



بررسی تأثیر اختلال در ریتم شبانه‌روزی بر اثربخشی درمان با متفورمین در بافت کبد و فعالیت

آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی

سحر ملزومی^۱، علی واحدی^۲، پیراسته نوروزی^۳، علیرضا مسعودی^{۴*}

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۴- گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰

چکیده

مقدمه: این مطالعه با هدف بررسی تأثیر اختلال ریتم شبانه‌روزی و درمان با متفورمین بر آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) و تغییرات بافت کبد در موش‌های دیابتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش نر بالغ ویستار به صورت تصادفی به شش گروه (n=۶) تقسیم شدند. شرایط نوری شامل ریتم طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی) و نور مداوم (۲۴ ساعت روشنایی) بود. مداخلات شامل گروه کنترل، گروه دیابتی القا شده با تزریق داخل صفاقی STZ (۵۵ mg/kg) و گروه دیابتی دریافت‌کننده متفورمین خوراکی (۵۰۰ mg/kg) دو بار در روز بودند. دیابت با قند خون ≥ 300 mg/dl تأیید شد و درمان به مدت دو هفته ادامه یافت. پس از بیهوشی و خون‌گیری از قلب، سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی با روش الایزا اندازه‌گیری و نمونه‌های کبدی با رنگ‌آمیزی H&E بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که نور مداوم به طور قابل توجهی آسیب کبدی ناشی از دیابت را تشدید کرد. القای دیابت در هر دو شرایط نوری منجر به افزایش معنی‌دار ALT، AST و ALP نسبت به کنترل شد ($P \leq 0.05$). نور مداوم به تنهایی نیز سبب افزایش این آنزیم‌ها گردید. درمان با متفورمین در هر دو شرایط نوری به طور معنی‌داری سطوح آنزیم‌های کبدی را نسبت به گروه‌های دیابتی کاهش داد ($P \leq 0.05$) و اثر محافظتی نشان داد. یافته‌های بافت‌شناسی نیز حاکی از آسیب شدید در گروه دیابتی تحت نور مداوم و بهبود نسبی ساختار بافت کبد در گروه‌های تیمار شده با متفورمین بود. **نتیجه‌گیری:** اختلال ریتم شبانه‌روزی می‌تواند آسیب کبدی را در دیابت تشدید کند. از این رو، حفظ ریتم سیرکادین طبیعی باید بخشی از مدیریت دیابت باشد. متفورمین با اثرات محافظتی خود در برابر آسیب کبدی ناشی از اختلال ریتم، می‌تواند گزینه درمانی مؤثری در بیماران دیابتی با اختلال خواب یا قرارگیری در معرض نور مداوم باشد.

واژه‌های کلیدی: اختلال ریتم سیرکادین، دیابت، متفورمین، آنزیم‌های کبدی، کبد.

*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۳۸۱۹، نمابر: ۰۲۳۳۲۳۹۳۸۲۰، Email: ar.masoudi90@gmail.com

ارجاع: ملزومی سحر، واحدی علی، نوروزی پیراسته، مسعودی علیرضا. بررسی تأثیر اختلال در ریتم شبانه‌روزی بر اثربخشی درمان با متفورمین در بافت کبد و فعالیت آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۳): ۲۶-۳۵.



مقدمه

ریتیم سیرکادین (Circadian Rhythm) به تغییرات فیزیولوژیک، متابولیک و رفتاری با چرخه‌ی تقریباً ۲۴ ساعته اطلاق می‌شود که توسط ساعت بیولوژیک درونی بدن تنظیم می‌گردد. این ریتیم‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی (مانند چرخه‌ی نور-تاریکی) قرار دارند و توسط هسته سوپراکیاسماتیک (SCN) در هیپوتالاموس کنترل می‌شوند (۱).

ساعت بیولوژیک از طریق تنظیم بیان ژن‌های ساعت‌گرد (مانند Clock, Bmal1, Per, Cry) فعالیت‌های حیاتی مانند ترشح هورمون‌ها (مثل ملاتونین و کورتیزول)، متابولیسم گلوکز، دمای بدن و چرخه‌ی خواب-بیداری را هماهنگ می‌کند (۲). اختلال در این ریتیم‌ها (مثلاً به دلیل شیفت‌های کاری، نور مصنوعی شبانه یا بیماری‌هایی مانند دیابت) با افزایش خطر اختلالات متابولیک، التهاب و آسیب اندام‌ها (از جمله کبد) همراه است (۳). کبد به‌عنوان یکی از اندام‌های مهم تحت کنترل ریتیم سیرکادین، فعالیت آنزیم‌های متابولیک (مانند آنزیم‌های گلوکونئوز و سم‌زدایی) را براساس چرخه‌ی شبانه‌روزی تنظیم می‌کند (۴). اختلال در این هماهنگی می‌تواند منجر به تجمع چربی، استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین شود که در پاتوژنز دیابت و بیماری‌های کبدی نقش کلیدی دارند. درک بهتر ارتباط بین ریتیم سیرکادین و عملکرد کبد می‌تواند به توسعه‌ی راهکارهای درمانی هدفمند (مانند زمان‌بندی مصرف داروها مانند متفورمین) برای بهبود پیامدهای بالینی در بیماران دیابتی کمک کند.

دیابت ملیتوس به‌عنوان یک اختلال متابولیک شایع، همراه با هایپرگلیسمی مزمن و اختلال عملکرد اندام‌های مختلف از جمله کبد می‌باشد (۵). کبد به‌عنوان ارگان مرکزی در متابولیسم گلوکز و سم‌زدایی، در شرایط دیابتی مستعد ابتلا به استئاتوز، التهاب و فیروز است (۶). از سوی دیگر، اختلالات ریتیم سیرکادین که توسط هسته سوپراکیاسماتیک تنظیم می‌شوند، نقش کلیدی در کنترل متابولیسم گلوکز و عملکرد کبد ایفا می‌کنند. اختلال در ریتیم شبانه‌روزی از طریق ایجاد ناهماهنگی بین SCN و ساعت‌های محیطی به‌ویژه در کبد، می‌تواند متابولیسم گلوکز و حساسیت به انسولین را مختل کند. مطالعه کومانس و همکاران نشان داد که حذف انتخابی SCN در موش‌ها موجب از بین رفتن ریتیم‌های روزانه فعالیت، تغذیه و مصرف اکسیژن، همراه با کاهش قابل‌توجه حساسیت انسولینی در کبد می‌شود، به‌طوری‌که سرکوب تولید گلوکز اندوژن در شرایط هایپرانسولینمیک تضعیف می‌گردد. این یافته‌ها حاکی از آن است که SCN از طریق مسیرهای عصبی خودکار (اتونومیک) نقش مستقیمی در تنظیم متابولیسم کبدی دارد و اثرات آن مستقل از نقش ساعت زیستی مرکزی نیز قابل مشاهده است (۷). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بین اختلالات ریتیم شبانه‌روزی و تشدید عوارض دیابت از جمله مقاومت به انسولین،

