

مقاله پژوهشی

نقش اثرات محافظت نورونی و آنتی‌اکسیدانی در کاهش اختلال حرکتی، آلودینیای مکانیکی و دمایی ناشی از ضایعه نخاعی در موش صحرایی به دنبال تزریق داخل نخاعی متفورمین

محمد آسترکی^۱، سجاد فخری^{۲*}، فاطمه عباس‌زاده^۳، سمیرا شیرویی^۲، محمدحسین فرزایی^۲

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۳. مرکز تحقیقات نوروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش: ۱۲ اردیبهشت ۱۴۰۱

دریافت: ۵ فروردین ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: آسیب نخاعی یک اختلال حسی و حرکتی ناتوان‌کننده است. شایع‌ترین نوع اختلال حسی بعد از آسیب نخاعی، درد نوروپاتی است که سبب کاهش کیفیت زندگی می‌شود. تا به امروز روش‌های درمانی بکاررفته جهت درمان آسیب‌های نخاعی کاملاً موثر نبوده است. بنابراین محققان همواره به دنبال یافتن داروهای جدید و کارآمد علیه ضایعه نخاعی بوده‌اند. پیش‌ازاین اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی متفورمین در سایر اختلالات سیستم عصبی مرکزی و محیطی به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر نقش احتمالی اثرات محافظت نورونی و آنتی‌اکسیدانی تزریق داخل نخاعی متفورمین بر درد نورپاتی و عملکرد حرکتی بعد از آسیب نخاعی در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: تعداد ۳۵ سر رت در پنج گروه تحت عنوان شم (بدون آسیب نخاعی)، آسیب نخاعی-دریافت‌کننده حامل دارو (آسیب) و سه گروه تحت درمان با متفورمین (متفورمین) با دوزهای یک، دو، و چهار میلی‌مولار قرار گرفتند. تست‌های رفتاری صفحه داغ، استون، وون فری، BBB و تغییرات وزن در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از جراحی انجام شد. تغییرات سرمی کاتالاز، گلوکاتیون، سطح نیتريت سرم و همچنین شمارش نوروون‌های حسی و حرکتی نخاع نیز در پایان دوره‌ی ۲۸ روزه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق داخل نخاعی متفورمین موجب کاهش درد حرارتی، سرمایی و مکانیکی، بهبود عملکرد حرکتی و همچنین افزایش متناسب وزن در موش‌های صحرایی مبتلا به آسیب نخاعی می‌شود. متفورمین همچنین سبب افزایش درصد کاتالاز و گلوکاتیون نسبت به گروه آسیب، کاهش سطح نیتريت سرم و افزایش تعداد نوروون‌های حسی و حرکتی نسبت به گروه آسیب گردید.

نتیجه‌گیری: اثرات محافظت نورونی و آنتی‌اکسیدانی تزریق داخل نخاعی متفورمین می‌تواند سبب کاهش درد و بهبود حرکت به دنبال آسیب نخاعی شود.

واژه‌های کلیدی: آسیب نخاعی، آنتی‌اکسیدان، درد نوروپاتی، عملکرد حرکتی، متفورمین، محافظت نورونی

مقدمه

مدفوع، وجود درد طاقت‌فرسا و ناتوان‌کننده و گاهی حتی خودکشی اشاره کرد. در آسیب طناب نخاعی اولین فشار مکانیکی بر روی نخاع منجر به آسیب‌های نورولوژیکی موضعی می‌شود که به آن آسیب اولیه گویند. آسیب نخاعی ثانویه متعاقب پاسخ بدن به آسیب اولیه ایجاد می‌گردد. بعد از آسیب نخاعی یک سری وقایع آبخاری درون سلولی اتفاق می‌افتد که ممکن است ماه‌ها تا سال‌ها به طول بیانجامد و منجر

آسیب طناب نخاعی یکی از مهمترین چالش‌های پیشرو در نظام درمانی کشورها به حساب می‌آید. تحقیقات نشان داده است که در کشورهای توسعه یافته میزان ابتلا به آسیب نخاعی ۱۰-۴۰ نفر در یک میلیون نفر می‌باشد که یک وضعیت بسیار نگران‌کننده به نظر می‌رسد [۱]. از عوارض مربوط به آسیب‌های نخاعی می‌توان به عدم توانایی حرکت یا تکان دادن عضو، از دست دادن عملکرد جنسی، کاهش توانایی کنترل ادرار و

حرکتی) نخاع بتواند نقش مهمی در بهبود درد نوروپاتی و عملکرد حرکتی داشته باشد. با توجه به خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی متفورمین و همچنین نقش مهم واسطه‌های التهابی و رادیکال‌های آزاد در ایجاد درد های نوروپاتی، در این مطالعه نقش احتمالی اثرات محافظت‌نورونی و آنتی‌اکسیدانی تزریق داخل نخاعی متفورمین در تعدیل درد و بهبود عملکرد حرکتی ناشی از این دارو متعاقب آسیب نخاعی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

تعداد ۳۵ سر موش صحرایی با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۳۰ گرم در ۵ گروه مورد بررسی قرار گرفتند. گروه شم تحت عمل لامینکتومی بدون آسیب (شم)؛ گروه آسیب نخاعی تحت عمل لامینکتومی و آسیب نخاعی و دریافت‌کننده نرمال سالین به‌عنوان حلال دارو؛ گروه‌های متفورمین تحت عمل لامینکتومی و آسیب نخاعی و دریافت‌کننده متفورمین در غلظت‌های یک، دو، و چهار میلی‌مولار. تمامی آزمایشات این تحقیق، مطابق با قواعد اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه‌ی درد و کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1399.386) انجام شد. حیوانات در یک چرخه ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذای موجود و با حرارت کنترل شده ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایشات حداقل یک هفته پس از سازگار شدن موش‌ها با محیط حیوان‌خانه انجام شد. اندازه‌گیری وزن و همچنین تست‌های رفتاری ارزیابی درد نوروپاتی شامل آزمون صفحه داغ، استون و وون‌فری و عملکرد حرکتی در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از آسیب نخاعی انجام شد. تغییرات سرمی کاتالاز، گلوکاتیون، سطح نیتريت سرم و همچنین شمارش نوروئ‌های حسی و حرکتی نخاع نیز در پایان دوره‌ی ۲۸ روزه اندازه‌گیری شد.

آسیب نخاعی

بیهوشی موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کتامین/زایلازین (۱۰/۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، انجام شد. به‌منظور انجام عمل جراحی موهای ناحیه پشت حیوان در ناحیه مهره‌های سینه‌ای تراشیده شدند، سپس با اسکالپل شکافی به

به بدترشدن آسیب و جلوگیری از ترمیم نورونی گردد. درمیان آبشارهای پاتولوژیک سلولی متعاقب آسیب نخاعی، واسطه‌های استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد عوارض ثانویه نشان داده‌اند [۲].

