil Moghaddam<sup>1</sup>, Mohammad Pak-Hashemi<sup>1</sup>, Mohammad Allahtavakoli<sup>3\*</sup>

1. Student Research Committee, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran 2. Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 3. Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

### Abstract

**Introduction:** Metformin (MET) as an oral antidiabetic drug has pleiotropic effects such as antioxidative and neuroprotective properties. In the current study we aimed to investigate the probable effects of Pretreatment MET therapy in global ischemia-reperfusion in rats.

**Materials and Methods:** In this study, 40 male Wistar rats (200-220 g) were used. Animals were randomly divided into four groups of ten: sham group, ischemic group, ischemic + metformin group and metformin group. MET was administered orally at doses of 100 for 14 days then the rats underwent global ischemia-reperfusion and the treatment continued for 7 days. Depressive-like behavior was assessed by forced swimming test. Cognitive function was evaluated by Y-maze continuous alternation task and Morris water maze. The brains were assessed for the activity of superoxide dismutase (SOD) as well as level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

**Results:** global ischemia-reperfusion caused depression and declined the cognitive function ( $p < 0.001$ ) as well as BDNF ( $p < 0.001$ ) level and SOD ( $p < 0.01$ ) activity. Pretreatment with MET reduced the depressive-like behavior ( $p < 0.05$ ) and attenuated the cognitive impairments ( $p < 0.01$ ) in ischemic rats. Moreover, MET increased the BDNF ( $p < 0.001$ ) level in the brains of ischemic animals

**Conclusion:** Our results recommended that chronic pretreatment MET therapy could improve behavioral disorders following global ischemia-reperfusion and could be used as a novel therapeutic approach for the treatment of brain ischemic conditions.

**Keywords:** Metformin, Global ischemia, Reperfusion, Rat

**\*Corresponding Author:** Professor of Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

**Email:** m\_alahtavakoli@rums.ac.ir

**Tel:** +983431315083

**Fax:** +983431315003