استرس اکسیداتیو و آسیب کبدی ارتباط معناداری وجود دارد (۸). متفورمین به‌عنوان داروی خط اول درمان دیابت نوع ۲، از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله فعال‌سازی AMPK اثرات مفیدی بر عملکرد کبد دارد (۹). سمیت کبدی معمولاً بر اساس شاخص‌های زیستی مانند افزایش سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) ارزیابی می‌شود. علاوه بر این، بروز علائم بالینی غیرطبیعی نظیر یرقان و التهاب کبد نیز می‌تواند نشان‌دهنده‌ی آسیب کبدی باشد. التهاب کبد ممکن است به دو شکل سیتوزولی یا کلستاتیک ظاهر شود (۱۰).

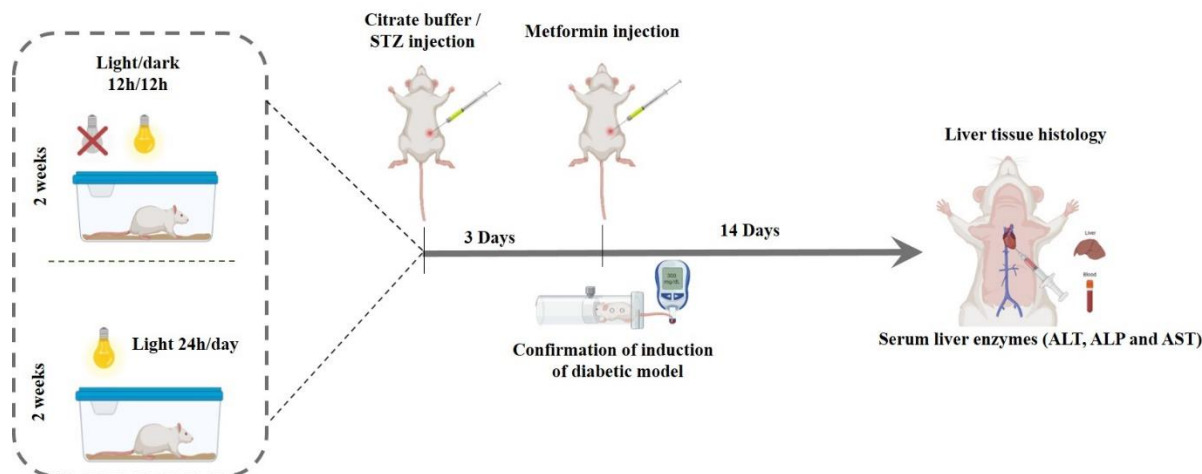
با وجود شواهد گسترده درباره‌ی اثرات محافظتی متفورمین بر آسیب‌های کبدی ناشی از دیابت، تأثیر اختلال ریتیم‌های شبانه‌روزی بر کارایی درمانی این دارو هنوز به‌طور دقیق شناخته نشده است. از آنجا که ریتیم‌های سیرکادین نقش اساسی در تنظیم متابولیسم، فعالیت آنزیم‌های کبدی و پاسخ به داروها دارند، اختلال در این ریتیم‌ها می‌تواند بر پاسخ بدن به درمان‌های ضد‌دیابتی تأثیرگذار باشد.

هدف از این مطالعه بررسی نقش اختلال ریتیم شبانه‌روزی در تعدیل اثرات محافظتی متفورمین بر عملکرد و ساختار بافت کبد در مدل حیوانی دیابت است. در این پژوهش، تغییرات سطح آنزیم‌های کبدی (ALT، AST، ALP)، الگوهای آسیب بافتی و میزان کارایی متفورمین در شرایط دیابت همراه با اختلال ریتیم سیرکادین مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این مطالعه با تمرکز بر تعامل میان اختلالات سیرکادین و پاسخ دارویی متفورمین، وجه تمایز خود را نسبت به پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد و می‌تواند گامی مهم در جهت تبیین مکانیسم‌های زمان‌وابسته‌ی اثربخشی داروها و بهینه‌سازی درمان‌های دیابت در بیماران مبتلا به اختلالات خواب باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰-۲۲۰ گرم از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهرو تیه شدند. سن حیوانات در هنگام آزمایش ۶ هفته بود و در شرایط استاندارد شامل دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در قفس‌های پلی‌کربناتی نگهداری شدند. رطوبت نسبی محیط ۴۰-۶۰ درصد بود و حیوانات به مدت یک هفته با محیط جدید سازگار شدند. تغذیه حیوانات با غذای فشرده مخصوص موش و آب آشامیدنی شهری به‌صورت آزاد انجام شد. پس از القای دیابت، حیوانات به‌صورت دو موش در هر قفس نگهداری شدند. با توجه به پرنوشتی و پرادراری موش‌های دیابتی، برای حفظ شرایط بهداشتی مناسب، بستر قفس‌ها (خرده‌چوب‌ها) به‌صورت روزانه تعویض می‌گردید و قفس‌ها نیز هر

تاریکی به مدت ۲ هفته نگهداری شدند. گروه دوم ($n=18$) تحت نور مداوم ۲۴ ساعته به مدت ۲ هفته قرار گرفتند تا اختلال در ریتم سیرکادین القا شود. هر گروه به سه زیرگروه شش تایی تقسیم شد: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه دیابتی، ۳- گروه دیابتی + درمان با متفورمین. مراحل انجام کار در شکل ۱ مشاهده می گردد.



شکل ۱- دیگرام مراحل انجام کار

علائم پرخوری، پرنوشی و پرادراری در حیوانات مشاهده شد همچنین اندازه گیری گلوکز خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر قند خون بالای ۳۰۰ ml/dl را نشان داد.

