Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Comparison of antioxidant and analgesic effects of gallic acid and metformin in streptozotocin-induced hyperglycemic rats

Fatemeh Nohtani[1], Morteza Behnam Rasouli[1]*, Masumeh Kheirabadi[1]

ABSTRACT

Background and Aims: Hyperglycemia is associated with decreased activity of antioxidant enzymes and damage to peripheral nerves. The present study aimed to compare the antioxidant and analgesic effects of gallic acid (a natural compound) with metformin (a chemical drug) in hyperglycemic conditions.

Materials and Methods: Hyperglycemia was induced in male rats by the intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg/Kg. For this research, rats were assigned to four groups. Two groups were healthy control and hyperglycemic control rats that did not receive any drugs. The other two groups were hyperglycemic rats, which respectively received metformin at a dose of 300 mg/kg/day and gallic acid at a dose of 40 mg/kg/day. At the beginning of the 8-week period for all groups, every two weeks, hot-plate and tail-flick tests were taken, and at the end of the period, the rats were anesthetized, and their blood test was performed to measure the activity of antioxidant enzymes. Data analysis was performed in SPSS software using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: The administration of metformin and gallic acid in hyperglycemic rats for eight weeks increased the pain threshold and the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) ($P<0.05$).

Conclusion: Gallic acid, like Metformin, can be effective in the improvement of complications caused by hyperglycemic conditions. Therefore, gallic acid may have a clinical application in the treatment of diabetic patients in the future.

Keywords: Analgesic, Antioxidant, Gallic acid, Hyperglycemia, Metformin

Citation: Nohtani F, Behnam Rasouli M, Kheirabadi M. [Comparative investigation of antioxidant and analgesic effects of gallic acid and metformin in streptozotocin-induced hyperglycemic rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(2): 141-152. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/

Received: March 13, 2023 **Accepted:** July 2, 2023

[1] Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Tel: +985138805503 Fax: +985138796416 E-mail: behnam@um.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی گالیک‌اسید و متفورمین در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک القا شده با استرپتوزوتوسین

فاطمه نهتانی[۱]، مرتضی بهنام رسولی[۱]*، معصومه خیرآبادی[۱]

چکیده

زمینه و هدف: هیپرگلیسمی با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسیب به اعصاب محیطی همراه است. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی گالیک‌اسید (ترکیب طبیعی) با متفورمین (داروی شیمیایی) در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک صورت گرفت.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی برای القای هیپرگلیسمی، استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۶۰mg/kg به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار تزریق شد. برای این تحقیق موش‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. دو گروه موش‌های کنترل سالم و هیپرگلیسمی بودند که دارویی دریافت نکردند و دو گروه دیگر، موش‌های هیپرگلیسمی بودند که به ترتیب، متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک‌اسید با دوز ۴۰mg/kg/day دریافت نمودند. با شروع دوره ۸ هفته‌ای برای تمام گروه‌ها، هر دو هفته آزمون hot-plate و tail-flick گرفته شد و در پایان دوره موش‌ها را بیهوش کرده و خون‌گیری جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از حیوانات انجام شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و مقایسه بین میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام گردید.

یافته‌ها: تجویز متفورمین و گالیک‌اسید به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک به مدت ۸ هفته نسبت به گروه کنترل هیپرگلیسمی باعث شد تا آستانه درد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) افزایش یابد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: گالیک‌اسید همانند متفورمین می‌تواند برای بهبود عوارض ناشی از شرایط هیپرگلیسمی موثر واقع شود و ممکن است در آینده برای بیماران دیابتی کاربرد بالینی داشته¬باشد.

واژه‌های کلیدی: ضد درد، آنتی‌اکسیدان، گالیک اسید، هیپرگلیسمی، متفورمین

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰(۲): ۱۴۱-۱۵۲.

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۱

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

آدرس: مشهد- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم- گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۰۳ نمابر: ۰۵۱۳۸۷۹۶۴۱۶ پست الکترونیکی: behnam@um.ac.ir

مقدمه

دیابت به عنوان یک بیماری متابولیک شناخته شده، با هیپرگلیسمی مزمن همراه است. مبتلایان به این بیماری، در ترشح انسولین و یا اثربخشی آن دچار اختلال می‌شوند (۱). هیپرگلیسمی از مسیرهای polyol[1]، (محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته[2] (AGEs)، هگزوز آمین، پروتئین کیناز C، اختلال در عملکرد میتوکندری، افزایش فعالیت آنزیم پلی (ADP – ریبوز) پلیمراز، نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت عوارض بیماری دیابت از جمله نوروپاتی دیابتی دارد (۲). تقریبا نیمی از افراد دیابتی، مبتلا به نوروپاتی می‌شوند و علائم مرتبط با آن را که شامل لرزش، بی‌حسی، احساس سوزش و درد غیر قابل تحمل می‌شود؛ را بروز می‌دهند (۱). در بیماران دیابتی، آسیب به بافت عصبی، به‌ویژه در دستگاه عصبی محیطی افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که ۸۰ درصد از موارد نوروپاتی، در افراد دیابتی به صورت دیستال ظاهر می‌شود و اندام‌های تحتانی در افراد دیابتی بیشتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۳). از این‌رو در این تحقیق، عصب سیاتیک به‌عنوان یک عصب محیطی، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

