

مطالعه تجربی اثر متفورمین روی زخم سوختگی قرنیه در خرگوش

احمد اصغری

گروه جراحی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سیده بهاره هاشم زاده همایونی

دانش آموخته دکتری حرفه ای واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پژمان مرتضوی

گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

علیرضا جهاننده

گروه جراحی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران



تاریخ دریافت: دی ۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۴

Email: dr.ahmad.asghari@gmail.com

چکیده

این تحقیق به منظور مطالعه تجربی اثر متفورمین بر روی ترمیم زخم سوختگی قرنیه در خرگوش انجام گرفت. در این تحقیق از ۲۰ سر خرگوش نیوزلندی نر بالغ با میانگین وزنی ۳-۲/۵ کیلوگرم سالم استفاده شد. بعد از بی‌هوشی عمومی، زخم قرنیه در چشم چپ تمام حیوانات ایجاد شد. بعد از برگشت از بی‌هوشی، خرگوش‌ها به ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. سپس در گروه اول متفورمین ۵۰ mg/kg گاوژ شد، در گروه دوم متفورمین ۱۰۰ mg/kg، در گروه سوم متفورمین ۲۰۰ mg/kg و در گروه چهارم آب مقطر تا ۲۱ روز بعد از ایجاد زخم قرنیه روزانه گاوژ شد. ۲۱ روز بعد از ایجاد سوختگی قرنیه، نمونه‌های بافتی از محل زخم اخذ و تحت بررسی آسیب‌شناسی بافتی قرار گرفتند. با توجه به مطالعات آسیب‌شناختی عروق‌زایی، میزان التهاب و ادم بستره قرنیه در خرگوش‌های تحت درمان با متفورمین در مقایسه با گروه شاهد بطور معنی‌داری کاهش اما لایه‌های بافت پوششی قرنیه افزایش یافته بود ($p < 0/05$). همچنین استفاده از متفورمین موجب بهبود نظم طبیعی رشته‌های کلاژن قرنیه شد ($p < 0/05$). براساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که متفورمین اثرات مناسب و قابل قبولی بر روند التیام‌بخشی و ترمیم زخم قرنیه خرگوش داشته باشد.

کلمات کلیدی: زخم قرنیه، متفورمین، سود سوزآور، خرگوش.

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 112 pp: 110-117

Experimental study of the effect of metformin on corneal burn ulcer healing in rabbit

By: Asghari, A., (Corresponding Author) Department of Veterinary Surgery, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Hashemzadeh Homaioni, B., Veterinary Graduate Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Mortazavi, P., Department of Veterinary Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Jahandideh, A. Department of Veterinary Surgery, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: dr.ahmad.asghari@gmail.com

Received: January 2015 Accepted: February 2015

This study was conducted to examine the effect of metformin on corneal burn wound healing in rabbit. In this study, 20 adult healthy male New Zealand rabbits were used with an average weight of 2.5-3 kg. After general anesthesia, corneal ulcer in the left eye of the all animals was induced. After returning from anesthesia, the rabbits were randomly divided into 4 groups of 5 numbers. Then the first group was gavaged with 50 mg/kg of metformin, the second group with 100 mg/kg and the third group with 200 mg/kg while the fourth group was gavaged with water for 21 days. In the day 21 after making a corneal ulcer, tissue samples were taken and evaluated histopathologically. According to the pathological results, the vascularization, inflammation and edema of matrix of cornea significantly diminished while the epithelium of cornea increased in metformin-treated rabbits compared to control group ($P < 0.05$). Also, administration of metformin significantly improved the natural structure of cornea collagen fibers ($P < 0.05$). Based on the results, it seems metformin has favorable effect on the healing process in rabbit's corneal ulcer.

Key words: Corneal ulcer, Metformin, NaOH, Rabbit

مقدمه

چشم عضوی حساس و حیاتی برای حیوانات می‌باشد. این عضو حساس توسط پوشش‌ها و ساختارهای دفاعی از محیط خارج و عوامل آسیب رسان حفاظت می‌شود. قرنیه بخشی از چشم است که با ایجاد سطحی صاف و شفاف باعث عبور منظم دسته‌های نور به داخل چشم می‌شود. هرگونه آسیب در این لایه، شفافیت و توانایی محافظت آن را از بین می‌برد (۲۷). زخم قرنیه یکی از بیماری‌های به نسبت شایع چشم است که در اثر ضربه، مواد شیمیایی و یا دخالت برخی عوامل ویروسی، باکتریایی و کلامیدیایی ممکن است رخ دهد. سوختگی‌های قلبیایی قرنیه، جدی‌ترین و خطرناک‌ترین شکل سوختگی‌های شیمیایی هستند که بطور معمولاً پیش‌بینی خوبی ندارند. این دسته از سوختگی‌ها باعث آسیب به ملتحمه، قرنیه و ایجاد زخم‌های عمیق قرنیه و حتی سوراخ‌شدگی قرنیه می‌شود. تأخیر در التیام زخم قرنیه باعث عفونی شدن و در نهایت کوری حیوان می‌شود. کمینه اثری که در تأخیر در التیام قرنیه به جا می‌گذارد کدورت دائمی آن می‌باشد. بدین ترتیب درمان و کمک به التیام سریع تر قرنیه و کاهش عوارض زخم قرنیه امری ضروری به نظر می‌رسد (۲۲). بدنبال ایجاد زخم در قرنیه، افزایش فعالیت پروتئینازهای تخریبی و کاهش فعالیت پروتئازها باعث اضمحلال گسیختگی سریع کلاژن و سایر اجزای خارج یاخته‌ای بستره قرنیه می‌شود (۲۹). در شرایط آسیب‌شناختی و آسیب