گروه دیابتی + درمان با متفورمین، روزانه به مدت دو هفته با استفاده از سرنگ گاواژ با داروی متفورمین به میزان ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ساعت ۸ صبح و ۸ شب تیمار شدند (۱۲). درمان با متفورمین ۷۲ ساعت پس از دیابتی شدن و مشاهده شدن علائم دیابت آغاز شد و به مدت دو هفته در هر دو گروه اختلال و ریتم طبیعی سیرکادین ادامه یافت.

پس از دو هفته درمان، حیوانات با تزریق کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند و خون گیری از قلب حیوانات انجام شد سپس خون ها در لوله های آزمایش قرار گرفتند تا در دمای اتاق لخته شوند. پس از لخته شدن، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفوژ قرار گرفتند تا سرم جدا شود. سرم ها با استفاده از سمپلر به میکروتیوپ های شماره گذاری شده منتقل و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کبد حیوانات به منظور بررسی بافتی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین) در فرمالین ۱۰ درصد غوطه ور شد. به همین منظور نمونه های بافت کبد فیکس شده به منظور آب گیری به مدت ۴۵ دقیقه در محلول های الکلی با غلظت های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد قرار داده

چهار روز یک بار ضد عفونی و شست و شو می شدند. تمامی مراحل این مطالعه مطابق با دستورالعمل های کار با حیوانات آزمایشگاهی و کد اخلاق صادر شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود (شماره کد اخلاق: IR.SHMU.AEC.1402.010) و مطابق با بیانیه هلسینکی انجام گردید.

حیوانات در این پژوهش به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول ($n=18$) تحت شرایط طبیعی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

حیوانات پس از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول به مدت ۲ هفته در شرایط طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی LD: Light/Dark) نگهداری شدند. گروه دوم به مدت ۲ هفته تحت نور مداوم ۲۴ ساعته (LL: Light/Light) قرار گرفتند (۱۱)، پس از این دوره، حیوانات هر دو گروه به سه زیرگروه تقسیم شدند:

گروه کنترل: حیوانات سیترات بافر به عنوان حلال استرپتوزوتوسین دریافت کردند.

گروه دیابتی: القای مدل دیابتی با تزریق داخل صفاقی تک دوز STZ (۵۵ mg/kg) انجام شد و ۳ روز بعد القای دیابت از طریق تست گلوکز تأیید شد.

گروه متفورمین + STZ: حیوانات دیابتی به مدت دو هفته، در ساعت ۸ صبح و ۸ شب، متفورمین دریافت کردند. پس از پایان دوره درمان، حیوانات تحت بیهوشی قرار گرفته و خونگیری از قلب انجام شد. آنزیم های کبدی در خون با روش الیزا اندازه گیری شد.

یک هفته پس از شروع آزمایش، گروه دیابتی با تزریق یک دوز تک بار داخل صفاقی ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم STZ (استرپتوزوتوسین) دیابتی شدند. در گروه کنترل، موش ها به صورت درون صفاقی بافر سیترات (pH=4.5) دریافت کردند. جهت تأیید القای مدل ۳ روز پس از تزریق

کاهش داد STZ LL (در برابر $P < 0.001$ STZ+Metformin LL)، اما اثر محافظتی آن در شرایط LL در مقایسه با LD ضعیف تر بود.

تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که هم شرایط نور ($P < 0.001$)، $F(1, 12) = 10.5$ و هم نوع مداخله درمانی ($P < 0.001$)، $F(2, 12) = 10.0$ به طور معنی داری بر سطح سرمی AST تأثیر می گذارند، اگرچه اثر متقابل معنی داری مشاهده نشد ($P = 0.43$ ، نمودار C2) در شرایط ریتیم طبیعی (LD)، دیابت (STZ) منجر به افزایش معنی دار AST گردید ($P < 0.001$) که درمان با متفورمین این سطح را به طور معنی داری کاهش داد ($P = 0.05$ ، نمودار B2). در شرایط اختلال ریتیم (LL)، دیابت نیز افزایش معنی دار AST را نشان داد ($P < 0.001$) و متفورمین آن را کاهش داد (نمودار B2، $P < 0.05$)، مهم تر آنکه، مقایسات بین گروهی نشان داد که هم قرار گرفتن در معرض نور مداوم به تنهایی (کنترل LL در مقابل کنترل LD: $P < 0.001$) و هم اختلال ریتیم در حضور دیابت (STZ LL در مقابل STZ LD: $P < 0.001$) به طور معنی داری سطح AST را افزایش داده و آسیب کبدی را تشدید کرده اند. اگرچه متفورمین در هر دو شرایط اثر محافظتی داشت، اما سطوح AST در گروه های درمان شده تحت LD باقی ماند ($P < 0.001$).

تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) برای سطح سرمی ALP نشان داد که اثرات اصلی هر دو عامل (شرایط نور و دارو) به شدت معنی دار بود، در حالی که اثر متقابل از نظر آماری معنی دار نبود. ($P = 0.14$)، $F(2, 12) = 2.35$ و $F(1, 12) = 4.57$ ، $P < 0.001$ و اثر اصلی متفورمین ($P < 0.001$)، $F(2, 12) = 18.0$ ، هر دو بسیار معنی دار بودند. در شرایط ریتیم طبیعی - (نمودار 3A)، دیابت (STZ) منجر به افزایش معنی دار ALP نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.001$) و متفورمین این افزایش را به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0.05$). به طور مشابه، در شرایط اختلال ریتیم (نمودار 3B)، دیابت ALP را به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل (LL) افزایش داد ($P < 0.001$) و متفورمین باعث کاهش معنی دار آن شد ($P < 0.05$). در مقایسات بین گروهی (نمودار 3C)، نگهداری در شرایط نور مداوم به تنهایی (کنترل LL در مقابل کنترل LD) منجر به افزایش معنی دار ALP گردید ($P < 0.05$). همچنین، سطح ALP در گروه دیابتی تحت LL به طور معنی داری بالاتر از گروه دیابتی تحت LD بود ($P < 0.05$) که حاکی از اثر تشدیدکننده اختلال ریتیم بر ALP است. قابل توجه است که متفورمین اگرچه ALP را در شرایط LL کاهش داد، اما این کاهش نسبت به گروه STZ LL معنی دار نبود (ns)، که نشان دهنده کاهش کارایی متفورمین در بازگرداندن ALP به سطح پایه در شرایط اختلال ریتیم شدید است.