بیشتر افرادی که مبتلا به آسیب نخاعی هستند علاوه‌بر فلج حرکتی، درد شدیدی را تجربه می‌کنند که تحت عنوان درد نوروپاتی شناخته می‌شود. درد نوروپاتی با علایم رفتاری مثل درد خودبخودی، هیپرآلژیا و آلودینیا همراه است که مکانیسم‌های نورونی متفاوتی در ایجاد آن مطرح هستند. به‌دلیل مشخص‌نبودن مکانیسم و عوامل مربوط به این نوع درد و اختلال حرکتی همراه، هنوز درمان مناسب و قطعی برای آن ارائه نشده است. لذا باتوجه به تعدد بیماران مبتلا به آسیب نخاعی و اثرات آن بر جنبه‌های مختلف کیفیت زندگی این افراد، پیدا کردن راه درمانی مناسب و پیدایش داروها و درمان‌های جدید جهت کمک به این افراد مورد توجه جوامع پزشکی بوده و توجه به آن لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد [۳]. متفورمین از داروهای کاهنده‌ی قند خون می‌باشد که در درمان دیابت به‌کار می‌رود. مطالعات مختلف خواص آنتی‌اکسیدان، ضدالتهابی و محافظت عصبی متفورمین را به‌واسطه تحریک ¹AMPK تایید کرده‌اند [۴]. همچنین مصرف خوراکی و تزریق داخل‌صفاقی این دارو می‌تواند باعث کاهش درد نوروپاتی محیطی القا شده با شیمی درمانی به‌واسطه جلوگیری از تخریب فیبرهای نورونی اپیدرمی شود [۵، ۶]. همچنین در یک مدل درون‌تن، متفورمین به‌واسطه تحریک AMPK توانست به‌عنوان یک کاندید آنتی‌اکسیدانی مناسب دردهای بعد از عمل جراحی معرفی شود [۵]. در مطالعه دیگری همچنین اثرات ضدالتهابی تزریق داخل صفاقی متفورمین به‌واسطه کاهش فاکتور نکروز دهنده توموری-آلفا^۲ و اینترلوکین-۱ بتا^۳ توانست سبب کاهش درد نوروپاتی در موش‌های صحرایی گردد [۷]. مطالعات پیشین، همچنین کارایی بیشتر تزریق داخل نخاعی (در مقایسه با سایر روش‌های مصرف) را در بهبود عملکرد حسی-حرکتی و جلوگیری از مرگ سلول‌های عصبی متعاقب آسیب نخاعی نشان دادند [۸، ۹]. به‌نظر می‌رسد، به‌کارگیری تزریق داخل نخاعی، به‌واسطه افزایش اثرات آنتی‌اکسیدانی و میزان زنده مانده نوروئ‌های شاخ پشتی (حسی) و شاخ شکمی

¹ Adenosine monophosphate activated protein kinase

² Tumor necrosis factor alpha

³ Interleukin 1 beta

هنگام استفاده از دستگاه صفحه داغ، قبل از روشن کردن دستگاه با قرار دادن هر موش ۳-۴ مرتبه با فواصل زمانی ۵ دقیقه روی صفحه دستگاه سعی شد که حیوانات با محیط صفحه آزمون آشنا شوند. در هنگام شروع آزمون، موش‌ها بر روی صفحه داغ که در محدوده دمایی 2 ± 53 درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود قرار گرفتند. فاصله زمانی بین قرار گرفتن موش بر روی دستگاه تا زمان لیسیدن پا یا جیغ زدن حیوان به عنوان مدت زمان به آستانه رسیدن درد به وسیله حرارت در نظر گرفته شد. برای محاسبه دقیق‌تر اعداد، هر موش ۳ مرتبه با فواصل زمانی ۵ دقیقه بر روی دستگاه قرار گرفت. سپس از میانگین به دست آمده برای آنالیز آماری استفاده شد.

آزمون استون برای سنجش درد سرمایی

جهت بررسی آلودینای سرمایی از تست استون استفاده گردید [۱۳]. جهت این امر، حیوانات در قفس‌های خاص با کف توری که به میزان ۴۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح میز قرار داشت قرار داده شدند. ۱۰ دقیقه بعد از قرار دادن حیوانات در قفس مخصوص، ۱۰۰ میکرولیتر استون از فاصله ۲ سانتی‌متری به کف پای حیوان اسپری شد و عکس العمل حیوان شامل: (۰) بدون پاسخ، (۱) احساس ترس بدون کشیدن پا (شوکه شدن)، (۲) رفلکس کشیدن مختصر پا، (۳) رفلکس کشیدن طولانی پا، (۴) رفلکس کشیدن طولانی و مکرر پا و لیس زدن حیوان مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون وون فری برای سنجش درد مکانیکی

جهت انجام آزمون وون فری حیوانات بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلس (به ابعاد 20×20 و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر) قرار گرفته و بعد از عادت کردن حیوان به محیط جدید، از تارهای ۱۰ تا ۱۰۰ جی وون فری جهت سنجش درد مکانیکی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن (۱۰ جی) شروع شده و به ترتیب در صورت عدم پاسخ حیوان، تار با شماره بالاتر امتحان می‌شد. هر تار، ۳ بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به مدت یک ثانیه به کف پای حیوان فشار داده شده و در صورتی که ۲ بار متوالی پاسخ دهد (حیوان پای خود را بلند کند)، آن تار به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته و بدین ترتیب آزمایش متوقف شد. درحالتی که

طول ۲ سانتی‌متر روی پوست حیوان در محل مهره‌های سینه‌ای ۸ و ۹ ایجاد گردید. برای اینکه دسترسی به ستون مهره‌ها راحت‌تر باشد، پوست و عضلات در ناحیه برش داده شده از دو طرف به کمک لیگاتور کشیده شد. بعد از آن با کمک رانجر و با احتیاط فراوان شکستن مهره یا لامینکتومی صورت گرفت [۱۰]. بعد از انجام لامینکتومی، با استفاده از یک کلیپس آنورسیم کالیبره شده (با فشار ۹۰ جی) اطراف طناب نخاعی به مدت یک دقیقه بسته شد که این امر منجر به فلج کامل پاهای پسین حیوانات می‌شود. حیوانات در حین جراحی و تا هوشیاری کامل، روی یک پد با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گذاشته شدند. پس از جراحی، عمل بخیه زدن توسط نخ‌های جراحی (۰-۳) انجام شد. به منظور آبرسانی و ضد عفونی مجاری ادراری، تا چندین روز بعد از جراحی حیوانات سرم فیزیولوژی زیرجلدی (۲ میلی‌لیتر) و سفازولین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) داخل صفاقی دریافت کردند. در هر قفس دو موش صحرائی در شرایط مناسب و تغذیه آزاد نگهداری شدند. مثانه حیوانات تا زمانی که رفلکس تخلیه مثانه بازگردانده شود دو بار در روز تخلیه شد.

تزریق داخل نخاعی دارو

برای تزریق دارو، از روش تزریق مستقیم داخل نخاعی استفاده شد [۱۱]. در موش‌های بیهوش شده ستیج ایلیاک به وسیله انگشت اشاره و شست نگه داشته شد. سپس فضای خالی بین مهره ۵ و ۶ کمری توسط لمس کردن شناسایی شد. نیم ساعت بعد از جراحی، با توجه به گروه مورد نظر، ۲۰ ماکرولیتر نرمال سالین یا متفورمین با غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار به طور تدریجی به مدت ۱۰ ثانیه توسط سرنگ همپلتون ۲۵ میکرولیتر تزریق شد. سرنگ قبل از جدا شدن به منظور جلوگیری از خروج دارو، به مدت ۱۰ ثانیه در این فضا نگه داشته شد.