بافت قرنیه، بطور مشخصی افزایش بنیان آزاد اکسیژن (ROS) و افزایش شرایط اکسایشی و کاهش در اجزای دستگاه پاداکسندگی وجود دارد (۲۵). عوامل مهارکنندگی بنیان‌های آزاد مانند سوپراکسید سوپراکسید (SOD)، کاتالاز، ویتامین E، گلوکوتانیون و اسید اسکوربیک در کاهش آسیب در قرنیه چشم موثر می‌باشند (۱۱، ۱۸). متفورمین (۱ و ۱۰ دی متیل بیگوانید) یک داروی خوراکی است که به منظور پایش قند خون در بیماران مبتلا به بیماری قند نوع ۲ مورد استفاده قرار می‌گیرد. متفورمین دارای اثرات سودمند و متنوع سوخت و سازی می‌باشد که از جمله آنها می‌توان به اثرات ضد افزایش قند خون، ضد هیپرلیپیدمی اشاره کرد (۹). متفورمین سبب کاهش نفوذ لیپوساکاریدها و افزایش نفوذ پذیری یاخته شده و به این ترتیب ادم، تورم و التهاب را کاهش و در ترمیم آسیب حاد ناشی موثر دارد (۱۷). شواهدی دال بر اثر درمانی و بهبود علائم ناشی از افزایش ROS توسط متفورمین وجود دارد که این دارو کاهش پاداکسندگی آنزیمی و غیر آنزیمی را به حال اول باز می‌گرداند (۹). در سال‌های اخیر بیشتر توجه‌ها در مورد متفورمین متوجه امکان اثر محافظتی این دارو و همچنین اثر پاداکسندگی آن بوده است (۷). درمان با انواع اشکال دارویی برای جلوگیری از بروز التهابات یاخته‌ای در بافت و ترکیبات پاداکسندگی برای ممانعت از بروز تنش‌های اکسایشی در زخم‌های قرنیه در حال افزایش است. لذا در این مطالعه به بررسی اثر متفورمین روی زخم سوختگی قرنیه

در خرگوش پرداخته شده است.

۴-۷۰-۱۱۱۵) گاوآژ شد. در گروه شاهد مساوی با سایر گروه‌ها آب مقطر خوراندند شد.

مواد و روش کار حیوانات مورد استفاده

این تحقیق روی ۲۰ سر خرگوش سفید نیوزلندی نر بالغ در محدوده وزنی ۳-۲/۵ کیلوگرم انجام شد. خرگوش‌ها از بخش تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی موسسه پاستور ایران تهیه و در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. به منظور پرهیز از تنش و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچگونه آزمایشی به مدت یک هفته روی خرگوش‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات غذای یکسان) نگهداری شدند و در چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. تغذیه خرگوش‌ها با استفاده از گردهانه (پلت) آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و آب نیز بصورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. پیش‌نویس این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تأیید کارگروه‌های حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

ارزیابی آسیب شناسی بافتی

به منظور بررسی آسیب شناسی بافتی در پایان هفته سوم پس از ایجاد زخم، نمونه‌های بافتی از محل زخم اخذ شد. نمونه‌های برداشت شده در محلول فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شدند و جهت تهیه مقاطع بافتی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین استفاده شد. در درجه‌بندی آسیب شناسی بافت، شاخص‌های موثر بر ترمیم زخم مورد استفاده قرار گرفت و میزان عروق زایی، عدم تشکیل لایه‌های بافت پوششی، خیز بستره، بی‌نظمی رشته‌های کلاژن و حضور یا عدم حضور یاخته‌های التهابی مورد بررسی قرار گرفت. معیارهای مذکور به صورت +: عدم حضور، ۱+: کم، ۲+: متوسط و ۳+: زیاد امتیازدهی شدند.

تحلیل آماری

در نهایت داده‌های به دست آمده از مطالعات آسیب شناسی بافت با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۷ و آزمون کروسکال والیس (kruskal wallis) در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ از لحاظ آماری مورد واکاوی قرار گرفت.

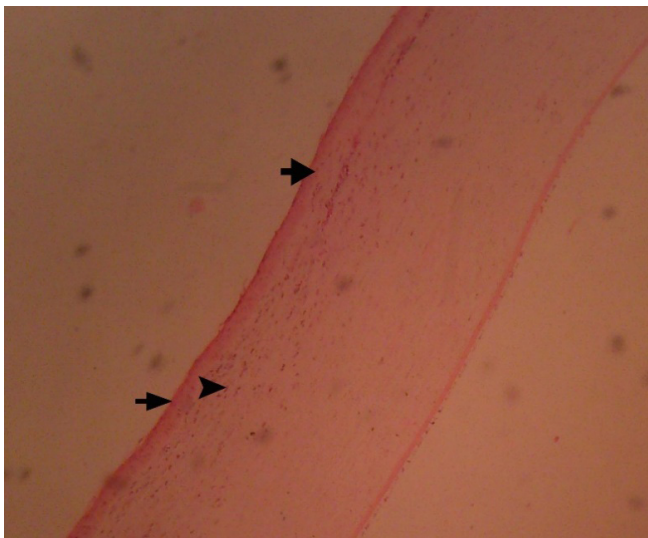
نتایج

نتایج مربوط به آسیب شناسی بافتی گروه‌های مختلف

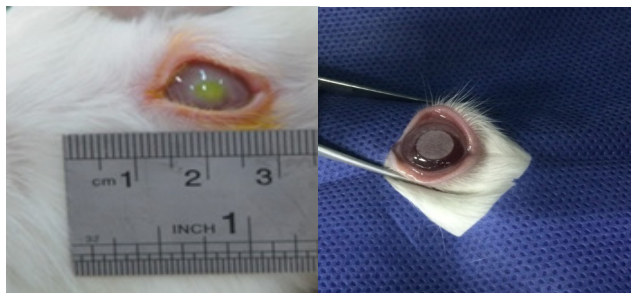
بررسی آسیب شناختی بافت نشان داد که میزان کاهش عروق زایی قرنیه، افزایش لایه‌های بافت پوششی قرنیه، کاهش میزان التهاب، کاهش ادم بستره و نظم طبیعی رشته‌های کلاژن در گروه‌های درمان شده با متفورمین در مقایسه با گروه شاهد بهتر بود.

