Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences No.140/ Dec-Jan 2025/43-57
DOI: 10.22034/30.5.33

Evaluating the effect of metformin on the expression levels of Sirt1, Nlrp3 and IL18 in the brain of cuprizone-induced demyelination mice model

Mahdad Abdi[1], Iraj Ragerdi Kashani[2], Maryam Shabani[3], Kaveh Haji-Allahverdipoor[4], Erfan Daneshi[5], Morteza Abouzaripour [6], Parichehr Pasbakhsh[7]

1. Assistant Professor, Department of Anatomical science/ Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, (Corresponding Author), Email: mehrdad.tb65@gmail.com, Tel: +989148646507, ORCID ID: 0000-0003-2963-7657
2. Professor, Department of Anatomy/ Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ORCID ID: 0000-0003-3842-7950
3. Ph.D, Department of Clinical Biochemistry/ Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ORCID ID: 0000-0002-5813-0655
4. Ph.D, Cellular and Molecular Research Center/ Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID ID: 0000-0001-7947-0045
5. Associate Professor, Department of Anatomical science/ Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID ID: 0000-0003-3427-5478
6. Associate Professor, Department of Anatomical science/ Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID ID: 0000-0002-5073-4171
7. Professor, Department of Anatomy/ Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, (Corresponding Author), Email: parichehr.pasbakhsh@gmail.com, Tel: +989122249612, ORCID ID: 0000-0002-6772-9889

ABSTRACT

Background and Aim: Multiple Sclerosis (MS) is a degenerative disease of the central nervous system characterized by the presence of demyelinating plaques and inflammation. The Nlrp3 inflammasome has been shown to be activated in MS and contributes to its progression. Metformin is a blood sugar-lowering drug with anti-inflammatory property. Given the importance of inflammation in the pathogenesis of MS, the current study aimed to evaluate the effect of metformin administration on the Nlrp3 inflammasome activity in a cuprizone-induced demyelination model.

Materials and Methods: In this study, male C57BL/6 mice were randomly distributed to the following groups: 1) control group that received a normal diet with intraperitoneal injection of normal saline, 2) cuprizone (CPZ) group which received ground food containing 0.2% cuprizone for 3 or 5 weeks, 3) treatment group that received a CPZ diet with intraperitoneal injection of metformin (100 mg/kg) for 3 or 5 weeks. Real-Time PCR technique was used to evaluate the expression levels of N3 and Sirt1 genes in the corpus callosum. Nlrp3 and IL18 protein levels were measured using immunohistochemistry (IHC)

Results: RT-PCR results showed that cuprizone significantly increased the mRNA and protein levels of Nlrp3 compared to the control group. However, metformin administration decreased Nlrp3 at the gene and protein levels compared to the CPZ groups. Also, metformin decreased the protein levels of IL18 compared to the CPZ groups. In addition, CPZ increased the expression of Sirt1 gene compared to the control group, while metformin therapy had no effect on Sirt1 expression.

Conclusion: Taken together, our findings indicate that metformin, by suppressing Nlrp3 inflammosome, has promising effects in modulating inflammatory responses in the cuprizone-induced demyelination model.

Keywords: Cuprizone, Inflammasome, Metformin, Multiple sclerosis.
Received: May 28, 2025 **Accepted:** Sep 24, 2025

How to cite the article: Mahdad Abdi, Iraj Ragerdi Kashani, Maryam Shabani, Kaveh Haji-Allahverdipoor, Erfan Daneshi, Morteza Abouzaripour, Parichehr Pasbakhsh. Evaluating the effect of metformin on the expression levels of Sirt1, Nlrp3 and IL18 in the brain of cuprizone-induced demyelination mice model. SJKU 2025;30(5):43-57. DOI: 10.22034/30.5.33

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره سی /آذر و دی ۱۴۰۴/۵۷-۴۳
DOI: 10.22034/30.5.33

بررسی تأثیر متفورمین بر سطح بیان Sirt1، Nlrp3 و IL18 در مغز موش‌های مدل دمیلیناسیون القاء شده با کوپریزون

مهداد عبدی[1]، ایرج راگردی کاشانی[2]، مریم شعبانی[3]، کاوه حاجی الله وردیپور[4]، عرفان دانشی[5]، مرتضی ابوذری پور[6]، پریچهر پاسبخش[7]

۱. استادیار، گروه علوم تشریح/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) پست الکترونیک: mehrdad.tb65@gmail.com، تلفن: ۹۸۹۱۴۸۶۴۶۵۰۷ +، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۹۶۳-۷۶۵۷

۲. استاد، گروه آناتومی/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۸۴۲-۷۹۵۰

۳. Ph.D، گروه بیوشیمی بالینی/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۸۱۳-۰۶۵۵

۴. Ph.D مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی/ پژوهشکده توسعه سلامت، کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۹۴۷-۰۰۴۵

۵. دانشیار، گروه علوم تشریح/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۴۲۷-۵۴۷۸

6. دانشیار، گروه علوم تشریح/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۰۷۳-۴۱۷۱

7. استاد، گروه آناتومی/ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، پست الکترونیک: parichehr.pasbakhsh@gmail.com، تلفن: ۹۸۹۱۲۲۲۴۹۶۱۲ +، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۶۷۷۲-۹۸۸۹

چکیده

زمینه و هدف: Multiple Sclerosis (MS) یک بیماری دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی است که با حضور پلاک‌های دمیلینه و التهاب مشخص می‌شود. مشخص‌شده اینفلامازوم Nlrp3 در MS فعال‌شده و به پیشرفت آن کمک می‌کند. متفورمین داروی کاهنده قند خون با خاصیت ضدالتهابی است. با توجه به اهمیت التهاب در پاتوژنزیس MS، مطالعه فعلی با هدف ارزیابی تأثیر تجویز متفورمین بر فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در مدل دمیلیناسیون القایی با کوپریزون انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، موش‌های نر C57BL/6 به‌صورت تصادفی در گروه‌های زیر توزیع شدند: ۱) گروه کنترل که رژیم غذایی طبیعی همراه با تزریق داخل صفاقی نرمال سالین دریافت کردند، ۲) گروه کوپریزون (CPZ) که غذای آسیاب شده حاوی ۰.۲٪ کوپریزون را برای ۳ یا ۵ هفته دریافت کردند، ۳) گروه‌درمانی که رژیم حاوی CPZ را به همراه تزریق داخل صفاقی متفورمین (100 mg/kg) به مدت ۳ یا ۵ هفته داشتند. برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های Nlrp3 و Sirt1 در ناحیه جسم پینه ای از فن Real-Time PCR استفاده گردید. سطح پروتئین‌های Nlrp3 و IL18 با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (IHC) موردسنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج RT- PCR نشان داد، کوپریزون موجب افزایش معنی‌دار میزان mRNA و پروتئین Nlrp3 نسبت به گروه کنترل گردید؛ اما تجویز متفورمین موجب کاهش Nlrp3 در سطوح ژن و پروتئین در مقایسه با گروه‌های CPZ شد. همچنین، متفورمین باعث کاهش میزان پروتئین IL18 در مقایسه با گروه‌های CPZ شد. علاوه بر این، CPZ بیان ژن Sirt1 را نسبت به گروه کنترل افزایش داد، درحالی‌که متفورمین تراپی تأثیری در بیان Sirt1 نداشت.