آزمون صفحه داغ برای سنجش درد حرارتی

به منظور بررسی پاسخ حیوانات به محرک حرارتی از دستگاه صفحه داغ استفاده شد [۱۲]. موش‌ها در یک محفظه استوانه‌ای شکل از جنس پلکسی گلاس و بر روی یک صفحه داغ قرار گرفتند. برای کاهش استرس موش‌های صحرائی در

چاهک اضافه شد. سپس ۳۰-۴۰ میکرولیتر دیتیویس نیترو بنزوتیک اسید^۵ (DTNB) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و در نهایت جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شد. تفاوت جذب گروه های درمان با گروه شم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 * \frac{(G - \text{استاندارد } G)}{\text{استاندارد } G} = \text{تفاوت درصد}$$

که استاندارد G، میزان گلوکاتینون در نمونه گروه شم و نمونه G، میزان گلوکاتینون در نمونه سایر گروه ها می باشد.

سنجش مقدار نیتریک اکساید سرم

از روش رنگ سنجی گریس برای اندازه گیری نیتریک اکساید استفاده شد. عمل پروتئین زدایی از نمونه های سرم با اضافه کردن سولفات روی (۱۵ میلی گرم / میلی لیتر) انجام گرفت. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برداشته شد و به ۱۰۰ میکرولیتر از آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول وانادیوم کلرید (۸ میلی گرم / میلی لیتر) اضافه شد تا نیترات را به نیتريت احیا کند. بعد محلول گریس شامل ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید (۲ درصد) و ۵۰ میکرولیتر دی آمید دی هیدروکلراید (۱٪) اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس رنگ حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده و جذب نمونه ها با جذب استاندارد مقایسه و غلظت نمونه ها محاسبه شد.

مطالعات بافت شناسی

برای ارزیابی وسعت ناحیه تخریب شده در نخاع، حیوانات را بیهوش و بافت نخاع توسط ۲۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات و ۲۰۰ میلی لیتر محلول پارافرمالدئید ۴٪ به صورت ترانس کاردیال فیکس شدند. پس از خارج ساختن نخاع، بافت ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول پارافرمالدئید ۴٪ در یخچال نگهداری گردیدند. نمونه ها پس از پردازش بافتی با پارافین قالب گیری شده و با کمک دستگاه میکروتوم برش های عرضی با ضخامت ۱۰ تهیه و روی اسلایدهایی که حاوی یک لایه پوششی از چسب پلی ال لایزین بودند، قرار داده شدند و برای رنگ آمیزی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت شناسایی و بررسی تعداد نورون ها از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین استفاده شد.

حیوان به تار با آخرین شماره (۱۰۰ جی) پاسخ نداد، عدد آن تار به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته شد [۱۴، ۱۵].

آزمون BBB^۴ برای سنجش عملکرد حرکتی

جهت انجام آزمون BBB، موش های صحرائی در یک استوانه پلاستیکی به قطر ۹۰ سانتی متر با دیواره های ۱۰ سانتی متری قرار داده شدند و توسط یک آزمایشگر به مدت ۴ دقیقه عملکرد حرکتی حیوان تحت نظارت قرار گرفت. با توجه به معیارهای بررسی سنجش مقیاس حرکتی [۱۶] به هر پای حیوان نمره مربوطه داده شد و در نهایت از دو پای حیوان میانگین گرفته شد و نتایج حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

بررسی تغییرات وزن

وزن حیوانات قبل از جراحی (روز صفر) و در روزهای آزمون اندازه گیری شد. تغییرات وزنی در حیوانات برای هر گروه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{اختلاف وزن} = \left[\frac{\text{وزن حیوان در روزهای } 7, 14, 21, 28}{\text{وزن حیوان در روز صفر قبل از عمل جراحی}} \right]$$

سنجش درصد تغییرات کاتالاز و گلوکاتینون سرم

در این تحقیق از روش Aebi جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد [۱۷]. بدین صورت که ابتدا مقدار ۲۰ میکرولیتر از سرم موش ها به چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از پراکسید نیتروژن ۶۵ میلی مولار اضافه و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. از آمونیم مولیبدات ۳۲.۴ میلی مولار جهت توقف واکنش استفاده شد. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با الیزا ریدر خوانده شد و تفاوت جذب گروه های درمان با گروه شم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 * \frac{(C - \text{استاندارد } C)}{\text{استاندارد } C} = \text{تفاوت درصد}$$

که استاندارد C، میزان کاتالاز در نمونه گروه شم و نمونه C، میزان کاتالاز در نمونه سایر گروه ها می باشد.

جهت اندازه گیری سطح گلوکاتینون از روش Ellman's استفاده شد. در این تحقیق ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷/۴) به هر

⁵ 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

⁴ Basso, Beattie, Bresnahan

گردید. قسمت الف نمودار ۱، نتایج مربوط به تغییرات در آستانه پاسخگویی به محرک درد حرارتی می‌باشد. نتایج نشان داد که حیوانات گروه شم نسبت به محرک حرارت واکنشی نشان ندادند و تقریباً بدون پاسخ بودند، اما حیوانات با آسیب نخاعی به شدت نسبت به محرک درد حرارتی حساس شدند. با تزریق متفورمین آستانه تحمل حرارتی حیوانات آسیب دیده بیشتر شد و تزریق داخل نخاعی متفورمین دو میلی‌مولار نسبت به دوزهای یک و چهار میلی‌مولار کارایی بهتری داشت [$F_{۱۶,۱۵۰}=۶/۳۰۷, p < ۰/۰۰۱$ داخل؛ $p < ۰/۰۰۱$ ؛ $F_{۴,۱۵۰}=۷۲/۷۳, p < ۰/۰۰۱$ ؛ (روزها) $F_{۴,۱۵۰}=۸۱/۴۹$ ، ستون (گروه‌ها)].

داده‌های مربوط به آزمون استون در قسمت ب نمودار ۱ نشان داد که حیوانات گروه شم رفلکسی نسبت به محرک سرما نداشتند و تقریباً بدون پاسخ بودند. اما بعد از آسیب، حیوانات به شدت نسبت به این محرک حساس شدند و نسبت به گروه شم اختلاف معناداری را در پاسخ به محرک سرمای-استون نشان دادند ($p < ۰/۰۰۱$). درمان با متفورمین باعث افزایش

از هر نمونه ۵ مقطع از ناحیه مرکزی آسیب، انتخاب و رنگ‌آمیزی شد. سپس از هر مقطع بافتی با بزرگ نمایی $\times 40$ با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon عکس‌برداری گردید. با استفاده از نرم‌افزار Image J شمارش نوروها، از ناحیه شاخ شکمی و پشتی مقاطع بافتی صورت گرفت.

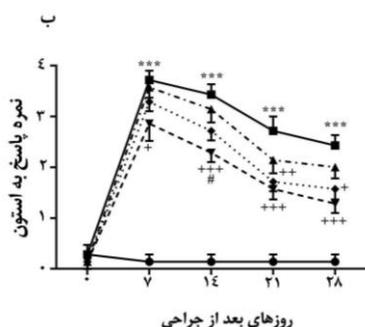
آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار Prism 8 انجام شد. نتایج بر حسب میانگین \pm انحراف معیار استاندارد گزارش شده است. آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه به ترتیب به همراه تست‌های تعقیبی توکی و بن فرونی برای مقایسه اختلاف میانگین گروه‌های مختلف استفاده شد.