روش ایجاد زخم سوختگی قرنیه

به منظور ایجاد بیهوشی از کنامین هیدروکلراید (۴۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بصورت داخل عضلانی استفاده شد. پس از بی‌هوشی کامل، چشم چپ هر کدام از خرگوش‌ها با ۲ قطره تتراکایین ۰/۵٪ آغشته شد. ۵ دقیقه پس از آغشته کردن چشم با قطره تتراکایین، کاغذ صافی مدور به قطر ۶ میلی‌متر که آغشته به ۳۰ میکرولیتر سود سوزآور ۱ نرمال است، برای مدت ۶۰ ثانیه در مرکز قرنیه قرار داده شد (۱۹). به دنبال برداشت کاغذ صافی چشم با ۲ میلی لیتر نرمال سالین سترون شستشو داده شد و بلافاصله پس از ایجاد سوختگی، رنگ آمیزی چشم با فلورسئین برای اطمینان از یکسان بودن زخم‌ها انجام شد.



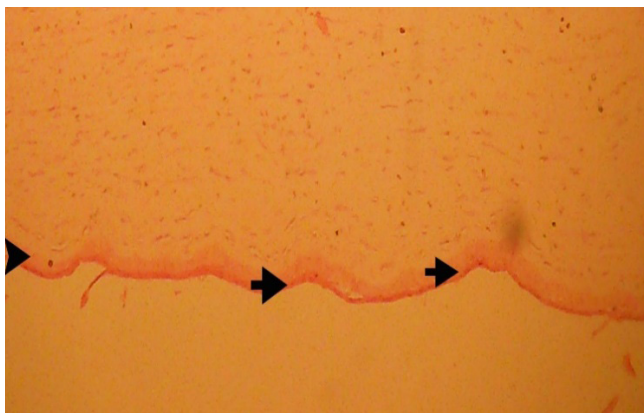
نگاره ۲: بافت قرنیه گروه شاهد، بافت پوششی نوزایش یافته (پیکان) ولی عروق خونی فراوانی و یاخته‌های التهابی (نوک پیکان) در بستره دیده می‌شود (H&E×160)



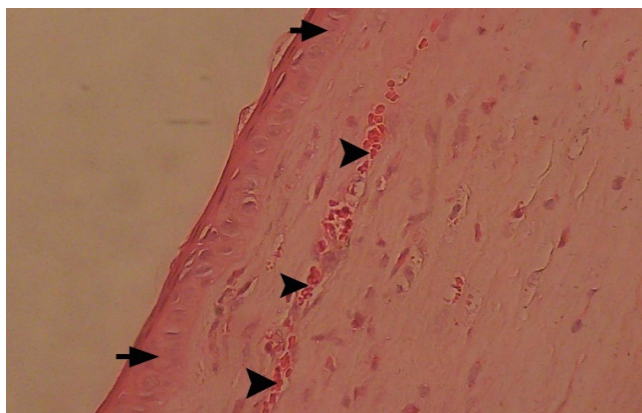
نگاره ۱. ایجاد زخم قرنیه توسط کاغذ صافی آغشته به سود سوزآور و رنگ آمیزی آن با فلورسئین

گروه‌های مورد مطالعه

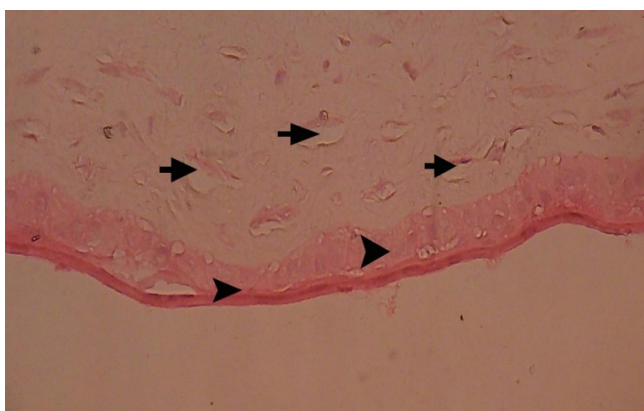
بعد از برگشت از بیهوشی خرگوش‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. در گروه آزمایش اول ۵۰ mg/kg، در گروه آزمایش دوم ۱۰۰ mg/kg و در گروه آزمایش سوم ۱۰۰ mg/kg بلافاصله در روز جراحی تا ۲۱ روز بعد از جراحی روزانه متفورمین (ساخت شرکت سیگما به شماره



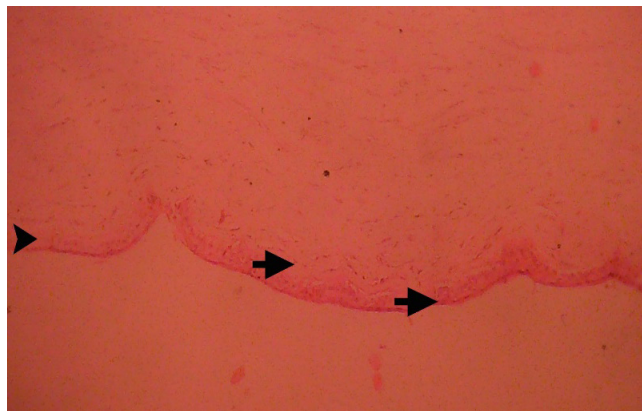
نگاره ۶: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۱۰۰ mg/kg، بافت پوششی سالم (نوک پیکان) و نوزایش یافته (پیکان) دیده می شود (H&E×160)