نتیجه‌گیری: درمجموع، یافته‌های ما نشان می‌دهد که متفورمین با سرکوب اینفلامازوم Nlrp3 دارای اثرات امیدوارکننده در تعدیل پاسخ‌های التهابی مدل دمیلیناسیون القاء شده با کوپریزون است

کلمات کلیدی: اینفلامازوم، کوپریزون، مالتیپل اسکلروزیس، متفورمین.

وصول مقاله:۱۴۰۴/۰۳/۰۷ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۴/۰۷/۰۲ پذیرش:۱۴۰۴/۰۷/۰۲

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

مقدمه

التهاب سیستم عصبی نقش تعیین‌کننده‌ای در پیشرفت بسیاری از اختلالات سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System) مانند پارکینسون، آلزایمر و مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis) را دارا است. مطالعات انجام‌شده بر روی پاتوفیزیولوژی بیماری MS نشان داده‌اند که تشکیل پلاک‌های التهابی در مغز این بیماران با مهاجرت سلول‌های ایمنی واکنشی به بافت مغز، فعال شدن سلول‌های گلیال و ترشح واسطه‌های التهابی مرتبط است که درنهایت منجر به میلین زدایی می‌گردد (۱). با توجه به نقش مخربی که فرآیندهای التهابی در بیماری‌های نورودژنراتیو (Neurodegenerative) ایفا می‌کنند، شناخت دقیق و هدف‌گیری مکانیسم‌هایی که از طریق آن‌ها التهاب سیستم عصبی باعث آسیب CNS می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد. امروزه مشخص گردیده پیشرفت میلین زدایی در بیماری MS به همکاری مستقیم ایمنی ذاتی و سازشی وابسته است (۲). اینفلامازوم ها (Inflammasomes) کمپلکس‌های چند پروتئینی سیتوزولی هستند که در پاسخ به الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (باکتری‌ها، ویروس‌ها) و نیز الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (برون‌زاد: هیالورونان، کریستال‌های اسید اوریک، ATP; درون‌زاد: پروتئین‌های miss fold، نوکلوئیک اسیدها) تشکیل‌شده و منجر به واکنش ایمنی میزبان می‌گردند. (Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing pyrin domain containing 3) Nlrp3 شناخته‌شده‌ترین عضو این مجموعه است که در تنظیم التهاب ناشی از ایمنی ذاتی (ماکروفاژ/میکروگلیا) فعالیت دارد. اینفلامازوم Nlrp3 از سه جزء تشکیل‌شده است: ۱. پروتئین Nlrp3 که به‌عنوان داربست و رسپتور عمل می‌کند ۲. پروتئین ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) که نقش آداپتور را دارد ۳. یک زیموژن غیرفعال به نام پروکاسپاز-۱ (Procaspase-1) که عملکرد پروتئازی دارد. به‌طور کلاسیک در رابطه با نحوه فعال شدن اینفلامازوم Nlrp3 گزارش‌شده است که در مرحله اول در اثر تحریک گیرنده‌های Pattern recognition receptors (مثال تیپیک، اتصال لیپو پلی ساکاری دیواره باکتری به گیرنده‌های Toll-like receptors) پروتئین NF-kB(p65) فعال‌شده و میزان رونویسی از ژن‌های Nlrp3 و IL1B را افزایش می‌دهد. سپس از روی mRNA های بالغ پروتئین ساخته‌شده و در سیتوپلاسم جمع می‌شوند. در مرحله بعد محرک‌هایی مانند عفونت‌های میکروبی، گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب سلولی موجب الیگومریزاسیون اینفلامازوم Nlrp3، فعال شدن آنزیم پروکاسپاز-۱ و نهایتاً تبدیل سایتوکاین های نابالغ پیش اینترلوکین-۱ بتا (pro-IL1B) و پیش اینترلوکین-۱۸ (pro-IL18) به شکل فعال و ترشحی می‌شود (۳). گزارش‌شده که فعال شدن Nlrp3 در میکروگلیا های مغز موجب آزادسازی مدیاتورهای پیش التهابی IL1B و IL18می‌شود که به نوبه خود با فراخواندن سلول‌های ایمنی به محل آسیب باعث تشدید آبشار التهاب می‌گردند (۴). در حقیقت، اینفلامازوم Nlrp3 به‌عنوان تقویت‌کننده قوی التهاب سیستم عصبی شناخته‌شده که فعالیت بیش‌ازاندازه آن در پیشرفت بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو ازجمله MS مؤثر است (۵). در این رابطه گزارش‌شده است که استفاده از موش‌های فاقد ژن Nlrp3 به‌طور قابل‌توجهی از شدت بیماری در مدل‌های حیوانی MS می‌کاهد (۶). به همین ترتیب، استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی Nlrp3، یا دیگر مهارکننده‌های دارویی سطح IL1B و IL18 را در موش‌های مبتلابه EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) کاهش داده و اثربخشی درمانی قابل قبولی را نشان دادند و این ایده را به ارمغان آوردند که مهار اینفلامازوم Nlrp3 می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در کاهش میزان التهاب و آسیب بافتی در بیماری MS مدنظر قرار بگیرد (۷).

متفورمین جزء خانواده بیگوانیدها (Biguanides) بوده و به‌عنوان داروی خط اول در کنترل دیابت نوع دو تجویز

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که متفورمین با فعال کردن پروتئین AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) موجب کاهش قند خون و افزایش حساسیت به انسولین می‌شود (۸). علاوه بر این، شواهد فزاینده نشان می‌دهد که متفورمین با تحریک AMPK، مکانیسم‌هایی را فعال می‌کند که منجر به پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوز در طیفی از بیماری‌ها مانند سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، بیماری‌های قلبی عروقی و اختلالات نورودژنراتیو می‌شود (۹، ۱۰). همچنین، مشخص‌شده است که AMPK می‌تواند از طریق تحریک مسیرهای مختلف پایین‌دست ازجمله فعال کردن Sirt1 پروتئین NF-kB را مهار کرده و پاسخ‌های التهابی را کاهش دهد (۱۱). در این راستا، گزارش‌شده است که تحریک AMPK منجر به کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو در سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان از طریق مهار مسیر NF-kB /Nlrp3 گردیده (۱۲). در مطالعه‌ای مشابه Zhang و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که متفورمین از طریق تنظیم مسیر AMPK/ Nlrp3 موجب کاهش پاسخ‌های التهابی در مدل آزمایشگاهی آسیب ایسکمی-ری پرفیوژن میوکارد می‌گردد (۱۳). علاوه بر این، گزارش‌هایی که اخیراً به‌دست‌آمده حاکی از آن است که متفورمین با فعال کردن پروتئین AMPK موجب تحریک مکانیسم اتوفاژی و برداشت پروتئین‌ها و ارگانل های ناکارآمد سلولی شده که به نوبه خود موجب سرکوب اینفلامازوم Nlrp3 و کاهش آسیب‌های ناشی از آن در مدل ایسکمی میوکاردی می‌شود (۱۴). همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً انجام‌گرفته، متفورمین با سرکوب اینفلامازوم Nlrp3 موجب کاهش پاسخ‌های التهابی در مدل حیوانی پره کلامپسی شده است (۱۵). سندگل و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند، تیمار موش‌ها با متفورمین سبب افزایش پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش الیگودندروژنزیس درون‌زاد، کاهش میکروگلیوزیس و افزایش میزان ریمیلیناسیون در جسم پینه ای موش‌های مدل کوپریزونی می‌شود (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که متفورمین موجب تأخیر در شروع علائم، کاهش شدت پیشرفت بیماری، کاهش سایتوکاین های پیش التهابی و کاهش مهاجرت سلول‌های التهابی به CNS در مدل EAE می‌گردد (۱۷). هم‌راستا با این گزارش‌ها، در مطالعه‌ای که اخیراً انجام‌گرفته مشاهده‌شده است که تجویز متفورمین در مدل اتوایمیون MS منجر به کاهش در میکروگلیوزیس واکنشی، دمیلیناسیون نخاعی و بهبود نسبی علائم بیماری می‌گردد (۱۸). در کنار مطالب فوق، امروزه مشخص شده است که سیستم میکروبی روده با تعدیل سیستم ایمنی اثرات امیدوارکننده‌ای را در کنترل بیماری‌های التهابی دارد. در این زمینه سامانی و همکاران (۲۰۲۲) نشان داده‌اند که تجویز پروبیوتیک هایی مانند Enterococcus durans و لاکتوباسیل ها موجب کاهش اینفیلتراسیون سلول‌های ایمنی به بافت CNS حیوانات مبتلابه EAE می‌شوند (۱۹).