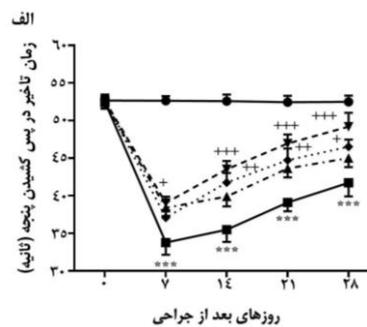
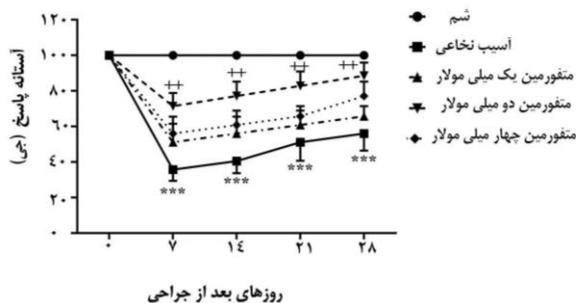
یافته‌ها

اثرات متفورمین بر درد نورپاتیک

به منظور بررسی درد حرارتی، درد سرمای و درد مکانیکی به ترتیب از آزمون‌های صفحه داغ، استون و وون فری استفاده

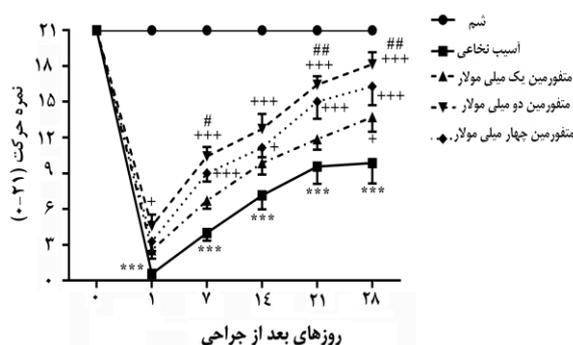


ج



نمودار ۱- نتایج بررسی اثر متفورمین بر آستانه درد حرارتی (الف)، سرمای (ب) و درد مکانیکی (ج) متعاقب آسیب نخاعی در موش‌های صحرایی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (تعداد در هر گروه = ۷) ارائه شده است. ***: تفاوت معنی‌دار با گروه شم با $p < ۰/۰۰۱$ و +: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب با $p < ۰/۰۵$ و ++: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب با $p < ۰/۰۱$ و +++: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب با $p < ۰/۰۰۱$ و #: تفاوت معنی‌دار با گروه متفورمین دو میلی‌مولار با $p < ۰/۰۵$.

و یک بودند و تا روز آخر اختلاف معناداری با گروه شم داشتند. درمان با متفورمین به طور قابل توجهی باعث بهبود حرکتی موش‌ها از روز ۷ به بعد شد. در بین ۳ غلظت داروی متفورمین تزریق دو میلی‌مولار نسبت به یک و چهار میلی‌مولار کارایی بهتری داشت [$F_{7,18.0} = 12/39, p < 0/001$] تداخل؛ $F_{4,18.0} = 17/7, p < 0/001$ ؛ ردیف (روزها)؛ $F_{4,18.0} = 177$ ، ستون (گروه‌ها).



نمودار ۲- نتایج بررسی اثر متفورمین بر عملکرد حرکتی در موش‌های صحرایی متعاقب آسیب نخاعی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (تعداد در هر گروه = ۷) ارائه شده است. ***: تفاوت معنی‌دار با گروه شم با $p < 0/001$ و +++: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب نخاعی با $p < 0/001$ ؛ تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب نخاعی با $p < 0/001$ ؛ تفاوت معنی‌دار با گروه متفورمین دو میلی‌مولار با $p < 0/05$ ؛ تفاوت معنی‌دار با گروه متفورمین دو میلی‌مولار با $p < 0/01$.

اثرات متفورمین بر تغییرات وزن

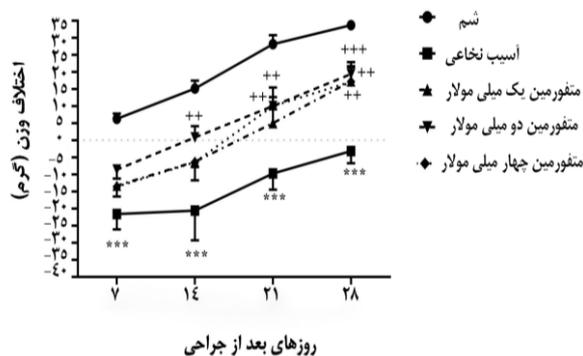
تغییرات وزن موش‌های صحرایی نسبت به روز قبل از عمل جراحی مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۳). در طول ۴ هفته آزمایش، موش‌های گروه شم از الگوی افزایش وزن مناسبی برخوردار بودند. آسیب نخاعی باعث کاهش وزن در گروه آسیب نخاعی شد که در مقایسه با گروه شم از نظر آماری معنادار بود ($p < 0/001$). همانطور که در شکل هم قابل مشاهده است درمان با متفورمین، به صورت معناداری مانع از کاهش وزن به دنبال آسیب نخاعی شد ($p < 0/001$)، [$p = 0/95$ ، $F_{12,12.0} = 0/43$ ، تداخل؛ $F_{3,12.0} = 46/78, p < 0/001$] ردیف (روزها)؛ $F_{4,12.0} = 39/01, p < 0/001$ ، ستون (گروه‌ها).

مقاومت اختلاف معناداری را در پاسخ به محرک سرمایی- استون نشان دادند ($p < 0/001$). درمان با متفورمین باعث افزایش مقاومت نسبت به محرک سرما شد و در این آزمون هم تزریق دو میلی‌مولار دارو نسبت به یک و چهار میلی‌مولار کارایی بهتری نشان داد [$F_{16,15.0} = 8/97, p < 0/001$] تداخل؛ $F_{4,15.0} = 116/8, p < 0/001$ ؛ ردیف (روزها)؛ $F_{4,15.0} = 102/7, p < 0/001$ ، ستون (گروه‌ها).

اثرات متفورمین بر درصد تغییرات کاتالاز،

گلوکاتایون و سطح سرمی نیتريت

در نمودار ۴ نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز (قسمت الف) و گلوکاتایون (قسمت ب) آورده شده است.



قسمت ج نمودار ۱ نشان می‌دهد که آستانه تحمل درد مکانیکی در تمام روزهای بعد از لامینکتومی در گروه شم یکسان بود. در گروه با آسیب نخاعی آستانه تحمل درد به شدت کاهش یافت و درمان با متفورمین (تزریق دو میلی‌مولار) با افزایش آستانه تحمل درد مکانیکی در موش‌های مبتلا به آسیب نخاعی همراه بود. [$F_{16,15.0} = 2/295, p = 0/0049$] تداخل؛ $F_{4,15.0} = 24/68, p < 0/001$ ؛ ردیف (روزها)؛ $F_{4,15.0} = 32/44, p < 0/001$ ، ستون (گروه‌ها).