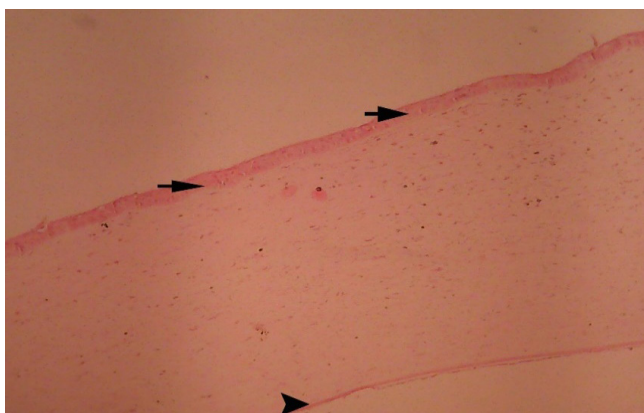
نگاره ۳: بافت قرنیه گروه شاهد، بافت پوششی نوزایش یافته (پیکان) و عروق خونی فراوان (نوک پیکان) و نامنظم بودن رشته‌های کلاژن و ادم بستره دیده می شود (H&E×640).



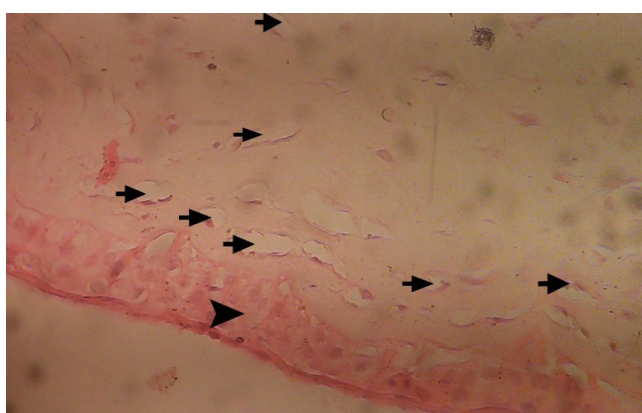
نگاره ۷: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۱۰۰ mg/kg، بافت پوششی نوزایش یافته (نوک پیکان) و عروق خون (پیکان) و کمی ادم بستره دیده می شود (H&E×640)



نگاره ۴: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۵۰ mg/kg، بافت پوششی سالم (نوک پیکان) و نوزایش یافته (پیکان) دیده می شود (H&E×160).



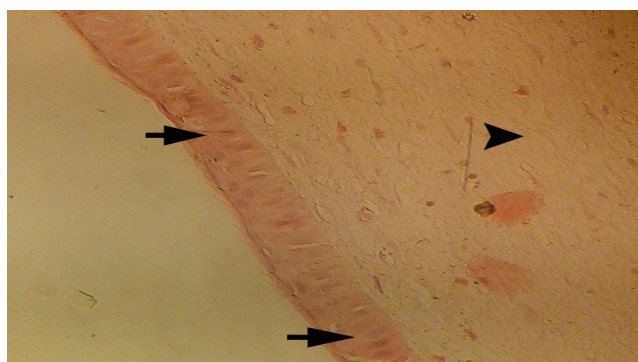
نگاره ۸: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۲۰۰ mg/kg، بافت پوششی نوزایش یافته (پیکان)، غشا دسمه (نوک پیکان) دیده می شود (H&E×160).



نگاره ۵: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۵۰ mg/kg، بافت پوششی نوزایش یافته (نوک پیکان) و عروق خونی (پیکان) و کمی خیز بستره دیده می شود نگاره ۵: بافت قرنیه گروه درمان با چنده ۵۰ mg/kg، بافت پوششی نوزایش یافته (نوک پیکان) و عروق خونی (پیکان) و کمی خیز بستره دیده می شود (H&E×640)