شواهد به‌دست‌آمده از مطالعات in vitro و in vivo حاکی از آن است که متفورمین اثرات محافظتی فراوانی از خود نشان می‌دهد و مصرف آن همراه با کاهش سیتوکاین های التهابی در بدن است. بااین‌حال، مکانیسم‌های مولکولی که متفورمین اثرات ضدالتهابی خود را در مغز اعمال می‌کند تا حدود زیادی ناشناخته مانده است؛ بنابراین، واکاوی تأثیر متفورمین بر تشکیل اینفلامازوم Nlrp3، به‌عنوان یک مکانیسم درگیر در التهاب سیستم عصبی، در مدل‌های حیوانی MS می‌تواند منجر به شناسایی استراتژی‌های درمانی بالقوه برای بهبود علائم این بیماری گردد. لذا، در این مطالعه ما بر آن شدیم تا برای اولین بار تأثیر متفورمین را بر فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در مدل حیوانی دمیلیناسیون القایی با کوپریزون (Cuprizone) موردبررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

در این مطالعه تجربی از ۵۰ سر موش نر۸ هفته‌ای نژاد C57BL/6 با جنسیت نر استفاده شد. وزن تقریبی موش‌ها

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

۲۰-۲۵ گرم بود که از انستیتو پاستور خریداری و در حیوانخانه گروه آناتومی دانشکده پزشکی تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۱ نگه‌داری شدند و غذا و آب در اختیارشان قرار گرفت. حیوانات به‌طور تصادفی در گروه‌های زیر (۱۰ موش در هر گروه) توزیع شدند: (۱) گروه کنترل (Ctrl) که با غذای معمولی تغذیه‌شده و روزانه ۱۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی (intraperitoneal) دریافت کردند. (۲) گروه کوپریزون (CPZ) (Sigma-USA) که مخلوطی از رژیم غذایی آسیاب شده حاوی ۰.۲٪ کوپریزون را به همراه تزریق داخل صفاقی نرمال سالین به مدت ۳ یا ۵ هفته دریافت کردند (۳) گروه درمان (CPZ+MET) که مخلوطی از رژیم غذایی آسیاب شده حاوی ۰.۲٪ کوپریزون را به همراه تزریق روزانه متفورمین (100 mg/kg) (Sigma) تا پایان هفته‌های ۳ یا ۵ دریافت کردند. دوز مؤثر متفورمین بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد (۲۰).

آماده‌سازی بافت

در پایان هفته‌های سوم و پنجم، موش‌ها با تزریق کتامین (80 mg/kg) و زایلازین (8 mg/kg) به‌صورت عمقی بی‌هوش شده، سپس پرفیوژن با استفاده از محلول PBS (phosphate-buffered saline) انجام گرفت. در ادامه، فرآیند ثبوت بافتی با تزریق سامانمند محلول پارافرمالدهید (4%) صورت پذیرفت. در مرحله بعد جمجمه حیوانات بازشده و مغز درون آن‌ها خارج و به مدت ۲۴ ساعت در محلول فرمالین 10% قرار گرفت. بعد از فرآیندهای آبگیری و شفاف‌سازی، نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری شده و سپس مقاطع سریال با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و روی لام سیلانه قرار گرفتند. برای ارزیابی بیان ژن، بعد از پرفیوژن با PBS، جسم پینه ای مغز موش‌ها به‌طور کامل جداسازی شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ایمونوهیستوشیمی

به‌منظور ارزیابی سطح پروتئین‌های Nlrp3 و IL18 در جسم پینه ای از فن ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید. مقاطع مغزی آماده بعد از طی مراحلی پارافین زدایی و هیدراته شدن، به مدت ۱۵ دقیقه در بافر سیترات (10 mM, pH 6.0) حرارت داده شدند تا نواحی اپی توپ آنتی‌ژن‌ها بازیابی شوند. پس‌ازآن بلاک کننده پراکسیداز آندوژن (0.3% H_2O_2/PBS) را به برش‌های بافتی افزوده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی نمونه‌ها به مدت یک ساعت با آلبومین سرم گاوی (FBS %0.1, sigma USA) در 0/1 ٪ Triton X-100/PBS تیمار گردیدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای 4^0C با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه پروتئین‌های Nlrp3 (1:200 Abcam, UK) و IL18 (1:200 Abcam, UK) انکوبه شدند. روز بعد مقاطع شسته شده و به مدت یک ساعت در معرض آنتی‌بادی‌های ثانویه کونژوگه با آنزیم پراکسیداز HRP (horseradish peroxidase) قرار گرفتند. درنهایت روی بافت‌ها محلول سوبسترای DAB (Diaminobenzidine) اضافه کرده و هسته سلول‌ها با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. درمجموع چهار اسلاید متوالی از ناحیه مرکزی جسم پینه ای به فاصله ۱۵۰ میکرون از هم برای هر موش موردبررسی قرار گرفت (۴ موش در هر گروه). نتایج ایمونوهیستوشیمی با استفاده از نرم‌افزار Image j کمی سازی شد و به‌صورت میانگین شدت رنگ (mean staining intensity) گزارش گردید (۲۱).

بررسی بیان ژن‌ها

ابتدا RNA کل طبق دستورالعمل کیت GeneAll hybrid-R از جسم پینه ای جداسازی گردید. سپس خلوص و غلظت RNA های جمع‌آوری‌شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت RNA نمونه‌های مختلف در محدوده 350-700 ng/μl به دست آمد. برای تهیه cDND

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

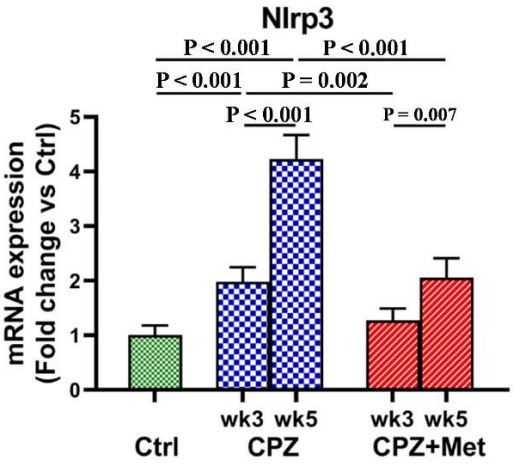
[DOI: 10.22034/30.5.33]

(1000 ng) مقدار 1000 ng از RNA استخراج‌شده برداشتیم. RNA ها با استفاده از کیت رونویسی معکوس RP1300 ExcelRT™ (SMOBIO, Taiwan) به cDNA تبدیل شدند. واکنش Real-Time PCR در حجم 20 µl و بر اساس ترکیب پیشنهادی کیت 5x HOT FIREPOL EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) در دستگاه StepOnePlus™ انجام گرفت. نمونه‌ها مطابق پروفایل دمایی initial activation (95 ℃/15 min, 1 cycle) denaturation (95 ℃/20 second)، annealing (60 ℃/20 second) و elongation (72 ℃/20 second) با ۴۰ تکرار در دستگاه Step One ساخت کمپانی ABI قرار داده شدند. اندازه‌گیری سیگنال‌های فلورسانس در دمای ۷۲ درجه انجام شد. به‌منظور اطمینان از صحت و اختصاصی بودن واکنش منحنی ذوب در محدوده دمایی ۹۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد.