بررسی عملکرد حرکتی

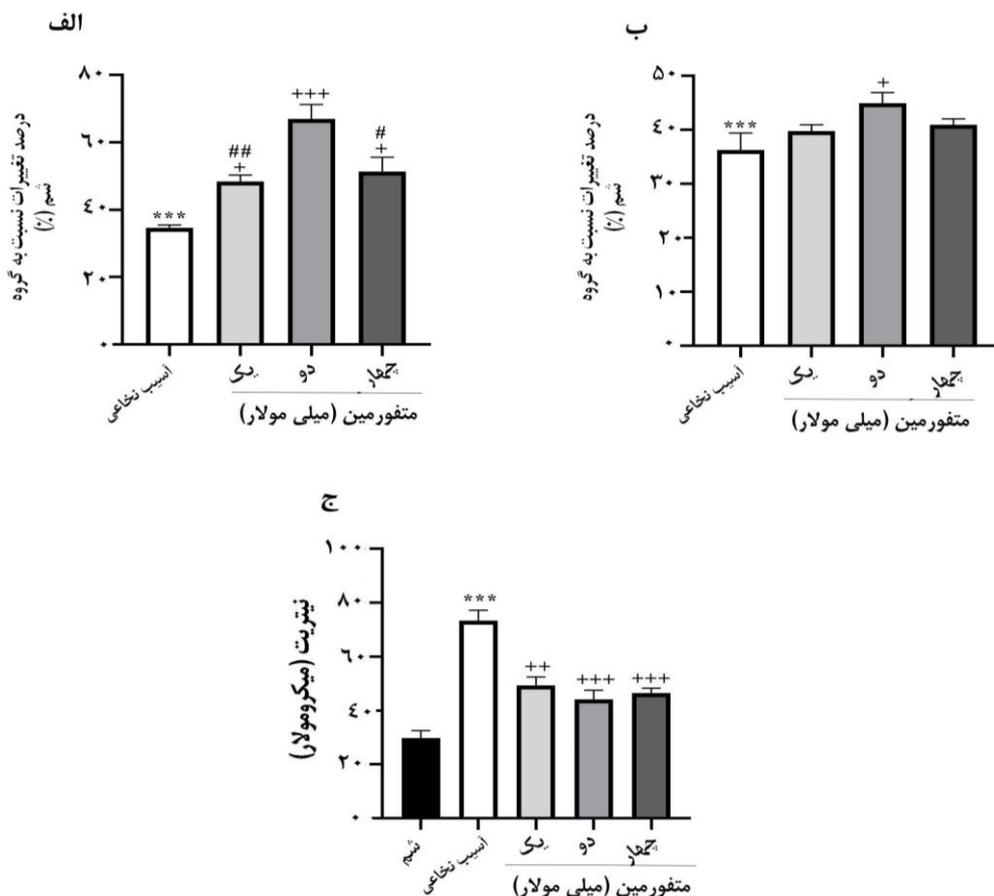
عملکرد حرکتی موش‌های صحرایی پس از آسیب با مقیاس حرکتی BBB مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج مقیاس حرکتی BBB (نمودار ۲) موش‌ها در گروه شم در تمام روزها اختلال حرکتی را از خود نشان ندادند و نمره کامل ۲۱ را گرفتند. در گروه آسیب موش‌ها در روز اول، کاملاً فلج و با نمره

نمودار ۳- بررسی اثر متفورمین بر تغییرات وزن در موش صحرایی متعاقب آسیب نخاعی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (تعداد در هر گروه = ۷) ارائه شده است. ***: تفاوت معنی‌دار با گروه شم با $p < 0/001$ و ++: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب نخاعی با $p < 0/01$ و +++: تفاوت معنی‌دار با گروه آسیب نخاعی با $p < 0/001$.