شدند. سپس نمونه ها سه مرتبه در مخلوط الكل/زایلین (۵۰:۵۰) و زایلین خالص شست و شو داده شدند و در نهایت در پارافین قالب گیری شدند. برش هایی به ضخامت ۷ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه و بر روی لام های ژلاتینه قرار گرفتند. برای انجام رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، پارافین از نمونه ها حذف شد و سپس نمونه ها با عبور از محلول های الکلی با غلظت های مختلف برای رنگ آمیزی آماده گردیدند. میزان آنزیم های کبدی (ALT، AST و ALP) در سرم با استفاده از کیت پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل کیت اندازه گیری شد.

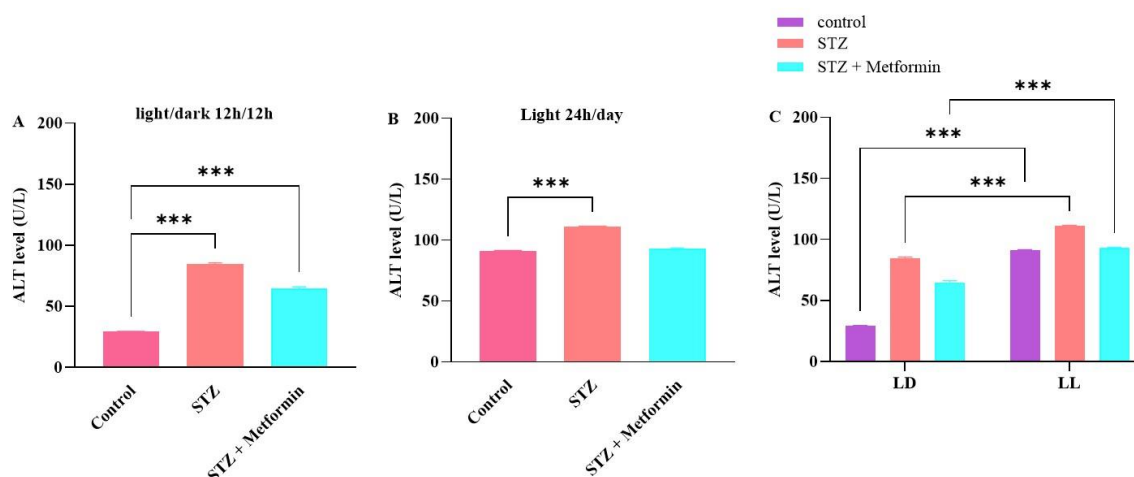
برای مقایسه سطح آنزیم ها در بین گروه ها در دو گروه الگوی تاریکی و روشنایی طبیعی و گروه تحت ۲۴ ساعت روشنایی، از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) و آزمون پس تست توکی برای مقایسه میانگین ها استفاده گردید. پیش از انجام آزمون های آماری، طبیعی بودن داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk test) مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد داده ها از توزیع طبیعی پیروی می کنند. تمامی تحلیل های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism انجام شد. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف استاندارد میانگین ($SEM \pm Mean$) ارائه شده و سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) بر روی سطح سرمی ALT نشان دهنده اثرات بسیار معنی دار برای هر سه عامل مورد بررسی بود. هم اثر متقابل ($P < 0.001$)، $F(2, 12) = 2.49$ ، هم اثر اصلی شرایط نور ($P < 0.001$)، $F(1, 12) = 28.74$ و هم اثر اصلی مداخله دارویی ($P < 0.001$)، $F(2, 12) = 8.92$ به صورت آماری بسیار معنی دار مشاهده شدند. این اثر متقابل معنی دار نشان می دهد که تأثیر درمان در شرایط نوری مختلف به طور معنی داری متفاوت است. در شرایط ریتیم طبیعی (نمودار 1A)، دیابت (STZ) منجر به افزایش چشمگیر ALT نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.001$)، که تجویز متفورمین این افزایش را به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0.001$). در شرایط اختلال ریتیم (نمودار 1B)، دیابت نیز افزایش ALT را نسبت به گروه کنترل (LL) نشان داد ($P < 0.001$) و متفورمین این افزایش را کاهش داد ($P < 0.05$). در مقایسه بین گروهی (نمودار 1C)، اختلال ریتیم سیرکادین (LL) به تنهایی و در شرایط دیابت، افزایش معنی دار ALT را نسبت به شرایط LD نشان داد (کنترل LL در برابر کنترل LD: $P < 0.001$)؛ STZ LL در برابر STZ LD: $P < 0.001$) که نشان دهنده اثر تشدیدکننده قوی اختلال ریتیم است. همچنین، متفورمین در شرایط LL به طور معنی داری ALT را

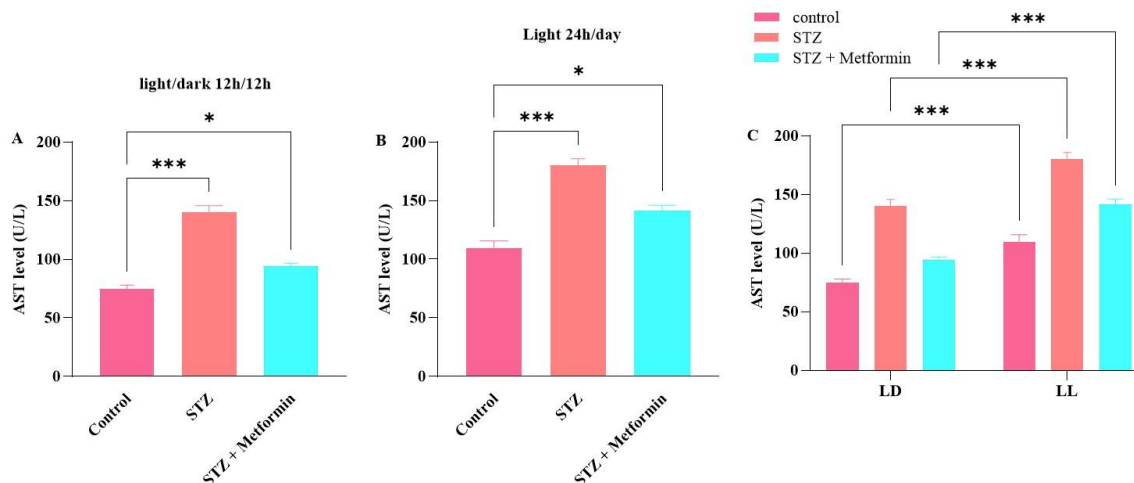
کانونی و اختلال در آرایش پرتال و لوبولی قابل مشاهده بود. در مقابل، گروه‌های درمانی بهبود نسبی در ساختار بافتی، کاهش التهابات و بازیابی نظم سلولی را نشان دادند. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت درمان بر بهبود آسیب‌های بافتی کبد است.