هیپرگلیسمی علاوه بر آسیب به اعصاب محیطی و بروز دردهای نوروپاتیک، یکی از عوامل اصلی ایجاد استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی، سبب ایجاد و تشدید عوارض دیابت می‌شود (۴). هیپرگلیسمی از طریق چهار مسیر، سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌شود که عبارتند از: ۱) گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها و تشکیل AGEs، ۲) کاهش گلوتاتیون از طریق فعال سازی مسیر Polyol، ۳) اکسیداسیون خود به خودی گلوکز و ۴) افزایش نسبت $NADH/NAD^+$ به واسطه افزایش گلیکولیز (۵). در نهایت استرس اکسیداتیو با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز[3] (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز[4] (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز[5] (GPx)، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را تضعیف می‌کند (۶). متفورمین (1,1-dimethyl biguanide hydrochloride—$C_4H_{11}N_5$) به عنوان دارویی متداول، برای درمان دیابت تجویز می‌شود. این دارو عضوی از خانواده بی گوانیدها و توانایی کاهش قند خون و افزایش حساسیت به انسولین را دارد و اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی نیز از این دارو گزارش شده است (۸ و۷).

با توجه به اینکه نقش هیپوگلیسمی و آنتی‌اکسیدانی دوز ۳۰۰mg/kg متفورمین گزارش شده است (۷) لذا برای انجام این تحقیق نیز از همین دوز استفاده شد.

با توجه به اهمیت استرس اکسیداتیو در تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی، بروز نوروپاتی دیابتی و دردهای ناشی از آن و از طرف دیگر عوارض جانبی داروهای موجود، یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی فاقد عوارض جانبی و یا با عوارض جانبی کم، نیز بسیارحائز اهمیت است. از این‌رو با توجه به نقش گیاهان و میوه‌ها برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، در ادامه میوه انار و ترکیبات مؤثر آن، مورد توجه قرار می‌گیرند.

Punica granatum معروف به انار، از خانواده Punicaceae، بومی خاورمیانه و شمال آفریقا است (۹). علاوه بر میوه‌ی انار، از دیگر قسمت‌های درخت مانند برگ، ریشه و گل، به دلیل اثرات مفید آن‌ها بر سلامتی، در طب سنتی بسیاری از فرهنگ‌ها استفاده می‌شود (۱۰). پوست میوه‌ی *P. granatum* دارای اثرات ضد التهابی، ضد دردی و ترمیم زخم است (۱۳-۱۱). پونیکالین[6]، پونیکالاژین[7]، اسید الاژیک[8]، گالیک اسید[9] و آنتوسیانین‌ها از جمله ترکیبات موجود در پوست میوه انار هستند (۱۴). از میان این ترکیبات، گالیک اسید (3,4,5-trihydroxybenzoic acid— $C_7H_6O_5$) یکی از ترکیبات فنولی موجود در پوست میوه انار است که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی می‌باشد (۱۶ و ۱۵) و همچنین به علت اثر مهاری این ترکیب بر آنزیم‌های α- آمیلاز و α- گلوکوزیداز موجود در دستگاه گوارش، باعث کاهش قند خون نیز می‌شود (۱۷).

[1] Polyol pathway
[2] Advanced Gycation End-products (AGEs)
[3] Catalase
[4] Superoxide dismutase
[5] Glutathione peroxidase
[6] Punicalin
[7] Punicalagin
[8] Ellagic acid
[9] Gallic acid

از طرف دیگر، گزارش شده است که گالیک اسید با فعال سازی مسیر سیگنالینگ AKT[1] باعث کاهش بیان ژن‌های گلوکونئوژنیک گلوکونئوژنیک می‌شود و در ادامه به کاهش گلوکز و افزایش حساسیت به انسولین می‌انجامد (۱۸). علاوه‌براین خواص مختلفی از جمله فعالیت‌های ضد قارچی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نیز از گالیک اسید گزارش شده است (۱۹).

با توجه به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg (۱۵)، در مدل‌های مختلف، انتظار می‌رود؛ تجویز همین دوز از گالیک‌اسید بتواند اثرات مطلوبی برای درمان عوارض ناشی از هیپرگلیسمی مزمن، بویژه نوروپاتی و دردهای حاصل از آن، داشته باشد و همچنین باعث تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شود.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی، در تابستان ۱۴۰۱، در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. لازم به ذکر است؛ این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه فردوسی مشهد به شناسه (IR.UM.REC.1401.083) می‌باشد. برای انجام این پژوهش از آزمودنی‌های حیوان (موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار) استفاده شد و قوانین اخلاقی مربوط به نگهداری و کار با این حیوانات در آزمایشگاه رعایت شد.

برای انجام این مطالعه متفورمین (شرکت داروسازی ایران دارو، ایران) و گالیک اسید (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) به‌ترتیب با دوزهای ۳۰۰mg/kg/day و ۴۰mg/kg/day به مدت ۸ هفته و به روش گاواژ به موش‌های صحرایی تجویز شد.

حیوانات

در این مطالعه، از ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که از حیوان خانه گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی تهیه شدند و در محدوده وزنی ۲۹۰ تا ۲۷۰ گرم استفاده شد. این موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در درجه حرارت ۲۴-۲۶ درجه سانتی‌گراد و با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند.