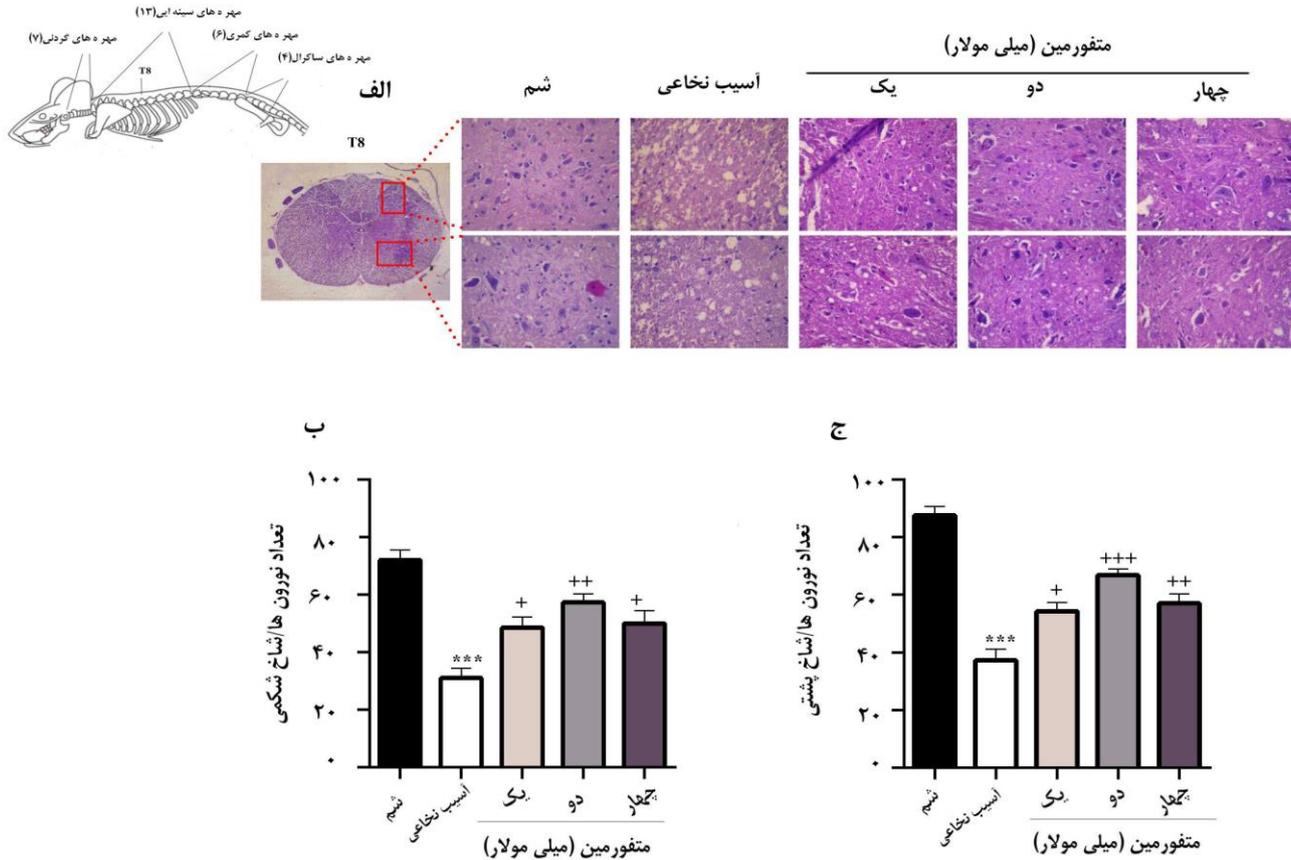
نتایج بافت شناسی

جهت بررسی میزان آسیب بافتی بعد از آسیب نخاعی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در روز ۲۸ بعد از آسیب استفاده شد (شکل ۱). نتایج شمارش تعداد نورون‌های حرکتی در ناحیه شاخ شکمی و پشتی ماده خاکستری نخاع نشان داد که در مقایسه با گروه شم آسیب به نخاع باعث کاهش معنادار تعداد نورون‌ها در محل آسیب شده است ($p < 0/001$). درمان با متفورمین در تمام غلظت‌ها باعث بهبود محافظت از نورون و حفظ تعداد نورون‌ها در ناحیه شکمی ($p < 0/001$)، $F_{4,15}=16/15$) و پشتی ($F_{4,15}=33/05$, $p < 0/001$) شد، هرچند غلظت دو میلی‌مولار نسبت به غلظت‌های یک و چهار میلی‌مولار کارایی بهتری داشت و از نظر آماری هم معنادار بود.

نتایج نشان داد که تغییرات سرمی میزان کاتالاز و گلوکاتینون در گروه آسیب نخاعی نسبت به گروه شم تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($p < 0/001$). همچنین درمان با غلظت دو میلی‌مولار متفورمین در مقایسه با سایر غلظت‌ها افزایش بیشتری را در میزان گلوکاتینون و کاتالاز ایجاد کرده است ($p < 0/001$). با توجه به قسمت ج نمودار ۴ آسیب نخاعی همچنین باعث افزایش مقدار نیتريت در مقایسه با گروه شم شد ($p < 0/001$). متفورمین به‌طور معناداری باعث کاهش مقدار نیتريت شد ($p < 0/001$) و مقدار نیتريت در هر سه گروه درمان شده با متفورمین تقریباً به یک اندازه بود ($p < 0/001$, $F_{4,15}=26/40$).



نمودار ۴- نتایج بررسی اثر متفورمین بر درصد تغییرات کاتالاز (الف)، گلوکاتینون (ب) و مقدار نیتريت (ج) متعاقب آسیب نخاعی در موش‌های صحرائی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (تعداد در هر گروه=۳) ارائه شده است. ***: تفاوت معنی دار با گروه شم با $p < 0/001$ و +: تفاوت معنی دار با گروه آسیب با $p < 0/05$ و ++: تفاوت معنی دار با گروه آسیب با $p < 0/001$ ، #: تفاوت معنی دار با گروه متفورمین دو میلی‌مولار با $p < 0/05$ و ##: تفاوت معنی دار با گروه متفورمین دو میلی‌مولار با $p < 0/01$.



شکل ۱- بررسی اثر متفورمین بر تعداد نورون های حسی و حرکتی (الف) در شاخ شکمی (ب) و پشتی (ج) نخاعی در موش صحرایی متعاقب آسیب نخاعی. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (تعداد در هر گروه = ۳) ارائه شده است. *: تفاوت معنی دار با گروه شم با $p < 0.001$ و +: تفاوت معنی دار با گروه آسیب با $p < 0.05$ و ++: تفاوت معنی دار با گروه آسیب با $p < 0.01$ و +++: تفاوت معنی دار با گروه آسیب با $p < 0.001$.**

بحث

درد به عنوان یک عامل مهم و تاثیر گذار در رنج، ضعف و کاهش کیفیت زندگی افراد مبتلا به آسیب نخاعی شناخته می شود. درد نوروپاتیک مزمن ناشی از آسیب های نخاعی به عنوان یکی از دشوارترین مشکلات در کنترل و درمان به حساب می آید و مطالعات زیادی در این زمینه وجود دارد که به ارتباط مستقیم بین درد و عملکردهای ضعیف فیزیکی، روانی و اجتماعی اشاره داشته اند. در همین راستا، اختلالات حرکتی یکی دیگر از عوارض رایج متعاقب آسیب نخاعی محسوب می گردد که می تواند منجر به فلج عضو گردد [۱۸]. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق دو میلی مولار متفورمین باعث بهبود هایپرآلژیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی در موش های صحرایی شد، [۱۹]. در مطالعه دیگری همچنین گزارش شده است که متفورمین باعث کاهش درد نورپاتیک در موش های صحرایی نر شد [۲۰] و همچنین توانست از درد نورپاتیک

آسیب نخاعی یک اختلال حسی-حرکتی ناتوان کننده است که بیماران مبتلا به آن مادام العمر در رنج و سختی به سر می برند. علاوه بر آن سالانه هزینه های زیادی به سیستم سلامت کشورها از این طریق وارد می شود. در آسیب نخاعی، ضربه مکانیکی اولیه روی ستون فقرات منجر به آسیب عصبی می شود که "آسیب اولیه" نامیده می شود. آسیب مکانیکی باعث ایجاد آبشار پیچیده ای از تغییرات بیولوژیکی می شود که به عنوان "آسیب ثانویه" شناخته می شود. آسیب ثانویه از همان ساعات اولیه پس از آسیب نخاعی آغاز می شود و منجر به نقایص عصبی بیشتر می شود و شامل استرس اکسیداتیو، التهاب، پاسخ های ایمنی، تغییر در بیان گیرنده ها و کانال های یونی است. مطالعات متعددی نقش استرس اکسیداتیو و واسطه های درون سلولی مربوطه در ایجاد اختلال حسی و حرکتی متعاقب آسیب نخاعی را مطرح کرده اند [۲].

ناشی از بستن عصب نخاعی^۶ (SNL) جلوگیری کند [۲۱].
 افشاری و همکاران نیز با بررسی اثر ضد دردی متفورمین بر درد نوروپاتیک نشان دادند که از بین سه دوز مختلف متفورمین (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی)، دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته علائم درد نوروپاتیک را به شکل چشمگیر و معناداری کاهش دهد [۷]. در مطالعه حاضر، سه نوع درد مکانیکی، حرارتی و سرمایی، و بهبود عملکرد حرکتی متعاقب دریافت دوزهای مختلف داخل نخاعی متفورمین مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات پیشین، همچنین کارایی بیشتر تزریق داخل نخاعی (در مقایسه با سایر روش‌های مصرف) را در بهبود عملکرد حسی-حرکتی و جلوگیری از مرگ سلول‌های عصبی متعاقب آسیب نخاعی نشان دادند [۸، ۹]. در این مطالعه، هدف از تزریق داخل نخاعی دارو، افزایش کارایی، کاهش دوز و کاهش عوارض جانبی ناشی از مصرف مکرر دارو به صورت خوراکی و یا داخل صفاقی است. از دیدگاه مطالعات بافت‌شناسی، تعداد نورن‌های شاخ شکمی نخاع متعاقب آسیب نخاعی کاهش یافت و این امر سبب اختلال عملکرد حرکتی در موش صحرایی شد. همچنین، آسیب نخاعی سبب کاهش تعداد نورون‌های حسی در شاخ پشتی نخاع و درد نوروپاتیک شد. در این مطالعه، برای اولین بار بر ارتباط تزریق داخل نخاعی متفورمین بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو و زنده‌ماندن نورون‌های حسی و حرکتی متعاقب آسیب نخاعی فشاری پرداخته شد. نتیجه مطالعه ما نشان داد که تزریق داخل نخاعی متفورمین می‌تواند سبب افزایش زنده‌ماندن نورون حسی در شاخ پشتی و همچنین نورون‌های حرکتی در شاخ شکمی نخاع می‌شود.