برای ارزیابی تأثیر مداخلات مورد مطالعه بر ساختار بافتی کبد، برش‌های بافتی تهیه‌شده از نمونه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه کنترل، ساختار طبیعی کبد شامل ردیف‌های منظم هپاتوسیت‌ها، هسته‌های مرکزی واضح و فضای سینوزوئیدی مشخص مشاهده شد. در گروه‌های آسیب‌دیده، تغییراتی نظیر تورم سلولی، نفوذ سلول‌های التهابی، نکروز



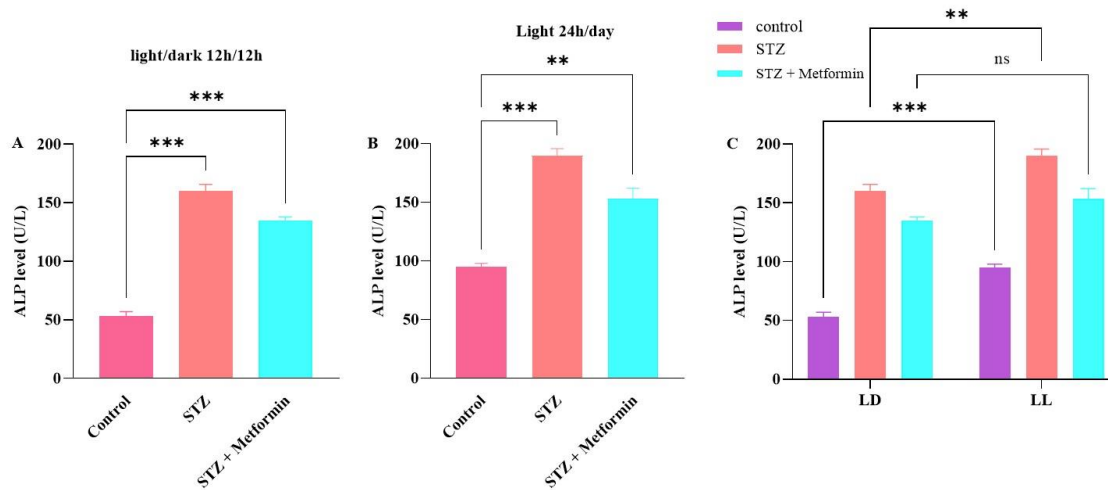
نمودار ۱- تأثیر اختلال ریتم سیرکادین و متفورمین بر سطح سرمی ALT (U/L)

نمودار A) شرایط LD (طبیعی)، نمودار B) شرایط LL (نور مداوم)، نمودار C) مقایسه تلفیقی LD و LL ($P < 0.001$) (***) مقایسه انحراف معیار $\pm$ میانگین



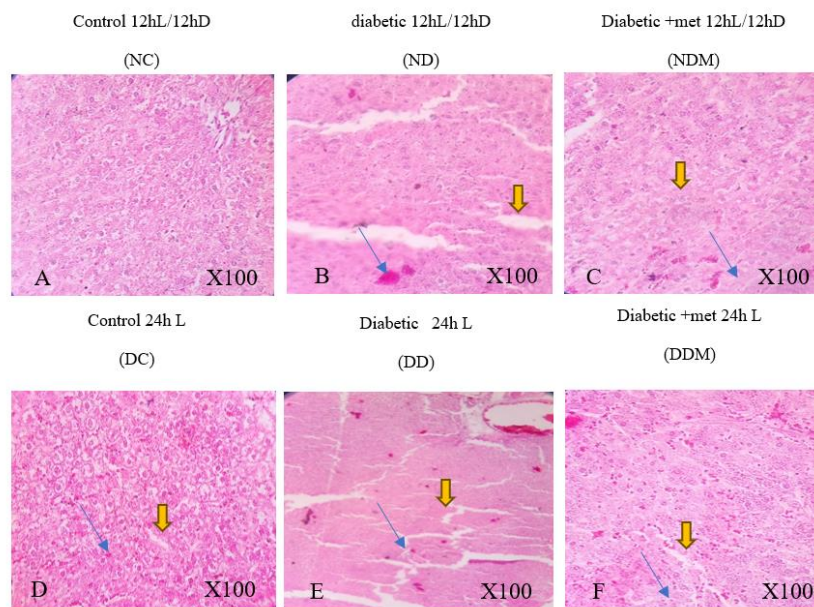
نمودار ۲- تأثیر اختلال ریتم سیرکادین و متفورمین بر سطح سرمی AST (U/L)

نمودار A: شرایط LD، نمودار B: شرایط LL، نمودار C: مقایسه تلفیقی LD و LL ($P < 0.001$ (***)، $P < 0.05$ (*)) مقایسه انحراف معیار $\pm$ میانگین



نمودار ۳- تأثیر اختلال ریتم سیرکادین و متفورمین بر سطح سرمی ALP (U/L)

نمودار A شرایط LD (طبیعی)، نمودار B شرایط LL (نور مداوم)، نمودار C مقایسه تلفیقی LD و LL (** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$ ، ns: غیر معنی‌دار)