پس از نرمال‌سازی ژن‌های هدف، میزان mRNA نسبت به سطح بیان β-اکتین به‌عنوان ژن مرجع داخلی مقایسه شد و نتایج به‌صورت $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش گردید (۲۲).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 آنالیز و نمودارها با نرم‌افزار Graph Pad Prism (ورژن ۸) رسم شدند. بعد از ارزیابی توزیع نرمالیتی داده‌ها به‌وسیله آزمون Shapiro-Wilk، برای مقایسه مابین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Turkey's posthoc test استفاده شد. یافته‌ها به‌صورت mean values ± Standard Deviation (M ± SD) بیان شدند و P value ≤ 0.05 به‌عنوان معنی‌دار بودن اختلاف از نظر آماری در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری کمی شدت دانسیته رنگ DAB از نرم‌افزار Image j استفاده گردید.



نمودار ۱: آنالیز بیان ژن Nlrp3 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف به‌وسیله آزمون Real-Time PCR. کنترل (Ctrl)، کوپریزون ۳ هفته CPZ(3wks)، کوپریزون ۵ هفته CPZ(5wks)، کوپریزون و متفورمین ۳ هفته CPZ+Met(3wks)، کوپریزون و متفورمین ۵ هفته CPZ+Met(5wks)

نتایج

تأثیر متفورمین بر فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در جسم پینه ای به‌وسیله آزمون‌های qRT-PCR و ایمونوهیستوشیمی مطالعات نشان داده‌اند فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در مدل کوپریزونی MS در هفته سوم از آغاز تیمار موش‌ها با کوپریزون شروع‌شده و تا هفته پنجم افزایش می‌یابد. اوج‌گیری فعالیت Nlrp3 با افزایش میکروگلیوزیس، آستروگلیوزیس، مرگ الیگودندروسیت ها و دمیلیناسیون

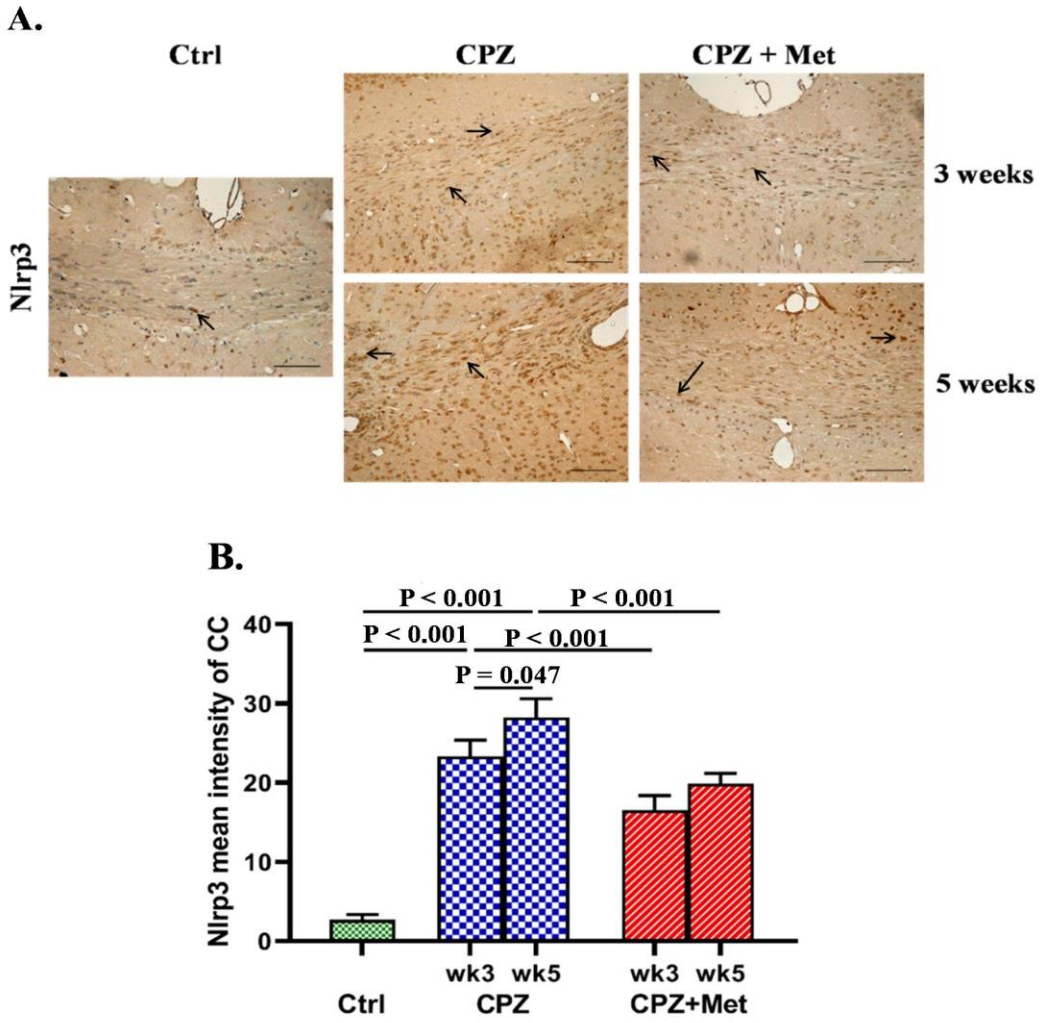
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

مطابقت دارد. در این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر متفورمین بر فعالیت اینفلامازوم Nlrp3، جزء حسگر (Nlrp3) اینفلامازوم در سطوح ژن و پروتئین و نیز IL18، یکی از محصولات نهایی اینفلامازوم، در سطح پروتئین در ناحیه جسم پینه ای حیوانات موردبررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از فن Real-Time PCR (نمودار ۱) نشان می‌دهد که میزان بیان ژن Nlrp3 در گروه‌های کوپریزونی (CPZ; 3wks, 5wks) به‌صورت معنی‌دار ($p<0.001$) نسبت به گروه کنترل افزایش پیداکرده است. این افزایش بیان در گروه (CPZ, 5wks) نسبت به گروه (CPZ, 3wks) به‌طور فراوانی ($p<0.001$) بیشتر بود. تیمار با متفورمین به‌صورت معنی‌دار ($p<0.01$, $p<0.001$) بیان Nlrp3 را در گروه‌های درمان CPZ+Met نسبت به گروه‌های CPZ کاهش داد. همچنین به‌منظور ارزیابی تکمیلی تأثیر متفورمین بر فعالیت اینفلامازوم در جسم پینه ای، از آزمون IHC برای بررسی سطح پروتئین‌ها Nlrp3 استفاده گردید. واکنش مثبت آنتی‌بادی علیه پروتئین Nlrp3 با رنگ قهوه‌ای DAB در تصویرA-۱ قابل‌تشخیص است. رنگ آبی نشان‌دهنده هسته رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین است (تصویرA-۱). آنالیز کمی تصاویر IHC گویای آن است که سطح پروتئین Nlrp3 در موش‌هایی که فقط تحت رژیم کوپریزونی قرارگرفته بودند (CPZ; 3wks, 5wks) (۲.۳ ± ۲۸.۲۴ ; ۲ ± ۲۳.۳۳) به‌صورت معنی‌دار ($p<0.001$) نسبت به گروه کنترل (۰.۶۴ ± ۲.۷) افزایش پیداکرده است (تصویرB-۱). از سوی دیگر، تیمار هم‌زمان با متفورمین به‌صورت معنی‌دار($p<0.001$) میزان پروتئین Nlrp3 را در گروه‌های درمان (CPZ+Met; 3wks, 5wks)(۱.۲۹ ± ۱.۸۲;۱۹.۸۷ ± ۱۶.۵۶) نسبت به گروه‌های کوپریزونی کاهش داده است (تصویرB-۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]