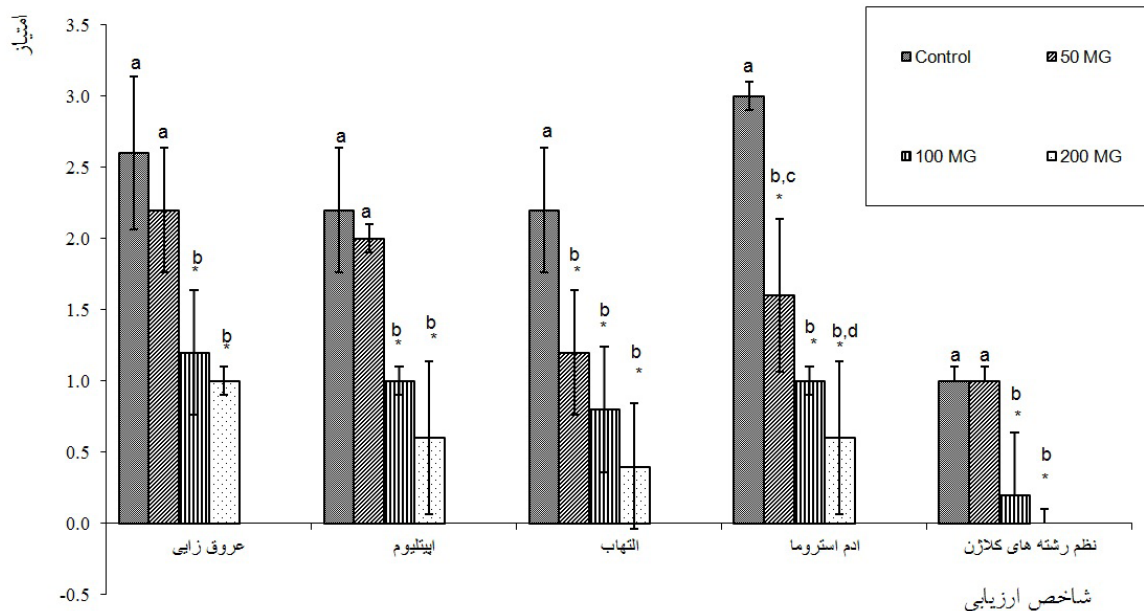
بحث

در مطالعه حاضر اثرات متفورمین روی التیام زخم سوختگی قرنیه در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که متفورمین می‌تواند موجب کاهش آسیب وارده به قرنیه در طی روند ترمیم زخم سوختگی قرنیه در خرگوش شود. پس از آسیب وارد شده به قرنیه یاخته‌های اطراف ناحیه‌ی آسیب دیده اعم از یاخته‌های بافت پوششی، بستره و آندوتلیوم با تقسیمات یاخته و فراخوان یاخته‌های التهابی نوتروفیل و ماکروفاژها و مونوسیت‌ها تلاش می‌کنند تا آسیب وارده را ترمیم و التیام بخشند که در نتیجه ناحیه ملتهب و خیزدار می‌شود. در بسیاری از موارد یاخته‌های بافت پوششی به دلیل فروپاشی غشای پایه و تراوش پروتئینازها قادر نخواهند بود اتصال لازم جهت برگرداندن لایه‌ها را فراهم کنند و فاصله بین یاخته‌های بافت پوششی زیاد و پیوند آنها سست می‌شود (۲۰). مطالعات فراوانی جهت ارزیابی روش‌ها، ترکیب و داروهای مختلف برای ترمیم زخم قرنیه و کاهش عوارض آن در موش آلبینو صورت گرفته است (۲۴). یکی از ساز و کارهای بیوشیمیایی بسیار مهمی که منجر به آسیب یاخته و مرگ آنها در مواجهه با عوامل شیمیایی می‌گردد، اثر بنیان‌های آزاد است که قابلیت ترکیب با لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را داشته و در نهایت می‌توانند منجر به آسیب و مرگ یاخته گردد. وجود زخم قرنیه منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و غیرفعال شدن



نگاره ۹: بافت قرنیه گروه درمان با چند mg/kg ۲۰۰، بافت پوششی نوزایش یافته (پیکان) و ادم بسیار اندک بستره و نظم رشته‌های کلاژن بستره (پیکان) دیده می‌شود (H&E×640).

با توجه به نتایج آماری حاصل از بررسی میانگین \pm خطای معیار مشخص گردید متفورمین موجب کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) میزان عروق زایی قرنیه، افزایش لایه‌های بافت پوششی قرنیه، کاهش میزان التهاب، کاهش ادم بستره و نظم طبیعی تر رشته‌های کلاژن در روز بیست و یکم بعد از جراحی در مقایسه با گروه شاهد شده است.



* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد.

a, b, c, d حروف غیریکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

نمودار. مقایسه نتایج آسیب‌شناختی بافت بین گروه‌های مورد مطالعه

آنزیم‌های پاداکسنده می‌شود. پراکسیداسیون چربی‌ها و ایجاد بنیان‌های آزاد اضافی، می‌تواند موجب آسیب پروتئین‌ها، DNA و آپوپتوز در چشم گردد (۱). امروزه علاوه بر استفاده‌ای که از متفورمین در جهت درمان دیابت، محققان جنبه‌های دیگری از اثرگذاری آن در دیگر بیماری‌ها نظیر کیست تخمدانی، مشکلات عروقی و تومورهای سرطانی نظیر سرطان پستان را مورد بررسی قرار دادند (۲۶). نشان داده شده که متفورمین می‌تواند در بقاء و التیام باله پوستی موثر بوده و باعث التیام آن در موش شود (۳۰). در مطالعه حاضر نیز بکاربردن متفورمین موجب التیام بافت پوششی چشم در خرگوش شد که با نتایج Taleb و همکاران (۲۰۱۴) همسو بود. Albertini بیان نمود که پروتئوگلیکان‌ها خواص پاداکسنده‌گی را در قرنیه داشته و نشان داده که تغییرات پاداکسنده‌گی حساسیت بافت قرنیه موش را به تنش‌های اکسایشی افزایش می‌دهد (۲). هرچند در این مطالعه، تنش‌های اکسایشی ناشی متعاقب آسیب به بافت قرنیه را اندازه‌گیری نشد، Petrali نشان داده‌اند که پس از مواجهه چشم موش با مواد شیمیایی، تغییرات استحالته‌ای یاخته‌های بافت پوششی قرنیه، آسیب بافت پوششی، خیز، تخریب کراتوسایت‌ها و ارتشاح یاخته‌های التهابی در بافت مشاهده می‌شود (۲۳). در مطالعه حاضر نیز تماس سودسوزآور با چشم موجب بروز تغییرات استحالته‌ای یاخته‌های بافت پوششی قرنیه و آسیب بافت پوششی چشم خرگوش‌ها شد که همسو با گزارشات Petrali و Albertini بود. پیش‌تر در تحقیقی Gargiulo اثرات پاداکسنده‌گی متفورمین را بررسی کرد که مشخص گردید متفورمین فعالیت پاداکسنده‌گی دارد. این مطالعه نیز از یکسو، پیرو مطالعات قبلی انجام گرفته بر روی اثرات پاداکسنده‌گی متفورمین و از سوی دیگر، به دلیل فقدان مطالعه قبلی در زمینه اثر متفورمین در ترمیم زخم قرنیه صورت گرفت. نتایج نشان‌دهنده این بود که این ماده اثرات مفیدی در بهبود و تسریع فرایند التیام زخم قرنیه ناشی از سوختگی شد. در مطالعه مشابهی Ambrish و همکاران اثرات متفورمین را بر فرایند ترمیم زخم در موش مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان‌دهنده این بود که متفورمین موجب تسریع ترمیم زخم تجربی ایجاد شده بر پوست پس از گذشت ۲۰ روز شد (۳). در تحقیقی مشابه Inouye و همکاران بیان کردند که متفورمین با بهبود و تنظیم مقادیر قند خون موجب تسریع فرایند ترمیم زخم ناشی از ایمپلنت دندان در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود (۱۵). متفورمین با افزایش تولید کلاژن و تحریک رگ‌زایی و کاهش فعالیت سلول‌های التهابی موجب تسریع ترمیم زخم می‌شود (۳). در مطالعه‌ای مشابه Wetzel و Herndon اثرات متفورمین را بر سوختگی مورد بررسی قرار دادند. محققین بیان کردند که متفورمین با کاهش EMT (epithelial-mesenchymal transition) موجب تسریع ترمیم زخم ناشی از سوختگی می‌شود. هرچند تا کنون تحقیقی مبتنی بر اثر متفورمین بر ترمیم زخم چشمی ناشی از سوختگی صورت نگرفته است، در این تحقیق برای اولین بار به این مهم پرداخته شد (۳۲). هرچند ساز و کار دقیق این فرایند بطور کامل مشخص نشده است اما نظریه‌هایی را در این خصوص بیان شده است و در مطالعات نشان داده شده که آسیب‌های شیمیایی قرنیه باعث تولید بنیان‌های سوپراکسیداز و آسیب قرنیه انسان می‌گردند (۲۱). بیان شده است که استفاده از متفورمین موجب کاهش تولید بنیان‌های آزاد و O_2^- در بیماران دیابتی در مقایسه با افراد سالم می‌شود (۱۲). تحقیقات به عمل آمده روی فعالیت پاداکسنده‌گی برخی