شکل ۲- بررسی بافت‌شناسی کبد در کلیه گروه‌ها

A: هپاتوسیت‌ها دارای تغییرات واکوئولی و دژنراتیو نیستند و بافت نکروز دیده نمی‌شود. در فضای سینوزوئیدی پرخونی و افزایش سلول‌های التهابی مشهود نمی‌باشد. B: ستون‌های هپاتوسیت‌ها فاقد نظم بوده و هپاتوسیت‌ها دارای درجات مختلفی از تغییر و واکوئول دار شدن هستند. فضای پورتال تحلیل رفته و ورید مرکز لوبولی دارای اندازه‌های نابرابر می‌باشد. C: آرایش هپاتوسیت‌ها مناسب اما در فضای سینوزوئیدی مقداری اتساع و خون دیده می‌شود. هسته هپاتوسیت‌ها بسیار روشن و سیتوپلاسم آنها پر رنگ شده است. D: آرایش و نظم لوبولی بهتر از لام‌های E و F می‌باشد. اما اتساع ورید مرکز لوبولی و سینوزوئیدها همراه با تجمع خون در فضای سینوزوئیدی رویت می‌گردد. E: درجات شدیدی از تغییرات مشاهده می‌گردد. نظم بافت از بین رفته و در بافت از هم گسیختگی نمایان است. ورید مرکز لوبولی متسع و فضای سینوزوئیدی زیاد و پر خون است. هپاتوسیت‌ها تغییرات دژنراتیو و واکوئولی دارند. فضای پورتال کاملاً تحلیل رفته و در اکثر نواحی مشاهده نمی‌شود. F: تغییرات بافتی، بی‌نظمی و عدم آرایش هپاتوسیتی مشهود است. در برخی نواحی فضای سینوزوئیدی متسع گردیده و فضای پورتال تحلیل رفته است. درجات تغییر در هپاتوسیت‌ها کمتر می‌باشد.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مدل دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین، سطوح آنزیم‌های کبدی از جمله ALT، AST و ALP در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این یافته بیانگر آسیب سلولی و نکرز هپاتوسیت‌ها در اثر دیابت است. در واقع، هاپیرگلیسمی مزمن با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و اختلال در عملکرد میتوکندری سبب نشت آنزیم‌های سیتوزولی به جریان خون می‌شود (۱۳ و ۱۴). همچنین، فعال‌سازی مسیر التهابی NF- κ B افزایش بیان سیتوکین‌هایی مانند TNF- α و IL-6 می‌تواند به تخریب سلولی و التهاب بافتی منجر گردد. علاوه بر این، اختلال در متابولیسم لیپیدی و تجمع چربی در کبد (استئاتوز) در شرایط دیابت می‌تواند با آسیب ساختاری همراه شده و در افزایش سطح آنزیم‌های کبدی نقش داشته باشد (۱۵ و ۱۶).

در گروه دیابتی که متفورمین دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری در سطوح ALT و AST مشاهده شد که حاکی از اثر محافظتی این دارو بر بافت کبد است. متفورمین از طریق فعال‌سازی مسیر AMPK سبب مهار گلوکونئوز، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی می‌شود (۱۵ و ۱۶). علاوه بر اثرات وابسته به AMPK، متفورمین می‌تواند مسیرهای التهابی مانند NF- κ B را مهار و تولید ROS را کاهش دهد که این امر به حفظ یکپارچگی غشای هپاتوسیت‌ها و کاهش ترشح آنزیم‌های کبدی منجر می‌گردد (۱۷). با این حال، سطح آنزیم‌ها در این گروه هنوز بالاتر از گروه کنترل بود، که نشان می‌دهد متفورمین قادر به بهبود کامل آسیب کبدی در شرایط دیابت نیست و تنها بخشی از مسیرهای آسیب را تعدیل می‌کند.

در گروهی که در معرض نور مداوم قرار داشتند (اختلال در ریتم سیرکادین)، افزایش قابل‌توجهی در سطوح ALT، AST و ALP مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که اختلال در چرخه‌ی طبیعی روشنایی و تاریکی می‌تواند به‌عنوان یک عامل استرس‌زای فیزیولوژیک، آسیب کبدی را تشدید کند. برهم خوردن ریتم سیرکادین موجب ناهماهنگی در بیان ژن‌های ساعت (Clock, Bmal1, Per, Cry) و تغییر در چرخه‌های تنظیم‌کننده‌ی متابولیسم گلوکز و لیپید در کبد می‌شود (۱۸).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ژن‌های ساعت، بیان آنزیم‌های متابولیکی و مسیرهای سم‌زدایی کبد را کنترل می‌کنند؛ بنابراین، اختلال در این ریتم‌ها می‌تواند متابولیسم را ناهماهنگ کرده و حساسیت بافت کبد به استرس اکسیداتیو و التهاب را افزایش دهد (۱۹ و ۲۰).

علاوه بر تغییرات متابولیکی، اختلال ریتم شبانه‌روزی با تغییر در ترشح کورتیزول، ملاتونین و سایر هورمون‌های تنظیم‌کننده متابولیسم همراه

است که این امر به فعال شدن مسیرهای التهابی و افزایش استئاتوز کبدی منجر می‌شود (۱۳). همچنین، در گروه متفورمین تحت نور مداوم، اثر حفاظتی دارو کاهش‌یافته بود که احتمالاً ناشی از تغییر در فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک متفورمین تحت تأثیر اختلال ریتم است. بیان ناقل‌های دارویی مانند OCT1 و آنزیم‌های متابولیزه‌کننده CYP در کبد به‌صورت ریتمیک نوسان می‌کند و اختلال در این چرخه‌ها می‌تواند جذب یا متابولیسم متفورمین را کاهش دهد (۱۷ و ۲۱). از سوی دیگر، هم‌زمانی نامناسب بین فاز فعال‌سازی AMPK و فازهای متابولیک روزانه ممکن است باعث شود متفورمین نتواند در زمان بهینه بر مسیرهای هدف خود اثر بگذارد؛ پدیده‌ای که به‌عنوان کرونوفارماکولوژی داروها شناخته می‌شود (۲۲).

افزایش ALP در گروه‌های دیابتی و تحت نور مداوم نیز می‌تواند بیانگر آسیب صفراوی یا کولستاتیک باشد. مسیرهای تولید و ترشح صفرا نیز تحت کنترل ژن‌های ساعت قرار دارند و اختلال ریتم می‌تواند باعث تجمع صفراوی و افزایش سطح ALP شود (۱۸)، التهاب صفراوی ثانویه به استئاتوز و افزایش سیتوکین‌های التهابی نیز ممکن است در این تغییر نقش داشته باشد (۲۳).