روش القای دیابت و گروه‌های مورد مطالعه

استرپتوزوتوسین[2] (STZ) (شرکت سیگما آلدریچ آمریکا) در بافر سیترات حل شده و با دوز ۶۰mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۲۰). ۷ روز بعد از تزریق، میزان قند خون حیوانات ناشتا، با دستگاه گلوکومتر (مدل Accu check، ساخت شرکت Roch در کشور آلمان) اندازه‌گیری شد. افزایش قند خون به میزان بیش از ۳۰۰mg/dL، نمایانگر ابتلا حیوانات به دیابت در نظر گرفته شد. موش‌های صحرایی نرمال و دیابتی به شرح زیر در ۴ گروه ۸ تایی قرار گرفتند: موش‌های گروه ۱- کنترل سالم و ۲- کنترل هیپرگلیسمیک که دارویی دریافت نکردند و دو گروه آزمایشی مورد مطالعه، موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیکی بودند که ۳- ۳۰۰mg/kg/day متفورمین (۷) و ۴- ۴۰mg/kg/day گالیک اسید (۱۵) را به صورت خوراکی و از طریق گاواژ دریافت کردند. لازم به ذکر است که دوره درمانی برای تمام گروه‌ها، ۸ هفته (۲۱) در نظر گرفته شد.

آزمون‌های رفتاری

آزمون‌های رفتاری در این مطالعه به‌منظور بررسی زمان پاسخ به درد در گروه‌های مختلف به دو روش hot-plate و tail-flick صورت گرفت که در ادامه این آزمون‌ها شرح داده خواهد شد. هر دو آزمون برای هر موش صحرایی، با شروع دوره، هر دو هفته یک بار و به مدت ۸ هفته انجام شد. نتایج به‌دست آمده به شکل زمان تأخیر در عکس‌العمل بـــــه درد بر حسب ثانیه محاسبه گردید.

آزمون صفحه داغ[3]

در این آزمون، دمای دستگاه در ۱ ±۵۵ °C تنظیم و زمان پاسخ به درد حرارتی بصورت بلند کردن پا ثبت گردید. زمان خاتمه آزمون، ۵۰ ثانیه در نظر گرفته شد تا از آسیب‌های احتمالی به موش‌های صحرایی جلوگیری شود (۲۲).

[1] Protein kinase B (PKB), also known as AKT

[2] Streptozotocin
[3] Hot Plate Test

آزمون پس کشیدن دم[1]

در این آزمون، میزان بی‌دردی از طریق مدت زمان تأخیر در واکنش دم در مقابل اشعه آسیب‌رسان بافتی اندازه گیری شد. شدت نور دستگاه به گونه‌ای تنظیم گردید که زمان پاسخ‌دهی بین ۴ تا ۵ ثانیه باشد و زمان ۱۰ ثانیه به عنوان زمان قطع تابش نور به مثلث میانی دم حیوان به منظور جلوگیری از آسیب‌های احتمالی به حیوانات، در نظر گرفته شد (۲۲).

نمونه‌برداری

بعد از پایان دوره، موش‌های صحرایی سالم و هیپرگلیسمی در حالت ناشتا با تزریق کتامین (۵۰mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) بیهوش گردیده (۲۳) و خونگیری از قلب آن‌ها انجام گردید و در نهایت موش‌های صحرایی در حالت بیهوشی مردند. برای تهیه سرم از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، از دستگاه سانتریفیوژ (مدل ۵۴۳۰، شرکت Eppendorf، کشور آلمان) با سرعت ۳۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه، مورد استفاده قرار گرفت و در دمای ۲۰°C- جهت اندازه‌گیری میزان گلوکز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای این منظور با استفاده از نمونه سرم‌های تهیه شده و کیت‌های کوشان زیست آزما، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد نظر، با روش‌های زیر مورد سنجش قرار گرفتند.

الف) کاتالاز (CAT)

آنزیم کاتالاز، هیدروژن پروکسید (H_2O_2) را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. فعالیت این آنزیم به واسطه تغییرات غلظت H_2O_2 در طول موج ۲۴۰nm ارزیابی شد. در این روش، آنزیم کاتالاز موجود در نمونه سرم با تجزیه پراکسید هیدروژن سبب کاهش جذب این ماده در طول موج ۲۴۰nm شد و بر اساس تفاوت جذب به‌دست آمده در واحد زمان، فعالیت آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد.

ب) سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ابتدا برای تولید رادیکال‌های سوپراکسید از گزانتین و گزانتین اکسیداز استفاده شد. این رادیکال‌ها با ماده‌ای به نام فنیل تترازولیم کلراید واکنش داده و کمپلکس قرمز رنگ فورمازون را تشکیل می‌دهند. در صورت وجود آنزیم در نمونه، رادیکال‌های سوپراکسید با تبدیل شدن به H_2O_2 و O_2 مانع ایجاد فورمازون می‌شوند و در نهایت فعالیت آنزیم SOD از طریق مهار واکنش ذکر شده و اندازه‌گیری جذب نوری کمپلکس فورمازون در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

ج) گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از نمونه‌های سرم بر اساس واکنش زیر می‌باشد:

$$2GSH+H2O2 \xrightarrow{GPX} H_2O+GSSG \xrightarrow{GSSG\text{-}R} 2GSH$$

که در این واکنش گلوتاتیون اکسیده (GSSG) تشکیل و NADPH بعنوان کوآنزیم آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در طول موج ۳۴۰nm اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌ها

در این تحقیق آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین، گزارش شد. و پس از تائید نرمال بودن توزیع داده‌ها بر اساس آزمون کولموگروف – اسمیرنوف، مقایسه بین میانگین داده‌ها در تمام گروه‌های مورد مطالعه توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام و $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

[1] Tail Flick Test

یافته‌ها

اثر تجویز گالیک اسید و متفورمین بر آستانه درد

نتایج نشان داد که در گروه موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک نسبت به گروه موش‌های سالم، آستانه درد کاهش می‌یابد. در آزمون hot-plate در هفته‌های دوم، چهارم، ششم و هشتم ولی در آزمون tail-flick در هفته‌های چهارم، ششم و هشتم کاهش آستانه درد در گروه هیپرگلیسمیک نسبت به گروه سالم به صورت معنی‌داری مشخص شد ولی تجویز گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg و متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg به موش‌های هیپرگلیسمیک به مدت ۸ هفته باعث کاهش آستانه درد در هفته ششم و هشتم در آزمون‌های hot-plate (جدول ۱) و tail-flick (جدول ۲) نسبت به گروه موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک شد.

نتایج آزمون hot-plate در گروه‌های دریافت کننده گالیک‌اسید و متفورمین

اثر تجویز گالیک اسید و متفورمین بر سطح سرمی گلوکز

مقایسه میزان گلوکز سرم در گروه موش‌های هیپرگلیسمیک با گروه موش‌های سالم نشان دهنده افزایش معنی‌دار گلوکز پس از ایجاد شرایط هیپرگلیسمی می‌باشد و تجویز متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک‌اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صجرایی هیپرگلیسمیک به مدت ۸ هفته باعث کاهش در سطح سرمی گلوکز نسبت به گروه موش‌های کنترل هیپرگلیسمیک شد (نمودار ۱).

اثر تجویز گالیک‌اسید و متفورمین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، SOD و GPx در گروه موش‌های هیپرگلیسمیک با گروه موش‌های سالم نشان دهنده کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها پس از ایجاد شرایط هیپرگلیسمی می‌باشد و تجویز متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک‌اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صجرایی هیپرگلیسمی به مدت ۸ هفته باعث افزایش در میزان فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به گروه موش‌های کنترل هیپرگلیسمی شد (نمودار ۲، ۳ و ۴).

جدول ۱- مقایسه میزان آستانه درد توسط آزمون صفحه داغ در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	شروع دوره	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم
	میانگین ± انحراف معیار				
سالم (n=۸)	۱۰/۴۰ ± ۰/۱۹	۱۰/۸۵ ± ۰/۱۶	۱۱/۰۴ ± ۰/۲۳	۱۰/۶۹ ± ۰/۲۶	۱۱/۰۲ ± ۰/۱۵
هیپرگلیسمی (n=۸)	۹/۸۷ ± ۰/۴۲	** ۷/۱۵ ± ۰/۴۵	** ۶/۹۸ ± ۰/۶۶	*** ۶/۰۴ ± ۰/۳۳	** ۷/۶۰ ± ۰/۲۶
هیپرگلیسمی+گالیک اسید (n=۸) ۳۰۰ mg/kg	۱۰/۱۴ ± ۰/۱۳	* ۸/۲۸ ± ۰/۳۴	۸/۵۷ ± ۰/۱۴	## ۸/۷۸ ± ۰/۳۰	# ۸/۸۷ ± ۰/۲۲
هیپرگلیسمی+گالیک اسید (n=۸) ۴۰ mg/kg	۱۰/۳۸ ± ۰/۲۶	* ۸/۰۴ ± ۰/۲۹	* ۸/۱۹ ± ۰/۳۳	## ۸/۶۲ ± ۰/۲۰	* ۸/۳۶ ± ۰/۰۷

مقادیر بیان¬گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش¬های صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

*** P<۰/۰۰۱ ،** P<۰/۰۱ ،* P<۰/۰۵: اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

P<۰/۰۱ ،# P<۰/۰۵: اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمی

جدول ۲- مقایسه میزان آستانه درد توسط آزمون پس کشیدن دم در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	شروع دوره	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم
	میانگین ± انحراف معیار				
سالم (n=۸)	۸/۷۲ ± ۰/۴۲	۹/۰۲ ± ۰/۴۲	۸/۹۰ ± ۰/۲۰	۸/۶۰ ± ۰/۳۰	۸/۵۵ ± ۰/۴۵
هیپرگلیسمی (n=۸)	۸/۹۴ ± ۰/۲۷	۸/۰۰ ± ۰/۲۰	* ۶/۵۴ ± ۰/۴۶	* ۵/۲۲ ± ۰/۲۲	* ۴/۹۲ ± ۰/۲۷
هیپرگلیسمی+متفورمین (n=۸) ۳۰۰ mg/kg	۸/۷۷ ± ۰/۴۲	۸/۲۶ ± ۰/۲۴	۸/۱۲ ± ۰/۲۵	# ۷/۸۰ ± ۰/۵۹	# ۸/۲۵ ± ۰/۴۵
هیپرگلیسمی+گالیک اسید (n=۸) ۴۰ mg/kg	۸/۶۴± ۰/۵۲	۷/۹۹ ± ۰/۷۹	۸/۲۷ ± ۰/۲۵	# ۸/۴۱ ± ۰/۲۹	# ۷/۵۷ ± ۰/۴۳