تصویر1: (A) بررسی سطح پروتئین Nlrp3 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف با فن ایمونوهیستوشیمی. کنترل (Ctrl)، کوپریزون ۳ هفته (CPZ(3wks، کوپریزون ۵ هفته (CPZ(5wks، کوپریزون و متفورمین ۳ هفته (CPZ+Met(3wks، کوپریزون و متفورمین ۵ هفته (CPZ+Met(5wks. پیکان‌ها نشانگر سلول‌های Nlrp3+ می‌باشند. بزرگنمایی ۲۰X، Scale bars: 100µm. (B) بررسی کمی سطح پروتئین Nlrp3 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف با فن ایمونوهیستوشیمی.

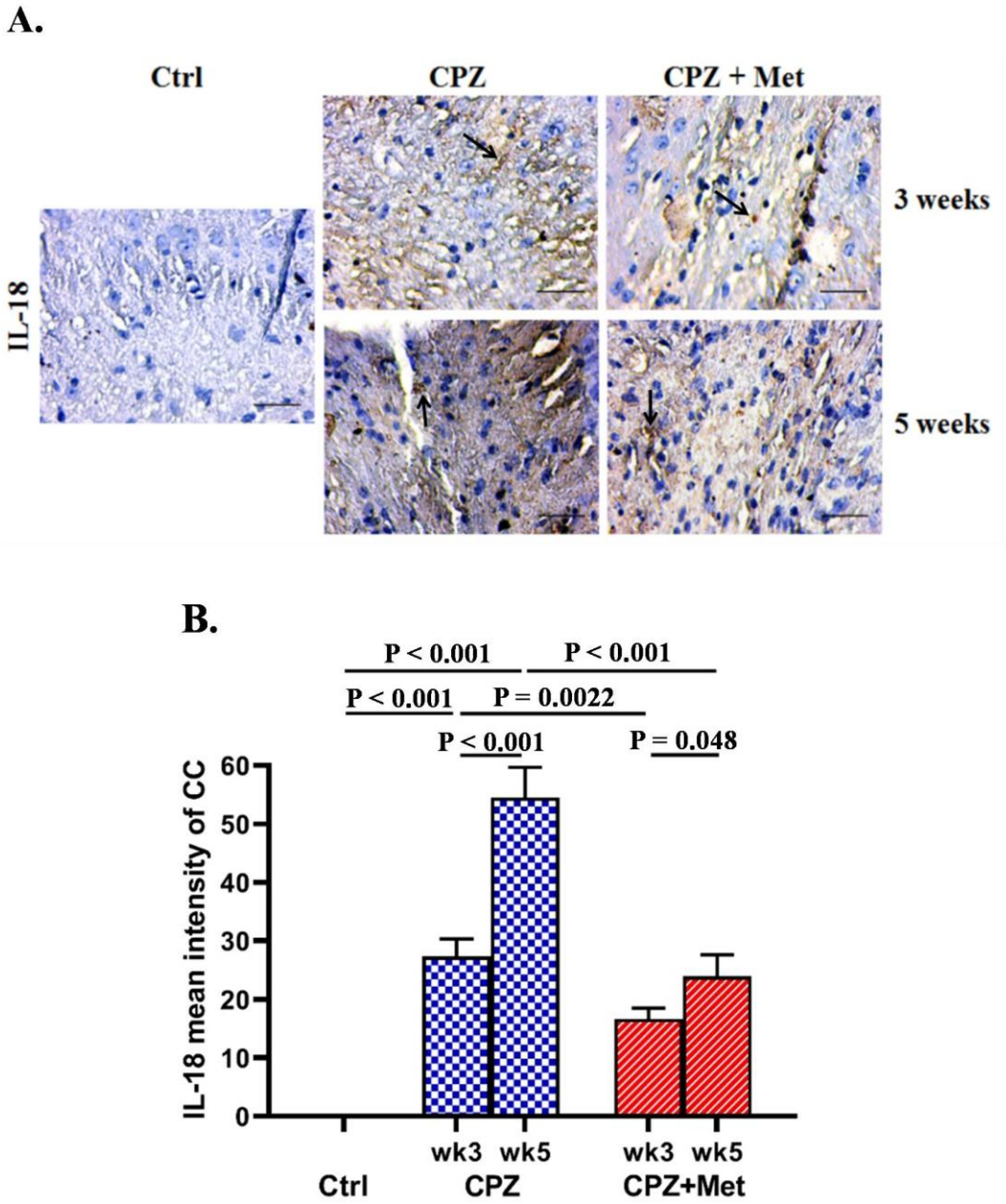
درنتیجه میان کنش بیوشیمیایی مابین پروتئین‌های Nlrp3، ASC و Procaspase-1، آنزیم Procaspase-1 غیرفعال به پروتئاز فعال caspase-1 تبدیل می‌شود و در ادامه سایتوکاین های پیش التهابی Pro-IL1B و Pro-IL18 را شکسته و به حالت فعال و ترشحی IL1B و IL18 درمی‌آورد. در این مطالعه برای ارزیابی بیشتر فعالیت اینفلامازوم، یکی از محصولات نهایی آن یعنی IL18 نیز در سطح پروتئین سنجیده شد. همان‌طور که در تصویرA-۲ قابل‌مشاهده است، نواحی IL18 مثبت با رنگ قهوه‌ای DAB قابل‌تشخیص هستند، رنگ آبی نشان‌دهنده هسته است که توسط رنگ هماتوکسیلین مشخص‌شده است.

آنالیز کمی تصاویر ایمونوهیستوشیمی حاکی از آن است که میزان پروتئین IL18 در گروه‌های کوپریزونی (CPZ; 3wks, 5wks) (۵۴.۵ ± ۵.۱۹; ۲۷.۳۳ ± ۳) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار($p<0.001$) پیداکرده است (تصویرB-۲). سطح پروتئین IL18 در هفته پنجم نسبت به هفته سوم به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای ($p<0.001$) بیشتر بود. تیمار هم زمان موش‌ها با متفورمین سبب کاهش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

معنی‌دار($p<0.01$, $p<0.001$) سطح IL18 در گروه‌های درمان (CPZ+Met; 3wks, 5wks) (۳.۶۹ ± ۲۳.۹۳; ۱.۸۸ ± ۱۶.۶۳) نسبت به گروه‌هایی که فقط تحت رژیم کوپریزونی قرارگرفته بودند گردید (تصویرB-۲).