از دیدگاه بالینی، این یافته‌ها بیانگر آن است که بیماران دیابتی با اختلال در چرخه خواب-بیداری یا مواجهه طولانی مدت با نور مصنوعی (مانند کارگران شیفت شب)، ممکن است در معرض خطر بالاتری از آسیب کبدی قرار گیرند و پاسخ ضعیف‌تری به درمان با متفورمین نشان دهند. از این‌رو، تنظیم الگوهای رفتاری مرتبط با ریتم سیرکادین از جمله بهینه‌سازی چرخه نور-تاریکی، اصلاح الگوهای خواب، یا حتی تجویز هم‌زمان ملاتونین می‌تواند اثربخشی درمان دارویی را افزایش دهد و به کاهش آسیب‌های متابولیکی کمک نماید.

در مجموع، این پژوهش نشان می‌دهد که تعامل میان ساعت زیستی و مسیرهای متابولیک نه‌تنها در بروز آسیب کبدی، بلکه در پاسخ به درمان دارویی نیز نقش تعیین‌کننده دارد. بنابراین، مداخله در ریتم سیرکادین و زمان‌بندی مصرف متفورمین می‌تواند به‌عنوان رویکردی نوین و کارآمد برای پیشگیری و درمان آسیب‌های کبدی ناشی از دیابت مطرح شود. انجام مطالعات آینده بر روی تعیین دقیق فاز زمانی بهینه مصرف متفورمین، بررسی بیان ژن‌های ساعت (Clock, Bmal1, Per2) و مسیرهای مرتبط با AMPK، NF- κ B و PPAR α در فازهای مختلف شبانه‌روزی، می‌تواند به طراحی راهبردهای بالینی مبتنی بر ریتم زیستی در درمان دیابت و بیماری‌های کبدی کمک کند.

این پژوهش اگرچه توانست اثرات متفورمین و اختلال ریتم شبانه‌روزی را بر عملکرد کبد در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین آشکار سازد، اما

نظارت بر مطالعه: سحر ملز می و علیرضا مسعودی.

حمایت مالی

منابع مالی در این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شد.

ملاحظات اخلاقی

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌دارند که این نتایج این پژوهش پیش از این در هیچ مجله و یا کنفرانسی ارائه و منتشر نشده و کلیه ملاحظات اخلاقی مرتبط با نگارش و تحقیقات مقاله رعایت شده است.

کد اخلاق

این مقاله حاصل از پایان‌نامه پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود به راهنمایی آقای دکتر علیرضا مسعودی و مشاوره خانم دکتر سحر ملز می با کد طرح IR.SHMU.REC.1401.095 می‌باشد.

References

- Fagiani F, Di Marino D, Romagnoli A, Travelli C, Voltan D, Di Cesare Mannelli L, et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:41. doi: 10.1038/s41392-022-00899-y
- Thakur A, Kishore R. Neurobiology of the circadian clock and its role in cardiovascular disease: Mechanisms, biomarkers, and chronotherapy. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 2025;19:100131. doi: 10.1016/j.nbscr.2025.100131
- Baek JH, Zhu Y, Jackson CL, Park YM. Artificial Light at Night and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal* 2024;48:847-63. doi: 10.4093/dmj.2024.0237
- Mukherji A, Bailey SM, Staels B, Baumert TF. The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of Hepatology* 2019;71:200-11. doi: 10.1016/j.jhep.2019.03.020
- Antar SA, Ashour NA, Sharaky M, Khattab M, Ashour NA, Zaid RT, et al. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023;168:115734. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115734
- Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyante AH, Budin SB. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2016;16:e132-41. doi: 10.18295/squmj.2016.16.02.002
- Coomans CP, van den Berg SA, Lucassen EA, Houben T, Pronk AC, van der Spek RD, et al. The suprachiasmatic nucleus controls circadian energy metabolism and hepatic insulin sensitivity. *Diabetes* 2013;62:1102-8. doi: 10.2337/db12-0507
- Radziuk JM. The suprachiasmatic nucleus, circadian clocks, and the liver. *Diabetes* 2013;62:1017-9. doi: 10.2337/db12-1765
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017;60:1577-85. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z
- Dumortier G, Cabaret W, Stamatidis L, Saba G, Benadhira R, Rocamora JF, et al. Hepatic tolerance of atypical antipsychotic drugs. *L'Encephale* 2002;28:542-51.
- Mohseni F, Vahedifar A, Garmabi K, Bakhtazad A, Garmabi B. Impact of circadian disruption on cart mma expression in nucleus accumbens: insights from constant light exposure and wheel-running activity in rats. *Shahroud Journal of Medical Sciences* 2025;11:8-16. doi: 10.32598/bcn.2022.1425.6

دارای چند محدودیت مهم است که باید در تفسیر نتایج مدنظر قرار گیرد. نخست آنکه، تمرکز مطالعه بر ارزیابی آنزیم‌های سرمی و بررسی‌های بافت‌شناسی بود و شاخص‌های مولکولی نظیر میزان بیان ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در مسیرهای استرس اکسیداتیو، التهابی و سیرکادین اندازه‌گیری نشدند؛ در نتیجه، مکانیسم‌های دقیق اثر متفورمین در شرایط اختلال ریت شبانه‌روزی تنها بر اساس شواهد غیرمستقیم مورد بحث قرار گرفتند.

در این پژوهش تنها از حیوانات نر استفاده شد و اثرات احتمالی تفاوت‌های جنسی بر پاسخ به متفورمین و حساسیت به اختلال ریت شبانه‌روزی بررسی نگردید؛ این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت در ترشح هورمون‌های جنسی و تعامل آنها با مسیرهای متابولیکی، نتایج متفاوتی در حیوانات ماده ایجاد کند.

طول دوره‌ی مواجهه با نور مداوم و درمان دارویی نسبتاً کوتاه بود؛ بنابراین، ارزیابی اثرات مزمن‌تر یا برگشت‌پذیری تغییرات مشاهده‌شده امکان‌پذیر نبود. مطالعات طولانی‌مدت می‌توانند نشان دهند که آیا اثرات محافظتی متفورمین در برابر آسیب‌های ناشی از اختلال ریت پایدار هستند یا با گذر زمان کاهش می‌یابند.