آنزیم‌ها نظیر -glutathione peroxidase, xanthine oxidase, xanthine oxidase و فعالیت‌های کاتالازی که روی قرنیه خرگوش انجام شده نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم‌ها با گذشت زمان کاهش پیدا می‌کنند. هرچند در مطالعه حاضر قادر به اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های اکسیداتیو نشدیم، اما نتایج مطالعه حاضر نیز همسو با گزارشات پیشین بود. فعالیت آنزیم‌های نام برده در حمایت قرنیه از آسیب‌های وارده حائز اهمیت است. بنیان‌های آزاد چشم که می‌توانند فعالیت آنزیمی یا غیر آنزیمی داشته باشند نظیر superoxide hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen با ایجاد زخم به صورت مکانیکی در قرنیه خرگوش افزایش پیدا می‌کنند، زیرا فعالیت پاداکسنده‌گی‌های ذکر شده در قرنیه آسیب دیده به طور محسوسی کاهش پیدا می‌کند (۵). در سال‌های اخیر بیشتر توجه‌ها در مورد متفورمین متوجه امکان اثر محافظتی این دارو و همچنین اثر پاداکسنده‌گی آن بوده است (۸). در تحقیق Tankova و دیگران برخی از اثرات زیستی متفورمین از جمله اثر آن بر کاهش واکنش‌های اکسایشی یاخته‌ای اثبات شد که حاکی از اثرات ارزشمند این دارو حتی در افراد غیردیابتی می‌باشد (۳۱). استقامتی و همکاران در سال ۲۰۱۲ تاثیر متفورمین بر روی نشانه‌های تنش اکسیداتیو و ذخیره پاداکسنده‌گی در بیماران مبتلا به بیماری قند نوع دو را مثبت اعلام کردند (۱۰). متفورمین از طریق فعال سازی AMPK، که منجر به القای پاداکسنده‌گی Thioredoxin می‌شود، می‌تواند سبب کاهش سطح ROS شود (۱۳). ممکن است متفورمین مورد استفاده در این مطالعه برخی از اثرات درمانی خود را از طریق تاثیر بر فعالیت این آنزیم‌ها انجام بدهد. بنیان‌های آزاد از دو طریق می‌توانند در بدتر شدن بیماری‌های چشم اثر سو بگذارند. اول آنکه باعث مرگ یاخته و استحالته می‌شوند و کارایی و طول عمر یاخته‌های چشمی را کاهش می‌دهند و سپس با کاهش فرایند ترمیم در صدمات وارده این اثر را تشدید می‌کنند. موج‌های نوری فرا بنفش بنیان طحی چشم نفوذ این امواج افزایش پیدا می‌کند. همچنین لایه اشکی چشم نیز حاوی مواد پاداکسنده‌گی است که با صدمه وارد شده به چشم، این خاصیت کاهش پیدا می‌کند (۲۸). شواهدی دال بر اثر درمانی و بهبود علائم ناشی از افزایش ROS توسط متفورمین وجود دارد. این دارو کاهش پاداکسنده‌های آنزیمی و غیر آنزیمی را به حال اول باز می‌گرداند (۹). مطالعات بونفون و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که متفورمین موجب کاهش OH^- می‌شود. بنابراین متفورمین بنیان آزاد اکسیژن (ROS) را جمع آوری و یا به طور غیر مستقیم تولید O_2^- را تعدیل می‌کند (۴). با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، ما قادر به اندازه‌گیری بنیان آزاد اکسیژن متعاقب تجویز متفورمین در چشم دچار سوختگی خرگوش نبودیم. پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی با اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های اکسیداتیو متعاقب استفاده از متفورمین در فرایند ترمیم زخم قرنیه انجام گیرد تا ساز و کار دقیق فیزیولوژیک یاخته‌ای و مولکولی متفورمین مشخص گردد. در نظریه و ساز و کارهای پیشنهادی دیگر نشان داده شده که متفورمین و ترکیبات بیگوانیدی دارای اثرات ضد التهابی می‌باشند (۹). تحقیقاتی که محققین بر روی عوامل موثر روی ایسکمی مغز انجام داده‌اند نشان می‌دهد استفاده از متفورمین عاملی موثر در پیشگیری و درمان مراحل ابتدایی ایسکمی می‌باشد؛ این اثر به دلیل خاصیت ضد التهابی و پاداکسنده‌گی متفورمین به دلیل مهار AMPK می‌باشد. متفورمین سه پروتئین موثر در تورم به نام‌های factor-kB, Tu-