از دیدگاه مکانیسمی، mTORC1 یک تنظیم کننده سنتز پروتئین است و با کنترل ترجمه پروتئین، فعالیت نورون‌های حسی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی را تنظیم می‌کند. mTORC1 و اهداف پایین دستی آن در سیستم ترجمه در زیر مجموعه‌ای از گیرنده‌های درد فیبر A قرار گرفته‌اند. همچنین گزارشات حاکی از این است که مسیر mTORC1 نقش کلیدی در ترجمه و سنتز پروتئین‌های دخیل در نورون‌های آوران اولیه که پلاستیسیته مزمن را در درد پاتولوژیک حفظ می‌کند، ایفا می‌کند. متفورمین قادر است AMPK را فعال کند

^۶ Spinal nerve ligation (SNL)

و مسیر mTORC1 را مهار و به واسطه آن استرس اکسیداتیو را تعدیل کند [۱۹]. افزایش تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نهایتاً بروز پدیده استرس اکسیداتیو از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌های آسیب نخاعی پس از صدمه می‌باشد. هر چند در شرایط طبیعی رادیکال‌ها و اکسیدان‌های تولیدشده در بافت عصبی توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی خنثی می‌شود اما پس از بروز آسیب نخاعی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ناحیه صدمه دیده بافت عصبی تضعیف می‌گردد. در نواحی صدمه دیده نخاع، تجمع رادیکال‌های آزاد به طور گسترده‌ای زیاد می‌گردد که بخشی به دلیل تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی بوده و بخشی دیگر به دلیل افزایش آنزیم‌های پرواکسیدان می‌باشد. تجمع این رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث صدمه به ماکرومولکول‌های حیاتی سلول‌ها نظیر پروتئین‌ها، لیپیدهای غشا و اسیدهای نوکلئیک می‌گردند. بنابراین حذف این رادیکال‌ها در نواحی صدمه دیده نخاع تا حد زیادی می‌تواند از عوارض ناشی از آسیب نخاعی را بکاهد [۲۲]. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که تزریق داخل نخاعی متفورمین عملکرد آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را با بالابردن میزان گلوکوتایون و کاتالاز در برابر گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌دهد و مقدار نیتريت سومی را کاهش می‌دهد. بنابراین می‌تواند آبشارهای داخل سلولی منتج به مرگ سلولی را مسدود می‌کند. نتایج مطالعه ما با نتایج جهان‌بخش و همکاران در سال ۲۰۱۸ در یک راستا می‌باشد. آن‌ها نشان دادند درمان با داروی دیگر کاهنده قند خون (پیوگلیتازون) از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت نخاع ضایعه دیده باعث کاهش آسیب اکسیداتیو و همچنین تغییرات آسیب شناختی نخاع می‌گردد [۲۳]. پیش‌از این، محققان نشان دادند که متفورمین از طریق مهار استرس اکسیداتیو باعث بازسازی آکسونی به دنبال آسیب نخاعی می‌گردد [۲۴]. در مطالعه پیشین، اهمیت ارتباط نزدیک بین مسیرهای استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوزی با نقش بالادستی استرس اکسیداتیو در آسیب نخاعی توسط محققان مطالعه حاضر مورد بحث قرار گرفته‌اند [۲۴]. بنابراین تعدیل مسیرهای استرس اکسیداتیو می‌تواند مهارکننده واسطه‌های التهابی و آپوپتوزی نیز باشد. اگرچه اندازه‌گرفتن پارامترهای بیوشیمیایی در تمامی روزهای تست منعکس کننده ارزیابی دقیق تری از تغییرات ظرفیت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی و روند

براین اساس، تزریق داخل نخاعی متفورمین می‌تواند به‌عنوان یکی از گزینه‌های درمانی برای کاهش عوارض ناشی از آسیب نخاعی مورد استفاده قرار گیرد.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (شماره گرنت ۹۹۰۹۹۹) انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.ف، ف.ع: طراحی مطالعه و آنالیز داده‌ها؛ م.آ، س.ف: انجام مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛ س.ف، س.ش، م.ح.ف: نظارت بر اجرای پروژه.

فهرست منابع

- [1] Schwartz G, Fehlings MG, Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg Spine* 94 (2001) 245-256.
- [2] Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter M, Druschel C, Curt A, Fehlings MG, Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers* 3 (2017) 1-21.
- [3] Hagen EM, Rekan T, Management of neuropathic pain associated with spinal cord injury. *Pain Ther* 4 (2015) 51-65.
- [4] Rena G, Hardie DG, Pearson ER, The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60 (2017) 1577-1585.
- [5] Burton MD, Tillu DV, Mazhar K, Mejia GL, Asiedu MN, Inyang K, Hughes T, Lian B, Dussor G, Price TJ, Pharmacological activation of AMPK inhibits incision-evoked mechanical hypersensitivity and the development of hyperalgesic priming in mice. *Neuroscience* 359 (2017) 119-129.
- [6] Mao-Ying Q-L, Kavelaars A, Krukowski K, Huo X-J, Zhou W, Price TJ, Cleeland C, Heijnen CJ, The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. *PLoS One* 9 (2014) e100701.

ترمیم یا تخفیف عوارض ثانویه آسیب نخاعی در گروه‌های تحت درمان باشد، اما لزوم رعایت اصول اخلاقی در استفاده حداقلی از حیوانات آزمایشگاهی، همچنین ایجاد بیهوشی در روزهای نمونه‌گیری سبب تداخل در اجرای تست‌های رفتاری می‌گردد. فلذا تغییرات فاکتورهای مورد بررسی در آسیب نخاعی عمدتاً در روز پایانی صورت می‌پذیرد.

کاهش وزن قابل توجه یکی از مشخصه‌های حاد آسیب نخاعی است که به دلیل تغییرات متابولیک و آتروفی عضلانی رخ می‌دهد. پس از کاهش وزن حاد، افراد مبتلا به بی‌حرکتی وارد مرحله افزایش وزن می‌شوند که بیشتر با افزایش چربی بدن و چاقی احشایی که ممکن است منجر به چالش‌های دشواری مانند سندرم متابولیک و عوارض قلبی عروقی شود، ایجاد می‌شود. در این مطالعه متفورمین با تعدیل درد حیوان و متعاقباً افزایش تمایل حیوان به مصرف غذا سبب نرمال‌سازی مصرف غذا از طریق فعل و انفعالات دارویی مختلف مانند بهبود حساسیت به انسولین و همچنین بهبود متابولیسم لیپیدی شد [۲۵]. مطالعات گسترده‌تر با تمرکز بر تغییرات وزن برای تایید این اثرات ضروری است.