تصویر ۲: (A) بررسی سطح پروتئین IL18 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف با فن ایمونوهیستوشیمی. کنترل (Ctrl)، کوپریزون ۳ هفته (CPZ(3wks، کوپریزون ۵ هفته (CPZ(5wks، کوپریزون و متفورمین ۳ هفته (CPZ+Met(3wks، کوپریزون و متفورمین ۵ هفته (CPZ+Met(5wks. پیکان‌ها نشانگر نواحی +IL18 می‌باشند. بزرگنمایی ٤٠X، Scale bars: 50µ. (B) بررسی کمی سطح پروتئین IL18 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف با فن ایمونوهیستوشیمی.

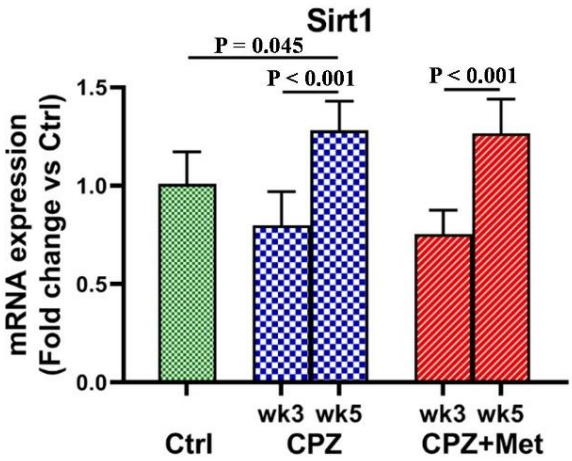
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمر	طول پرایمر
Actb	Forward: CAGCCTTCCTTCTTGGGTATGG	22
	Reverse: AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG	23
Sirt1	Forward: GTCTTGTCCTCTAGTTCCTGTG	22
	Reverse: GCCTCTCCGTATCATCTTCC	20
Nlrp3	Forward: CCAGACCTCCAAGACCACTAC	21
	Reverse: GAGAAGAGATGCTCCTCAATGC	22

نتایج حاصل از آزمون RT-PCR نشان می‌دهد که بیان ژن Sirt1 فقط در موش‌هایی که به مدت ۵ هفته تحت رژیم غذایی حاوی کوپریزون بودند، به‌صورت معنی‌دار ($p<0.05$) نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد. همچنین اختلاف معنی‌داری در بیان ژن Sirt1 بین گروه‌های دریافت‌کننده کوپریزون (CPZ; 3wks, 5wks) وجود دارد. بااین‌وجود متفورمین تراپی تأثیری در بیان ژن Sirt1 ایجاد نکرد (نمودار ۲).



نمودار ۲: آنالیز بیان ژن Sirt1 در جسم پینه ای گروه‌های مختلف به‌وسیله آزمون Real-Time PCR. کنترل (Ctrl)، کوپریزون ۳ هفته (CPZ(3wks، کوپریزون ۵ هفته (CPZ(5wks، کوپریزون و متفورمین ۳ هفته (CPZ+Met(3wks، کوپریزون و متفورمین ۵ هفته (CPZ+Met(5wks.

بحث

ما در این مطالعه، برای اولین بار، نشان دادیم که تیمار با متفورمین موجب مهار اینفلامازوم Nlrp3 در مدل کوپریزونی بیماری MS گردید.

MS یک بیماری خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی است که با مهاجرت لنفوسیت‌های حساس به آنتی‌ژن‌های میلینی به بافت CNS، آسیب سد خونی- مغزی، گلیوزیس واکنشی، تخریب میلین و درنهایت ناتوانی حسی - حرکتی همراه است (۲۳). کوپریزون با اخلال در عملکرد میتوکندری و افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش بازدهی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب القاء آپوپتوز در الیگودندروسیت ها می‌شود. این مدل پاتوفیزیولوژی تیپ پیشرونده اولیه و به میزان کمتری نوع عودکننده - پیشرونده بیماری MS را تقلید می‌کند. اگرچه این ماده نواحی مختلفی از مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بااین‌حال، دژنراسیون در جسم پینه ای شاخص کلیدی نوروآناتومیکال در مدل کوپریزونی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

است. در حقیقت، جسم پینه ای شایع‌ترین ناحیه برای مطالعه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی و نیز رفتار سلول‌های پشتیبان به‌ویژه میکروگلیاها در طی روند دمیلیناسیون و ریمیلیناسیون با کوپریزون است (۲۴)؛ بنابراین، این پژوهش بر پاسخ اینفلامازوم Nlrp3 به تیمار با متفورمین در ناحیه جسم پینه ای متمرکزشده است.

در مطالعه پیشین نشان دادیم که ۵ هفته تیمار موش‌های C57/BL6 با رژیم حاوی کوپریزون موجب دمیلیناسیون شدید در جسم پینه ای و متعاقباً کاهش توانایی حرکتی – تعادلی حیوانات گردید. باوجوداین، تجویز هم زمان متفورمین توانست روند دمیلیناسیون را کاهش دهد، اما تغییر معنی‌داری در نتایج آزمون رفتاری روتارود بین گروه‌های مدل و درمان مشاهده نگردید. همچنین متفورمین تراپی باعث کاهش میزان آستروگلیوزیس، میکروگلیوزیس و نیز کاهش تعداد میکروگیاهای پیش التهابی در جسم پینه ای از طریق تنظیم مسیر AMPK-NF-ƙB گردید (۲۱).

در حال حاضر، گزارش‌های متعددی در مورد تأثیر متفورمین در مدل‌های حیوانی بیماری MS چاپ‌شده است، اما هنوز اطلاعات کمی در مورد کارکرد متفورمین در بیماران MS وجود دارد. در یک مطالعه کار آزمایی بالینی که بر روی بیماران مبتلابه تیپ عودکننده- پیش‌رونده صورت گرفت نشان داد که تجویز متفورمین (۱۵۰۰-۸۵۰ میلی‌گرم، روزانه) به مدت دو سال به‌طور قابل ملاحضه ای موجب کاهش تعداد مراکزدمیلیناسیون، کاهش دفعات حملات حسی- حرکتی، کاهش لنفوسیت‌های حساس به آنتی‌ژن‌های مغزی و افزایش سلول‌های T تنظیمی نسبت به بیمارانی که متفورمین دریافت نکرده بودند، گردید (۲۵).

همسو بامطالعه پیشین، در مطالعه حاضر نیز فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در هفته سوم از شروع تیمار با کوپریزون آغاز گردید و تا هفته پنجم افزایش یافت و فعالیت آن با نرخ میکروگلیوزیس، آستروگلیوزیس، مرگ الیگودندروسیت ها و دمیلیناسیون در جسم پینه ای مطابقت داشت (۲۱). این یافته‌ها در تائید گزارش Yu و همکاران است که ارتباط بین فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 و تشدید دمیلیناسیون را در مدل کوپریزونی نشان دادند (۲۶). در این پژوهش دریافتیم که تیمار همزمان با متفورمین موجب کاهش فعالیت اینفلامازوم Nlrp3 در جسم پینه ای گردید. این مشاهدات هم‌راستا با مطالعه Ha و همکاران است که نشان دادند متفورمین موجب مهار اینفلامازوم Nlrp3 و کاهش سایتوکاین های پیش التهابی در لاین سلولی BV-2 (Microglia) القاء شده با لیپوپلی ساکارید می‌شود (۲۷). علاوه بر این، نتایج مطالعات دیگر حاکی از آن است که متفورمین با تحریک مکانیسم‌های اتوفاژی از طریق مهار پروتئین mTOR موجب مهار اینفلامازوم NLRP۳ و کاهش آسیب‌های ناشی از آن در مدل کاردیومیوپاتی دیابتیک می‌شود (۲۸).