3. Ambrish, C., Torgal, S.S., Patil, P.A., Malur, P.R. and Hiremath, S.V. 2009. Influence of oral anti-diabetic agents on wound healing in euglycemic male wistar rats. *Pharmacologyonline*, 1: 476-483
4. Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., Peynet, J. and Vasson, M. 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 52(5): 586-589.
5. Cejkova, J., Vejrazka, M., Plateník, J. and Stipek, S. 2004. Age-related changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase activities in the rabbit cornea. *Experimental gerontology*, 39(10): 1537-1543.
6. Cheng, J., Truong, L. D., Wu, X., Kuhl, D., Lang, F. and Du, J. 2010. Serum-and glucocorticoid-regulated kinase 1 is upregulated following unilateral ureteral obstruction causing epithelial-mesenchymal transition. *Kidney international*, 78(7): 668-678.
7. Cicero, A., Tartagni, E. and Ertek, S. 2012a. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Archives of medical science*, 8(5): 907-917.
8. Cicero, A. F., Tartagni, E. and Ertek, S. 2012b. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Archives of medical science: AMS*, 8(5): 907.
9. Demaille, D., Guigas, B., Chauvin, C., Batandier, C., Fontaine, E., Wiernsperger, N. and Leverve, X. 2005. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*, 54(7): 2179-2187.
10. Esteghamati, A., Eskandari, D., Mirmiranpour, H., Noshad, S., Mousavizadeh, M., Hedayati, M. and Nakhjavani, M. 2013. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 32(2): 179-185.
11. Etensel, B., Özkısacık, S., Özkara, E., Karul, A., Öztan, O. and Gürsoy, H. 2007. Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatric surgery international*, 23(2): 177-181.
12. Gargiulo, P., Caccese, D., Pignatelli, P., Brufani, C., De Vito, F., Marino, R., Lauro, R., Violi, F., Di Mario, U. and Sanguigni, V. 2002. Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18(2): 156-159.
13. Hou, X., Song, J., Li, X.-N., Zhang, L., Wang, X., Chen, L. and Shen, Y. H. 2010. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochemical and biophys*

2-Nrf2, heme oxygenase-1)) هم چنین (mor Necrosis Factor alpha Cyclooxygenase-2 glutathione, catalase activities را افزایش داده که خاصیت محافظت کننده دارند (۱۶). در این خصوص Isoda و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نقش متفورمین به عنوان مهار کننده چرخه پیش التهابی و مهار عامل هسته‌ای کاپا بتا در دیواره عروق را مورد مطالعه قرار داد (۱۶). مطالعه Huang و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داده که متفورمین می‌تواند از تولید فاکتور هسته‌ای بتا با واسطه‌گری فاکتور نکروز دهنده توموری و القا التهاب در یاخته‌های آندوتلیال جلوگیری کند (۱۴). نشان داده شده که آپوپتوزی که توسط تنش اکسایشی در یاخته‌های آندوتلیال به وجود آمده در درمان با متفورمین کم شده است (۸، ۹). نشان داده شده که متفورمین می‌تواند باعث کاهش تولید mRNA مربوط به پروتئین‌های چسبناک دیواره آندوتلیال همانند ICAM-1 و VCAM-1 با واسطه‌گری مهار TNF- α گردد. همچنین متفورمین می‌تواند باعث کاهش ترشح IL-6 با واسطه‌گری عامل نکروز دهنده توموری آلفا گردد. همچنین این دارو می‌تواند از تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی همانند IL1, IL6, IL8 نیز جلوگیری کند (۶). همانطور که از نتایج مطالعه حاضر دیده شد، متفورمین درمانی موجب کاهش سلول‌های التهابی و ادم در قرنیه شد. احتمال می‌رود متفورمین اثرات درمانی خود را بر چشم خرگوش از طریق این مکانیسم انجام بدهد. با توجه به مطالب ذکر شده، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گروه‌های تحت درمان با متفورمین نتایج آسیب‌شناسی بهتری داشتند. به این ترتیب که در گروه‌های درمانی التیام زخم قرنیه بهتر از سایر گروه‌ها انجام گرفته بود که از لحاظ کاهش میزان عروق‌زایی قرنیه، افزایش لایه‌های بافت پوششی قرنیه، کاهش میزان التهاب، کاهش خیز بسته‌تره و نظم طبیعی رشته‌های کلاژن نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار را نشان می‌داند که نتایج فوق با نتایج تحقیقات مشابه هم‌خوانی دارد. در نهایت می‌توان این طور بیان کرد که متفورمین دارویی موثر برای کاهش عوارض ناشی از زخم قرنیه و کمک کننده به روند التیام بافت آسیب دیده قرنیه می‌باشد و استفاده از آن در کنار سایر روش‌های درمانی برای زخم قرنیه می‌تواند مفید باشد. با توجه به محدودیت‌های این مطالعه اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های اکسیداتیو بدنبال استفاده از متفورمین مقدور نبود. به نظر می‌رسد شاید متفورمین برخی از اثرات درمانی خود را از طریق تاثیر بر فعالیت این آنزیم‌ها انجام بدهد. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه روشن شدن ساز و کار دقیق کار اندام‌شناختی یاخته‌ای و مولکولی متفورمین انجام پذیرد.