در این مطالعه تنها یک دوز از متفورمین مورد استفاده قرار گرفت و بررسی دوز پاسخ انجام نشد؛ در حالی که ممکن است اثرات محافظتی و ضدالتهابی دارو به‌طور وابسته به دوز تغییر کند.

در نهایت، زمان‌بندی تجویز متفورمین نسبت به چرخه‌های روشنایی- تاریکی کنترل‌شده نبود، در حالی که شواهد نشان می‌دهند پاسخ به داروها ممکن است بسته به فاز شبانه‌روزی متفاوت باشد. این مسأله می‌تواند منبعی از تغییرپذیری در نتایج باشد و لزوم بررسی دقیق‌تر کرونوتراپی متفورمین را در مطالعات آینده برجسته می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه پزشکی از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود با کد طرح IR.SHMU.AEC.1402.010 می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از کلیه افرادی که در انجام این پژوهش مساعدت و همکاری داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافعی در ارتباط با این پژوهش وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

هر یک از نویسندگان نقش مهمی در تهیه و تدوین این مقاله داشته‌اند.

طراحی و مفهوم پژوهش: علیرضا مسعودی

جمع‌آوری داده‌ها و تحلیل: علی واحدی، پیراسته نوروزی

نگارش و بازبینی مقاله: سحر ملز می

12. Meng X-M, Ma X-X, Tian Y-L, Jiang Q, Wang L-L, Shi R, et al. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:2232-7. doi: [10.26355/eurev_201709_15810](https://doi.org/10.26355/eurev_201709_15810)
13. Wang F, Zhang L, Wu S, Li W, Sun M, Feng W, et al. Night shift work and abnormal liver function: is non-alcohol fatty liver a necessary mediator? *Occupational and Environmental Medicine* 2019;76:83-9. doi: [10.1136/oemed-2018-105273](https://doi.org/10.1136/oemed-2018-105273)
14. Mohammadi M, Tabari M, Tavakolipor H, Mohammadi S. The effect of Allium saralicum R. M. Fritsch nanocapsules in yogurt on type 2 diabetes in male rats: physicochemical characterization and pharmacodynamics assessment. *3 Biotech* 2023;13:222. doi: [10.1007/s13205-023-03589-w](https://doi.org/10.1007/s13205-023-03589-w)
15. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science* 2012;122:253-70. doi: [10.1042/CS20110386](https://doi.org/10.1042/CS20110386)
16. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120:2355-69. doi: [10.1172/JCI40671](https://doi.org/10.1172/JCI40671)
17. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism* 2014;20:953-66. doi: [10.1016/j.cmet.2014.09.018](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018)
18. Tahara Y, Shibata S. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* 2016;13:217-26. doi: [10.1038/nrgastro.2016.8](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.8)
19. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology: CB* 2002;12:540-50. doi: [10.1016/s0960-9822\(02\)00759-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00759-5)
20. Forsyth CB, Voigt RM, Burgess HJ, Swanson GR, Keshavarzian A. Circadian rhythms, alcohol and gut interactions. *Alcohol* 2015;49:389-98. doi: [10.1016/j.alcohol.2014.07.021](https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.021)
21. Dallmann R, Brown SA, Gachon F. Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2014;54:339-61. doi: [10.1146/annurev-pharmtox-011613-135923](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135923)
22. Festus ID, Spilberg J, Young ME, Cain S, Khoshnevis S, Smolensky MH, et al. Pioneering new frontiers in circadian medicine chronotherapies for cardiovascular health. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 2024;35:607-23. doi: [10.1016/j.tem.2024.02.011](https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.02.011)
23. Andrade RJ, Chalasani N, Björnsson ES, Suzuki A, Kullak-Ublick GA, Watkins PB, et al. Drug-induced liver injury. *Nature Reviews Disease Primers* 2019;5:58. doi: [10.1038/s41572-019-0105-0](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0)





Investigation of the Effect of Circadian Rhythm Disruption on the Efficacy of Metformin Treatment in Liver Tissue and Hepatic Enzyme Activity in Diabetic Rats

Sahar Molzemi (Ph.D. Student)¹, Ali Vahedi (M.D.)², Pirasteh Norouzi (M.Sc.)³, Alireza Masoudi (Ph.D.)^{4*}

1- Student Research Committee, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

3- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

4- Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 10 June 2025, Accepted: 1 December 2025

Abstract:

Introduction: This study aimed to investigate the effects of circadian rhythm disruption and metformin treatment on liver enzymes (ALT, AST, and ALP) and hepatic tissue alterations in diabetic rats.

Methods: Thirty-six adult male Wistar rats were randomly divided into six groups (n=6). Lighting conditions included normal circadian rhythm (12 h light/12 h dark) and constant light (24 h light). The experimental groups consisted of: control (citrate buffer), diabetic rats induced by intraperitoneal injection of STZ (55 mg/kg), and diabetic rats treated orally with metformin (500 mg/kg, twice daily). Diabetes was confirmed by fasting blood glucose levels ≥ 300 mg/dl, and metformin treatment was continued for two weeks. At the end of the study, blood samples were collected from the heart under anesthesia, serum liver enzyme levels were measured by ELISA, and liver tissues were examined histologically using hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Results: Constant light exposure significantly exacerbated diabetes-induced liver injury. Diabetes induction under both lighting conditions caused a significant increase in serum ALT, AST, and ALP levels compared to controls ($P \leq 0.05$). Constant light alone also elevated these enzyme levels. Metformin treatment under both lighting conditions significantly reduced serum liver enzyme levels compared to the respective diabetic groups ($P \leq 0.05$), indicating a protective effect. Histological findings confirmed severe hepatic damage (hepatocyte disorganization and vacuolization) in diabetic rats under constant light, while metformin treatment partially improved hepatic architecture.

Conclusion: Circadian rhythm disruption may exacerbate liver injury in diabetes, highlighting the importance of maintaining normal circadian patterns. Metformin, through its hepatoprotective effects, could be an effective treatment for diabetic patients with circadian disturbances.

Keywords: Circadian rhythm disruption, Diabetes, Metformin, liver enzymes, liver.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: A. Masoudi, Email: ar.masoudi90@gmail.com

Citation: Malzami S, Vahedi A, Norouzi P, Masoudi A. Investigation of the effect of circadian rhythm disruption on the efficacy of metformin treatment in liver tissue and hepatic enzyme activity in diabetic rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(3):26-35.