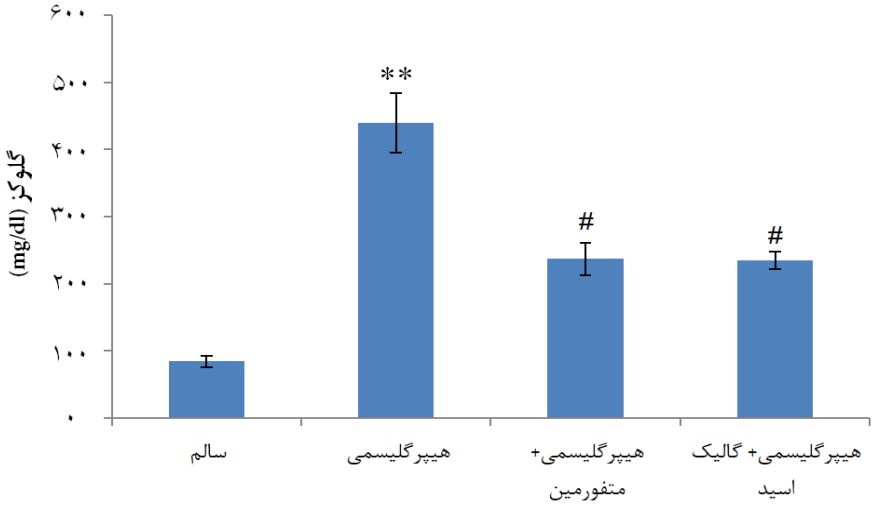
مقادیر بیان¬گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده¬ها در گروه¬های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

P<۰/۰۵ *: اختلاف معنی دار با گروه سالم

P<۰/۰۵ #: اختلاف معنی دار با گروه هیپرگلیسمی

اثر تجویز گالیک اسید و متفورمین بر سطح سرمی گلوکز

مقایسه میزان گلوکز سرم در گروه موش‌های هیپرگلیسمیک با گروه موش‌های سالم نشان دهنده افزایش معنی‌دار گلوکز پس از ایجاد شرایط هیپرگلیسمی می‌باشد و تجویز متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک‌اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک به مدت ۸ هفته باعث کاهش در سطح سرمی گلوکز نسبت به گروه موش‌های کنترل هیپرگلیسمیک شد (نمودار ۱).



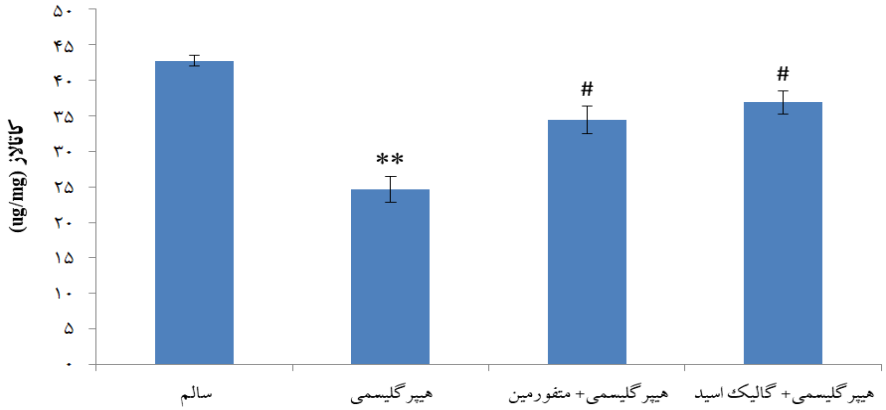
نمودار ۱- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به مدت ۸ هفته بر میزان گلوکز خون در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک. مقادیر بیان‌گر میانگین±انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش‌صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

P<۰/۰۱ **: اختلاف معنی دار با گروه سالم

P<۰/۰۵ #: اختلاف معنی دار با گروه هیپرگلیسمی

اثر تجویز گالیک اسید و متفورمین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

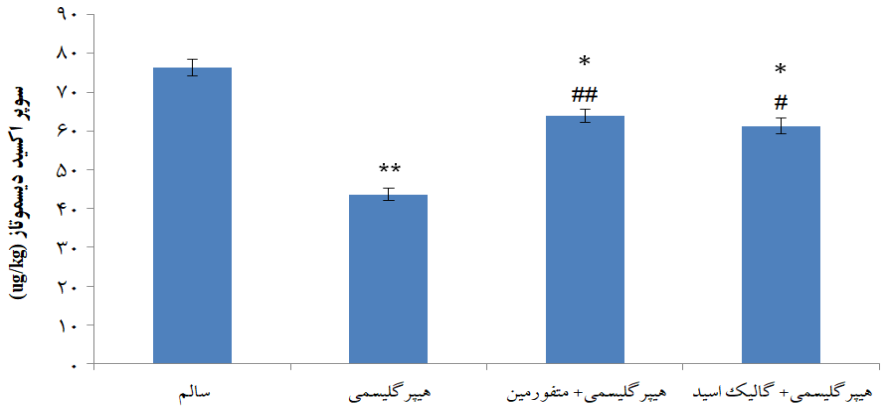
مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، SOD و GPx در گروه موش‌های هیپرگلیسمیک با گروه موش‌های سالم نشان دهنده کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها پس از ایجاد شرایط هیپرگلیسمی می‌باشد و تجویز متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک‌اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمی به مدت ۸ هفته باعث افزایش در میزان فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به گروه موش‌های کنترل هیپرگلیسمیک شد (نمودار ۲، ۳ و ۴).