منابع مورد استفاده

1. Akita, T., Mazaki, Y., Kobayashi, K., Koga, N. and Iwamura, H. 1995. Crystal Structures and Magnetic Properties of Nitronyl Nitroxide and Imino Nitroxide Radicals Attached to Thieno [3, 2-b]-and Thieno [2, 3-b] thiophene Rings. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(7): 2092-2098.
2. Albertini, R., Passi, A., Abuja, P. and De Luca, G. 2000. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. *International journal of molecular medicine*, 6(2): 129-165.

- Steuhl, K. P. 2000. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*, 107(5): 980-989.
23. Petrali, J., Dick, E., Brozetti, J., Hamilton, T. and Finger, A. 2000. Acute ocular effects of mustard gas: ultrastructural pathology and immunohistopathology of exposed rabbit cornea†. *Journal of Applied Toxicology*, 20(S1): S173-S175.
24. Phillips, K., Arffa, R., Cintron, C., Rose, J., Miller, D., Kublin, C. L. and Kenyon, K. R. 1983. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Archives of ophthalmology*, 101(4): 640-643.
25. Podskochy, A., Gan, L. and Fagerholm, P. 2000. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*, 19(1): 99-103.
26. Sarchahi, A. A., Maimandi, A., Khodakaram Tafti, A. and Amani, M. 2008. Effects of acetylcysteine and dexamethasone on experimental corneal wounds in rabbits. *Ophthalmic research*, 40(1): 41-48.
27. Shimazaki, J., Yang, H.-Y. and Tsubota, K. 1997. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*, 104(12): 2068-2076.
28. Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J. L., Mydlarski, M. B. and Schipper, H. M. 2008. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(8): 1047-1055.
29. Strubbe, D. T., Brooks, D. E., Schultz, G. S., Willis-Goulet, H., Gelatt, K. N., Andrew, S. E., Kallberg, M. E., Mackay, E. O. and Collante, W. R. 2000. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*, 3(203): 111-119.
30. Taleb, S., Moghaddas, P., Balaei, M. R., Taleb, S., Rahimpour, S., Abbasi, A., Ejtemaei-Mehr, S. and Dehpour, A. R. 2014. Metformin improves skin flap survival through nitric oxide system. *Journal of surgical research*, 192(2): 686-691.
31. Tankova, T. 2002. Current indications for metformin therapy. *Romanian journal of internal medicine Revue roumaine de medecine interne*, 41(3): 215-225.
32. Wetzel, M. and Herndon, D. 2014. Celeste Finnerty Metformin down-regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in fibroblasts from burned patients. *Cancer & Metabolism*, 2(Suppl 1): 84.
- cal research communications, 396(2): 199-205.
14. Huang, N.-L., Chiang, S.-H., Hsueh, C.-H., Liang, Y.-J., Chen, Y.-J. and Lai, L.-P. 2009. Metformin inhibits TNF- α -induced I κ B kinase phosphorylation, I κ B- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *International journal of cardiology*, 134(2): 169-175.
15. Inouye, K.A., Bisch, F.C., Elsalanty, M.E., Zakhary, I., Khashaba, R.M. and Borke, J.L. 2014. Effect of metformin on periimplant wound healing in a rat model of type 2 diabetes. *Implant Dentistry*, 22(3):319-27.
16. Isoda, K., Young, J. L., Zirlik, A., MacFarlane, L. A., Tsuboi, N., Gerdes, N., Schönbeck, U. and Libby, P. 2006. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(3): 611-617.
17. Jian, M.-Y., Alexeyev, M. F., Wolkowicz, P. E., Zmijewski, J. W. and Creighton, J. R. 2013. Metformin-stimulated AMPK- α 1 promotes microvascular repair in acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(11): L844-L855.
18. Kasetsuwan, N., Wu, F. M., Hsieh, F., Sanchez, D. and McDonnell, P. J. 1999. Effect of topical ascorbic acid on free radical tissue damage and inflammatory cell influx in the cornea after excimer laser corneal surgery. *Archives of ophthalmology*, 117(5): 649-652.
19. Khaksar, E., Aldavood, S., Abedi, G., Sedaghat, R., Nekoui, O. and Zamani-ahmadm Mahmudi, M. 2013. The effect of sub-conjunctival platelet-rich plasma in combination with topical acetylcysteine on corneal alkali burn ulcer in rabbits. *Comparative Clinical Pathology*, 22(1):107-112.
20. Li, Y., Feng, G., Yi, Y. and Lin, J. 1999. The experimental investigation of epithelial healing in rabbit central corneal alkali wounds. *Yan ke xue bao Eye science/" Yan ke xue bao" bian ji bu*, 15(2): 74-77.
21. McKeag, D., Maini, R. and Taylor, H. 2002. The ocular surface toxicity of paraquat. *British journal of ophthalmology*, 86(3): 350-351.
22. Meller, D., Pires, R. T., Mack, R. J., Figueiredo, F., Heiligenhaus, A., Park, W. C., Prabhasawat, P., John, T., McLeod, S. D. and