از آنجایی که تاکنون داروی تاییدشده‌ای توسط سازمان غذا و داروی آمریکا^۷ جهت کنترل علائم حسی و حرکتی متعاقب آسیب نخاعی وجود ندارد، فلذا یکی از محدودیت‌های مطالعات آسیب نخاعی عدم اعمال گروه کنترل مثبت است و سایر داروهایی که در این زمینه جهت کنترل درد و یا تعدیل عملکرد حرکتی استفاده می‌شوند (مانند متیل پردنیزولون و دگزامتازون) خود می‌توانند سبب ایجاد عوارض بافتی گردند و قابلیت کافی و استاندارد جهت ارزیابی و مقایسه در مطالعات پیش‌بالینی را ندارند.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج مطالعه حاضر، استفاده از تزریق داخل نخاعی متفورمین علاوه بر بهبود درد نوروپاتی و عملکرد حرکتی موش صحرایی، با تقویت ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی نخاع آسیب‌دیده از آسیب اکسیداتیو حین آسیب نخاعی جلوگیری می‌کند. همچنین متفورمین توانست سبب تعدیل تغییرات وزن، به‌عنوان یکی از عوارض متعاقب آسیب نخاعی، و افزایش تعداد نورون‌های حسی و حرکتی در شاخ پشتی و شکمی نخاع گردد.

⁷ U.S. Food and Drug Administration (FDA)

- [7] Afshari K, Dehdashtian A, Haddadi N-S, Haj-Mirzaian A, Iranmehr A, Ebrahimi MA, Tavangar SM, Faghir-Ghanesefat H, Mohammadi F, Rahimi N, Anti-inflammatory effects of Metformin improve the neuropathic pain and locomotor activity in spinal cord injured rats: introduction of an alternative therapy. *Spinal cord* 56 (2018) 1032-1041.
- [8] Kim H, Na DL, Lee NK, Kim AR, Lee S, Jang H, Intrathecal injection in a rat model: a potential route to deliver human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into the brain. *Int J Mol Sci* 21 (2020) 1272.
- [9] Fakhri S, Abbaszadeh F, Pouriran R, Jorjani M, The effects of intrathecal ketamine on improving sensory-motor function in a rat model of compression spinal cord injury. *Physiol Pharmacol* 24 (2020) 101-110.
- [10] Naseri K, Saghaei E, Abbaszadeh F, Afhami M, Haeri A, Rahimi F, Jorjani M, Role of microglia and astrocyte in central pain syndrome following electrolytic lesion at the spinothalamic tract in rats. *J Mol Neurosci* 49 (2013) 470-479.
- [11] Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A, A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32 (1994) 197-200.
- [12] Janicki P, Libich J, Detection of antagonist activity for narcotic analgesics in mouse hot-plate test. *Pharmacol Biochem Behav* 10 (1979) 623-626.
- [13] Kauppila T, Cold exposure enhances tactile allodynia transiently in mononeuropathic rats. *Exp Neurol* 161 (2000) 740-744.
- [14] Ferland C, Laverty S, Beaudry F, Vachon P, Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97 (2011) 603-610.
- [15] Shields SD, Eckert III WA, Basbaum AI, Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain* 4 (2003) 465-470.
- [16] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12 (1995) 1-21.
- [17] Aebi H, Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105 (1984) 121-126.
- [18] Budh CN, Kowalski J, Lundeberg T, A comprehensive pain management programme comprising educational, cognitive and behavioural interventions for neuropathic pain following spinal cord injury. *J Rehabil Med* 38 (2006) 172-180.
- [19] Baeza-Flores GDC, Guzmán-Priego CG, Parra-Flores LI, Murbartían J, Torres-López JE, Granados-Soto V, Metformin: a prospective alternative for the treatment of chronic pain. *Front Pharmacol* 11 (2020) 558474.
- [20] Inyang KE, Szabo-Pardi T, Wentworth E, McDougal TA, Dussor G, Burton MD, Price TJ, The antidiabetic drug metformin prevents and reverses neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. *Pharmacol Res* 139 (2019) 1-16.
- [21] Weng W, Yao C, Poonit K, Zhou X, Sun C, Zhang F, Yan H, Metformin relieves neuropathic pain after spinal nerve ligation via autophagy flux stimulation. *J Cell Mol Med* 23 (2019) 1313-1324.
- [22] Zarringol M, A review on regulation of autophagy by ROS (Reactive Oxygen Species). *Razi J Med Sci* 24 (2018) 93-105.
- [23] Jahanbakhsh Z, Ghoshooni H, Mohammadi M, Salehi M, Effect of pioglitazone on antioxidant capacity and oxidative damage after spinal cord injury in rat. *J Babol Univ Med Sci* 20 (2018) 16-22.
- [24] Wang H, Zheng Z, Han W, Yuan Y, Li Y, Zhou K, Wang Q, Xie L, Xu K, Zhang H, Metformin promotes axon regeneration after spinal cord injury through inhibiting oxidative stress and stabilizing microtubule. *Oxid Med Cell Longev* (2020) 9741369.
- [25] Powell D, Affuso O, Chen Y, Weight change after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 40 (2017) 130-137.

Research paper

The role of neuroprotective and antioxidant effects in reducing motor dysfunction, mechanical allodynia and heat hyperalgesia caused by spinal cord injury in rats following intrathecal administration of metformin

Mohammad Astaraky¹, Sajad Fakhri^{2*}, Fatemeh Abbaszadeh³,
Samira Shirooie², Mohammad Hosein Farzaei²

¹Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

²Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute,
Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³Neurobiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 25 March 2022

Accepted: 2 May 2022

Abstract

Background and Aim: Spinal cord injury (SCI) is a debilitating sensory-motor dysfunction. Neuropathic pain and motor dysfunction are the most common types of dysfunctionality after SCI, which reduces the quality of life. So far, SCI treatment has not been completely effective and researchers are seeking for novel alternative/potent therapies. Metformin has shown antioxidant and anti-inflammatory effects on the central and peripheral nervous systems. In the present study, the probable neuroprotective and antioxidant effects of intrathecal metformin administration was evaluated on the neuropathic pain and motor dysfunction after SCI.

Methods: Thirty-five rats were divided into five groups: sham, SCI, and metformin (Met) at doses of 1, 2 and 4 mM. Hot plate, acetone, and von Frey behavioral tests and weight changes were performed on days 7, 14, 21, and 28 after SCI. The changes in serum levels of catalase and glutathione, as well as nitrite level, and numbers of sensory and motor neurons were measured on day 28 after surgery.

Results: Intrathecal injection of metformin reduced heat, cold and mechanical pain, motor activity, and modulated weight changes in rats after SCI. Intrathecal metformin also attenuated serum changes of catalase and glutathione, decreased serum nitrite, and increased survived sensory and motor neurons after SCI.

Conclusion: Employing the neuroprotective and antioxidant potential of intrathecal metformin administration could reduce neuropathic pain and improve motor dysfunction following SCI.

Keywords: Spinal cord injury, Antioxidant, Neuropathic pain, Motor activity, Metformin, Neuroprotection

Please cite this article as follows:

Astaraky M, Fakhri S, Abbaszadeh F, Shirooie S, Farzaei MH, The role of neuroprotective and antioxidant effects in reducing motor dysfunction, mechanical allodynia and heat hyperalgesia caused by spinal cord injury in rats following intrathecal administration of metformin. *Iran J Physiol Pharmacol* 6 (2022) 73-84.

*Corresponding author: Pharmacy.sajad@yahoo.com; sajad.fakhri@kums.ac.ir (ORCID: 0000-0001-8265-8284)