نمودار ۲- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به مدت ۸ هفته بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) خون در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک. مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش‌صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

P<۰/۰۱ **: اختلاف معنی دار با گروه سالم

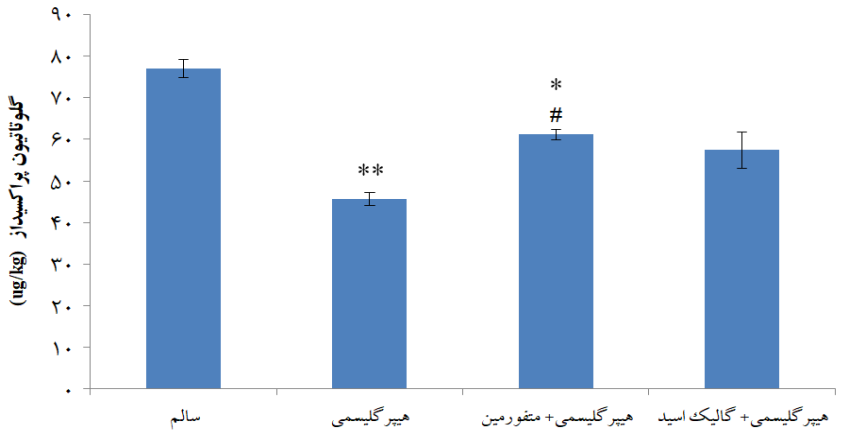
P<۰/۰۵ #: اختلاف معنی دار با گروه هیپرگلیسمی



نمودار ۳- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به مدت ۸ هفته برمیزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز خون در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک. مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش‌صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

P<۰/۰۵ *، P<۰/۰۱ **: اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

P<۰/۰۵ #، P<۰/۰۱ ##: اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمی



نمودار ۴- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به مدت ۸ هفته برمیزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز خون در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک. مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n=۸) موش‌صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.
P<۰/۰۵ *، P<۰/۰۱ **: اختلاف معنی‌دار با گروه سالم
P<۰/۰۵ #: اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمی

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در موش‌های صحرایی با شرایط هیپرگلیسمی نسبت به موش‌های سالم: ۱) آستانه درد و ۲) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، SOD و GPx کاهش یافت ولی ۳) گلوکز خون افزایش یافت.

STZ رایج‌ترین ترکیبی است که برای القای دیابت تایپ ۱ در جوندگان استفاده می‌شود و فعالیت سیتوتوکسیک آن توسط گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن، رهایش NO[1]، آلکیلاسیون و آسیب به DNA صورت می‌گیرد و در نهایت منجر به تخریب سول‌های β پانکراس و ایجاد شرایط هیپرگلیسمی می‌شود (۲۴). بنابراین افزایش قند خونی که در این مطالعه مشاهده شد، قابل انتظار بود.

هیپرگلیسمی نقش بسزایی در بروز نوروپاتی دارد. در این راستا نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که در بیماران دیابتی، آسیب به بافت عصبی افزایش و تغییرات پاتولوژیک بویژه در سیستم عصبی محیطی بوجود می‌آید (۲) و علاوه براین نتایج مطالعات ریخت‌شناسی مؤید آن است که دیابت منجر به آسیب‌های بافتی در عصب سیاتیک می‌گردد و بسته به میزان آسیب به بافت عصبی به صورت دردهای غیر قابل تحمل و یا بی‌حسی بروز می‌کند (۲۵و۴).

بنابراین کاهش آستانه درد در موش‌های هیپرگلیسمیک در مطالعه حاضر، قابل توجیه است.

گزارش شده است که در بیماران دیابتی با پیشرفت مراحل بیماری به تدریج سیستم آنتی‌اکسیدانی دچار اختلال شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (۶). این مورد نیز با نتایج مطالعه اخیر همخوانی دارد.

برای این مطالعه و به منظور بهبود علائم ذکر شده تحت شرایط هیپرگلیسمی، از یک داروی شیمیایی و یک ترکیب طبیعی استفاده شد.

از متفورمین به عنوان یک داروی شیمیایی، اثرات کاهش قند خون افزایش حساسیت به انسولین، اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۸ و ۷) و در مورد گالیک‌اسید به عنوان یک ترکیب طبیعی موجود در پوست میوه انار، فعالیت آنتی-اکسیدانی، ضد دردی و کاهندگی قند خون همچنین فعالیت‌های ضد قارچی، ضد میکروبی و ضد سرطانی گزارش شده است (۱۸-۱۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg/day و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک به مدت ۸ هفته باعث می‌شود تا ۱) آستانه درد و ۲) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه

[1] Nitric oxide

افزایش یابد ولی باعث ۳) کاهش گلوکز خون شد.

به نظر می‌رسد متفورمین از طریق کاهش گلوکونئوژنز کبدی، کاهش جذب گلوکز و افزایش استفاده از گلوکز توسط بافت‌ها، باعث کاهش قند خون می‌شود (۲۶) و همچنین از گالیک اسید نیز اثرات کاهندگی قند خون گزارش شده است. طبق مطالعات انجام شده، از یک سو گالیک اسید با مهار α- آمیلاز و α- گلوکوزیداز موجود در دستگاه گوارش، زمان هضم کربوهیدرات‌ها را کاهش می‌دهد و بنابراین سرعت جذب گلوکز و در ادامه گلوکز خون را کاهش می‌دهد (۱۷) و از سوی دیگر با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ AKT در سلول‌های کبدی با هومئوستاز گلوکز مرتبط است به این ترتیب که فعال شدن این مسیر باعث کاهش بیان ژن‌های گلوکونئوژنیک می-شود که به نوبه خود باعث کاهش گلوکز و نیز افزایش حساسیت به انسولین می‌شود (۱۸). و به این ترتیب این دو ترکیب توانسته‌اند تا حدی از بروز هیپرگلیسمی و به دنبال آن از آسیب به بافت عصبی محافظت و بنابراین از بروز دردهای ناشی از آسیب به بافت عصبی تا حدی جلوگیری کنند.

علاوه براین گزارش شده است که متفورمین، تحریک‌پذیری عصبی را کاهش می‌دهد و در مدل درد نوروپاتیک اثرات ضد دردی بروز می‌دهد (۸). اثرات ضد دردی متفورمین ممکن است مربوط به نقش مهاری این دارو بر فسفریلاسیون[1] (ERK) و در نتیجه غیر فعال کردن آن باشد. زیرا ERK به‌صورت فعال باعث افزایش تحریک‌پذیری عصبی در سیستم عصبی محیطی و کاهش آستانه درد می‌شود (۲۷).

در مورد گالیک اسید نیز گزارش شده است که این ترکیب می‌تواند، دردهای نوروپاتیک القا شده با پاکلی‌تاکسل[2] (PT) را کاهش دهد (۱۶) که با نتایج این تحقیق مغایرتی ندارد. اما برای یافتن دقیق‌تر مکانیسم یا مکانیسم‌های ضد دردی گالیک اسید نیاز به مطالعات بیشتری است.

همچنین نتایج این تحقیق نقش متفورمین و گالیک اسید را در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. طبق مطالعات گذشته، متفورمین اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را با غیرفعال‌سازی آنزیم‌های اکسیداز از جملهNAD(P)H oxidase و نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله CAT، SOD و GPx و کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید اعمال می‌کند (۲۸). گالیک اسید نیز در آسیب معده ناشی از اتانول باعث تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی از طریق افزایش در فعالیت آنزیم های CAT، SOD و GPx شد (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر نیز گزارش شده‌است که گالیک اسید با کاهش رادیکال‌های آزاد، سلول‌های بافت مغز را در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرد (۲۹). در این مطالعه نیز گالیک اسید توانست در شرایط هیپرگلیسمی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد که احتمالاً ویژگی آنتی-اکسیدانی گالیک اسید به‌علت ماهیت فنولی آن و توانایی این ترکیب در کاهش رادیکال‌های آزاد، باشد.

امروزه به دلیل اثرات جانبی داروهای سنتتیک، استفاده از گیاهان و یا ترکیبات استخراج شده از آن‌ها، به عنوان دارو، در کشورهای مختلف گسترش یافته است (۳۰). در این مطالعه مشخص شد که گالیک اسید به‌عنوان یک ترکیب طبیعی، توانست برخی از عوارض ناشی از شرایط هیپرگلیسمی را بهبود بخشد و تقریباً همانند متفورمین به‌عنوان یک داروی سنتتیک ، عمل کند و همانطور که ذکر شد؛ ترکیبات طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی کمتری می‌باشند. بنابراین یافتن ترکیبات طبیعی می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که گالیک اسید به عنوان یک ترکیب طبیعی موجود در پوست میوه انار، می‌تواند برای بهبود عوارض ناشی از دیابت به ویژه نوروپاتی دیابتی مؤثر واقع شود و شاید بتوان آن را به عنوان جایگزینی برای متفورمین در نظر گرفت. البته این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

تقدیر و تشکّر

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی تحت عنوان

[1] Extracellular Related Kinase
[2] Paclitaxel

بررسی مقایسه‌ای اثرات محافظت کنندگی و ضد دردی سدیم سالیسیلات، گالیک اسید، نانو ذرات نقره پوشیده شده با گالیک اسید و پلاسمای غنی از پلاکت بر عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک القا شده با استرپتوزوتوسین با کد ۳/۵۷۹۹۵ می‌باشد و با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد در حال اجرا است. نویسندگان این مقاله از دانشگاه فردوسی مشهد بابت حمایت‌های مالی از این پژوهش، نهایت قدردانی را دارند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Tan SY, Mei-Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed-Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. Diabetes Metab Syndr. 2019; 13(1): 364–72. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.10.008

2- Vinik AI, Nevoret ML, Casellini C, Parson H. Diabetic neuropathy. Endocrinol Metab Clin North Am. 2013; 42(4): 747–87. DOI: 10.1016/j.ecl.2013.06.001

3- Bruschi LKM, Rocha DA, Filho ELG, Barboza NMP, Frisanco PAB, Callegaro RM, et al. Diabetes Mellitus and Diabetic Peripheral Neuropathy. Open J Endocr Metab Dis. 2017; 7(1): 12-21. DOI: 10.4236/ojemd.2017.71002

4- Maritim AC, Sanders RA, Watkins-Iii JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17(1): 24-38. DOI: 10.1002/jbt.10058

5- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian J Clin Biochem. 2015; 30(1): 11–26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0

6- Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. (2004). Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. Tohoku J Exp Med. 2004; 203(3): 211–8. DOI: 10.1620/tjem.203.211

7- Nna VU, Abu Bakar AB, Md-Lazin MRML, Mohamed M. Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin–induced diabetic rats. Food Chem Toxicol. 2018; 120(2): 305–20. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.028

8- Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. Nat Med. 2013; 19(5): 1649–54. DOI: 10.1038/nm.3372

9- Labbe M, Ulloa PA, Lopez F, Saenz C, Pena A, Salazar FN. Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates (‘Wonderful’, ‘Chaca’ and ‘Codpa’) at different maturity stages. Chil J Agric Res. 2016; 76(2): 479–86. DOI: 10.4067/S0718-58392016000400012

10- Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. Trends Food Sci Technol. 2017; 69(1): 59–73. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.08.019

11- Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. Br J Nutr. 2012; 109(5): 802–9. DOI: 10.1017/S0007114512002206

12- Moreira J, Klein-Junior LC, Cechinel Filho V, Campos Buzzi F. Anti-hyperagesic activity of corilagin, a tannin isolated from phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol. 2013; 146(1): 318–23. DOI: 10.1016/j.jep.2012.12.052

13- Adiga S, Bairy KL, Meharban A, Punita ISR. Hypoglycemic effect of aqueous extract of Trichosanthes dioica in normal and diabetic rats. Int J Diabetes Dev Ctries. 2010; 30(1): 38–42. DOI: 10.4103/0973-3930.60011

14- Ulrike AF, Reinhold C, Dietmar RK. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). Food Chem. 2011; 127(2): 807–21. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156

15- Zhou D, Yang Q, Tian T, Chang Y, Li Y, Duan LR, et al. Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role. Biomed Pharmacother. 2020; 126: 110075. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110075

16- Kaur S, Muthuraman A. Ameliorative effect of gallic acid in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. Toxicol Rep. 2019; 6(1): 505–13. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.06.001

17- Oboh G, Ogunsuyi OM, Ogunbadejo MD, Adefegha SA. Influence of gallic acid on a-amylase anda-glucosidase inhibitory properties of acarbose. J Food Drug Anal. 2016; 24(3):627-634. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.03.003

18- Doan KV, Ko CM, Kinyua AW, Yang DJ, Choi YH, Oh IY, et al. Gallic Acid Regulates Body Weight and Glucose Homeostasis Through AMPK Activation. Endocrinology. 2015; 156(1): 157-68. DOI: 10.1210/en.2014-1354

19- Rosas EC, Correa LB, Henriques MGAnti inflammatory Properties of Schinus terebinthifolius and Its Use in Arthritic Conditions. Bioactive Food as Dietary Intervention for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. 2019; 28(1):489–503. DOI: 10.1016/j.jep.2015.10.014

20- Weidong X, Yaou Z, Naili W, Hua Z, Lijun D, Xiaohui M, et al. Novel effects of macrostemonoside A., a compound from Allium macrostemon Bung, on hyperlipidemia, and visceral obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. Eur J Pharmacol. 2008; 599(1-3): 159-65. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.09.042

21- Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101(3), 823-8. DOI: 10.1073/pnas.0307823100

22- Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. Curr Protoc Neurosci. 2007; Chapter 8, unit 8 9. DOI: 10.1002/0471142301.ns0809s41

23- Bhatia A, Saikia PP, Dkhar B, Pyngrope H. Anesthesia protocol for ear surgery in Wistar rats (animal research). Anim Models Exp Med. 2022; 5(2): 183-8. DOI: 10.1002/ame2.12198

24- Netaji T, Niture DG, Patil RS. Somani and Rajkumari S. Sahane. Effect of rutin on early diabetic neuropathy in experimental animals. J Nat Prod Pla Res. 2014; 4 (4):1–9. URL: https://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/effect-of-rutin-on-early-diabetic-neuropathy-in experimental-animals-7723.html

25- Várkonyi T, Körei A, Putz Z, Martos T, Keresztes K, Lengyel C, et al. Advances in the management of diabetic neuropathy. Minerva Med. 2017; 108(1): 419–37. DOI: 10.23736/S0026-4806.17.05257-0

26- Bai B, Chen H. Metformin: A Novel Weapon Against Inflammation. Front Pharmacol. 2021; 12:622262. DOI: 10.3389/fphar.2021.622262

27- Baeza-Flores GDC, Guzmán-Priego CG, Parra-Flores LI, Murbartián J, Torres-López JE, Granados-Soto V. Metformin: A Prospective Alternative for the Treatment of Chronic Pain. Front Pharmacol. 2020; 11: 558474. DOI: 10.3389/fphar.2020.558474

28- Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wu K, Deng X, et al. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. Chem Biol Interact. 2014; 216(1): 34-42. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.03.013

29- Cao L, Zhi D, Han J, Sah SK, Xie y. Combinational effect of curcumin and metformin against gentamicin-induced nephrotoxicity: Involvement of antioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic pathway. J Food Biochem. 2019; 43: e12836. DOI: 10.1111/jfbc.12836

30- Ahmad I, Ahmad Khan M.S, Cameotra SS. Quality assessment of herbal drugs and medici nal plant products. Enc Anal Chem. 2014; 1–17. DOI: 10.1002/9780470027318.a9946