در حال حاضر درمان قطعی برای بیماران مبتلابه MS وجود ندارد و داروهایی که برای این منظور تولیدشده‌اند عمدتاً موجب مدیریت حملات با هدف‌گیری مکانیسم‌های مولکولی درگیر در ایجاد و پیشرفت بیماری می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند که فعال‌سازی اینفلامازوم Nlrp3 یکی از مکانیسم‌های کلیدی در پیشرفت بیماری MS است (۲۹). مشخص‌شده، برخی داروهایی که امروزه برای بیماران MS استفاده می‌شوند، می‌توانند در برابر فعال شدن اینفلامازوم مؤثر باشند. به‌عنوان‌مثال Interferon Beta-1a، داروی خط اول در درمان MS، فعال‌سازی التهاب بواسطه Nlrp3 را مهار و EAE را بهبود می بخشد (۳۰). داروی دیگری که در سرکوب فعال‌سازی اینفلامازوم Nlrp3 در MS مؤثر است، پردنیزون است. درمان با پردنیزون علائم بیماری را بهبود بخشیده و از نرخ دمیلیناسیون و گلیوزیس می‌کاهد. علاوه بر این، پردنیزون باعث کاهش فعال شدن اینفلامازوم Nlrp3 و ترشح سیتوکین های پیش التهابی متعاقب آن می‌شود و از این ایده پشتیبانی می‌کند که سرکوب اینفلامازوم Nlrp3 می‌تواند به‌عنوان یک واسطه اصلی برای عملکرد ضدالتهابی پردنیزون باشد (۲۶). هم سو با این یافته‌ها، اخیراً گزارش‌شده که یک مولکول مهاری

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

مانند MCC950، باعث کاهش آزادسازی IL17 و IFNG از لنفوسیت‌های T شده و شدت بیماری را در مدل اتوایمیون بیماری MS کاهش می‌دهد (۳۱).

پروتئین حفاظت‌شده Sirt1 (Silent Information Regulator 1) یک هیستون داستیلاز وابسته به NAD^+ است که در تنظیم متابولیسم انرژی و پیری مشارکت می‌کند. Sirt1 با داستیله کردن تعدادی از فاکتورهای رونویسی مانند Nrf-2 و NF-ƙB می‌تواند منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در کبد، پانکراس و مغز شود (۳۲). Cho و همکاران گزارش کردند بیان Sirt1 در روند پیری میکروگلیاها کاهش می‌یابد، ازاین‌رو Sirt1 احتمالاً نقش عمده‌ای در نقص حافظه به‌واسطه پیری دارد (۳۳). همچنین مشخص‌شده است که Sirt1 از طریق مهار تولید ROS و سرکوب فاکتور رونویسی NF-ƙB منجر به کاهش آزادسازی فاکتورهای پیش التهابی به‌واسطه تنظیم منفی اینفلامازوم NLRP3 می‌شود که به‌نوبه خود می‌تواند باعث نزول نرخ اینفیلتراسیون سلول‌های ایمنی و متعاقباً آسیب بافتی گردد (۳۴). ما در این مطالعه دریافتیم که تیمار با کوپریزون به مدت ۵ هفته منجر به افزایش بیان ژن Sirt1 در جسم پینه‌ای حیوانات گردید. یافته ما در تضاد با گزارش Elbaz و همکاران است که بیان Sirt1 در مدل حاد دمیلیناسیون با کوپریزون کاهش می‌یابد (۳۵). این ناهمگونی در یافته‌ها ممکن است به دلیل اختلاف در پاسخ بافت CNS به طول دوره و میزان دوز دریافتی کوپریزن باشد، به صورتی که در مطالعه Elbez و همکاران ابتدا کوپریزون با دوز بالای 0.7% برای یک دوره یک‌هفته‌ای تجویز شد و به دنبال آن سه هفته تیمار با کوپریزون 0.2% ادامه یافت، درحالی‌که در مطالعه ما حیوانات به مدت ۵ هفته تحت تیمار با کوپریزون 0.2% درصد بودند. ضمناً، ما متوجه شدیم متفورمین هیچ‌گونه تأثیری در کاهش یا افزایش بیان Sirt1 نداشت. هم سو با یافته ما، بیان Sirt1 در مدل‌های حیوانی آلزایمر و EAE افزایش می‌یابد (۳۶, ۳۷) همچنین در مطالعه‌ای دیگر، Nimmagadda و همکاران نشان دادند که افزایش بیان پروتئین Sirt1 منجر به سرکوب EAE و کاهش مرگ نورونی احتمالاً از طریق مهار لنفوسیت‌های T و B می‌شود. تصور بر این است که افزایش بیان Sirt1 درواقع یک واکنش سازگاری محافظت عصبی است، زیرا افزایش بیان Sirt1 می‌تواند نورون ها را در برابر آسیب‌های نورودژنراتیو و نوروتوکسیک، محافظت کند (۳۸). البته لازم به ذکر است، ازآنجایی‌که متفورمین از طریق تنظیم AMPK منجر به فعال شدن پروتئین Sirt1 می‌گردد (۳۹)، لذا برای بررسی تکمیلی بهتر است فعالیت پروتئین آن نیز توسط آزمون‌های اختصاصی سنجیده شود.

با وجود مطالعات صورت گرفته، هنوز نیاز به طراحی استراتژی‌های درمانی مؤثرتری برای مقابله با MS هست. با توجه به اهمیت اینفلامازوم Nlrp3 در پیشرفت بیماری MS و مدل‌های تجربی این بیماری، به نظر می‌رسد که توسعه استراتژی‌های درمانی جدید بر پایه تنظیم مسیر التهابی Nlrp3 می‌تواند به مدیریت و درمان این بیماری در جهت کاهش التهاب، دمیلیناسیون و مرگ نورونی کمک‌کننده باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه مشخص نمود که تجویز همزمان متفورمین، موجب سرکوب اینفلامازوم Nlrp3 در مدل تجربی دمیلیناسیون القایی با کوپریزون گردید. درمجموع، یافته‌های ما نشان می‌دهد که متفورمین دارای اثرات امیدبخش در تعدیل پاسخ‌های التهابی مدل دمیلیناسیون القاء شده با کوپریزون است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند. این مطالعه در سال ۱۳۹۸ تصویب و طبق موازین اخلاقی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران در گروه آناتومی دانشکده پزشکی تهران انجام

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

گرفت (IR.TUMS.MEDICINE.REC.1398.224). انتشار این مقاله ندارند.

هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافعی برای

منابع

1. Bjelobaba I, Savic D, Lavrnja I. Multiple sclerosis and neuroinflammation: the overview of current and prospective therapies. Curr Pharm Des. 2017;23(5):693-730. Doi: 10.2174%2F1381612822666161214153108
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol. 2015;15(9):545-58. Doi:10.1038%2Fnri3871
3. Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol. 2019;19(8):477-89. Doi:10.1038%2Fs41577-019-0165-0
4. Olcum M, Tastan B, Kiser C, Genc S, Genc K. Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis. Adv Protein Chem Struct Biol. 2020;119:247-308. Doi: 10.1186%2Fs12974-020-01944-9
5. Malhotra S, Hurtado-Navarro L, Pappolla A, Villar LM, Río J, Montalban X, et al. Increased NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis in patients with multiple sclerosis with fingolimod treatment failure. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2023;10(3):e200100. Doi: 10.1212%2Fnxi.0000000000200100
6. Barclay W, Shinohara ML. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Brain Pathology. 2017 Mar;27(2):213-9. Doi: 10.1111%2Fbpa.12477
7. Li C, Lin H, He H, Ma M, Jiang W, Zhou R. Inhibition of the NLRP3 inflammasome activation by manoalide ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. Front Cell Dev Biol. 2022;10:822236. Doi:10.3389%2Ffcell.2022.822236
8. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2019;15(10):569-89. Doi: 10.1038%2Fs41574-019-0242-2
9. Top WM, Kooy A, Stehouwer CD. Metformin: a narrative review of its potential benefits for cardiovascular disease, cancer and dementia. Pharmaceuticals. 2022;15(3):312. Doi: 10.3390%2Fph15030312
10. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szydłowska A, Skupień A, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. Metformin–A future therapy for neurodegenerative diseases: Theme: Drug discovery, development and delivery in Alzheimer's disease Guest Editor: Davide Brambilla. Pharm Res. 2017;34:2614-27. Doi:10.1007%2Fs11095-017-2199-y
11. Jeon S-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. Exp Mol Med. 2016;48(7):e245-e. Doi:10.1038%2Femm.2016.81
12. Hu R, Wang M-q, Ni S-h, Wang M, Liu L-y, You H-y, et al. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs. Eur J Pharmacol. 2020;867:172797. Doi: 10.1016%2Fj.ejphar.2019.172797
13. Zhang J, Huang L, Shi X, Yang L, Hua F, Ma J, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway. Aging (Albany NY). 2020;12(23):24270.. Doi:10.18632%2Faging.202143
14. Fei Q, Ma H, Zou J, Wang W, Zhu L, Deng H, et al. Metformin protects against ischaemic myocardial injury by alleviating autophagy-ROS-NLRP3-mediated inflammatory

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

response in macrophages. J Mol Cell Cardiol. 2020;145:1-13. Doi:10.1016%2Fj.yjmcc.2020.05.016
15. Jia R, Ma H, Hao H, Wang F, Yang H. Metformin inhibits activation of NLRP3 inflammasome and inflammatory response in preeclamptic rats. Gene. 2024;919:148509. Doi:10.1016%2Fj.gene.2024.148509
16. Sanadgol N, Barati M, Houshmand F, Hassani S, Clarner T, Shahlaei M, et al. Metformin accelerates myelin recovery and ameliorates behavioral deficits in the animal model of multiple sclerosis via adjustment of AMPK/Nrf2/mTOR signaling and maintenance of endogenous oligodendrogenesis during brain self-repairing period. Pharmacol Rep. 2020;72(3):641-58. Doi:10.1007%2Fs43440-019-00019-8
17. Sun Y, Tian T, Gao J, Liu X, Hou H, Cao R, et al. Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. J Neuroimmunol. 2016;292:58-67. Doi:10.1016%2Fj.jneuroim.2016.01.014
18. Gilbert EA, Livingston J, Flores EG, Khan M, Kandavel H, Morshead CM. Metformin treatment reduces inflammation, dysmyelination and disease severity in a mouse model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Research. 2024 Jan 1;1822:148648.
19. Samani SA, Moloudi MR, Ramezanzadeh R, Abdi M, Nikkhoo B, Izadpanah E, et al. Oral Administration of Probiotic Enterococcus durans to Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. Basic Clin Neurosci. 2022;13(1):35-46. Doi:10.32598%2Fbcn.2021.1955.1
20. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. J Immunol. 2009 Jun 15;182(12):8005-14. Doi:10.4049%2Fjimmunol.0803563
21. Abdi M, Pasbakhsh P, Shabani M, Nekoonam S, Sadeghi A, Fathi F, et al. Metformin therapy attenuates pro-inflammatory microglia by inhibiting NF-κB in cuprizone demyelinating mouse model of multiple sclerosis. Neurotox Res. 2021;39:1732-46. Doi:10.1007%2Fs12640-021-00417-y
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8. Doi:10.1006%2Fmeth.2001.1262
23. Tejera-Alhambra M, Sánchez-Ramón S. Immunopathology of multiple sclerosis. Translational Neuroimmunology, Volume 8: Elsevier; 2023. p. 11-26. Doi:10.1016%2Fb978-0-443-18578-6.00002-7
24. Zirngibl M, Assinck P, Sizov A, Caprariello AV, Plemel JR. Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. Mol Neurodegener. 2022;17(1):34. Doi:10.1186%2Fs13024-022-00538-8
25. Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis. JAMA Neurol. 2016;73(5):520-8. Doi:10.1001%2Fjamaneurol.2015.4807
26. Yu H, Wu M, Lu G, Cao T, Chen N, Zhang Y, et al. Prednisone alleviates demyelination through regulation of the NLRP3 inflammasome in a C57BL/6 mouse model of cuprizone-induced demyelination. Brain Res. 2018;1678:75-84. Doi: 10.1016%2Fj.brainres.2017.09.034

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]

27. Ha J-S, Yeom Y-S, Jang J-H, Kim Y-H, Im JI, Kim IS, et al. Anti-inflammatory effects of metformin on neuro-inflammation and NLRP3 Inflammasome activation in BV-2 microglial cells. Biomed Sci Lett. 2019;25(1):92-8. Doi:10.15616%2Fbsl.2019.25.1.92
28. Yang F, Qin Y, Wang Y, Meng S, Xian H, Che H, et al. Metformin inhibits the NLRP3 inflammasome via AMPK/mTOR-dependent effects in diabetic cardiomyopathy. Int J Biol Sci. 2019;15(5):1010. Doi:10.7150%2Fijbs.29680
29. Byun DJ, Lee J, Ko K, Hyun Y-M. NLRP3 exacerbates EAE severity through ROS-dependent NET formation in the mouse brain. Cell Commun Signal. 2024;22(1):96. Doi: 10.1186%2Fs12964-023-01447-z
30. Inoue M, Chen P-h, Siecinski S, Li Q-j, Liu C, Steinman L, et al. An interferon-β-resistant and NLRP3 inflammasome–independent subtype of EAE with neuronal damage. Nat Neurosci. 2016;19(12):1599-609. Doi:10.1038%2Fnn.4421
31. Hou B, Yin J, Liu S, Guo J, Zhang B, Zhang Z, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 alleviates neurological impairment in the brain of EAE mice. Mol Neurobiol. 2024;61(3):1318-30. Doi:10.1007%2Fs12035-023-03618-y
32. Singh V, Ubaid S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation. Inflammation. 2020;43:1589-98. Doi:10.1007%2Fs10753-020-01242-9
33. Cho S-H, Chen JA, Sayed F, Ward ME, Gao F, Nguyen TA, et al. SIRT1 deficiency in microglia contributes to cognitive decline in aging and neurodegeneration via epigenetic regulation of IL-1β. J Neurosci. 2015;35(2):807-18. Doi:10.1523%2Fjneurosci.2939-14.2015
34. Chen H, Deng J, Gao H, Song Y, Zhang Y, Sun J, et al. Involvement of the SIRT1-NLRP3 pathway in the inflammatory response. Cell Commun Signal. 2023;21(1):185. Doi: 10.1186%2Fs12964-023-01177-2
35. Elbaz EM, Senousy MA, El-Tanbouly DM, Sayed RH. Neuroprotective effect of linagliptin against cuprizone-induced demyelination and behavioural dysfunction in mice: a pivotal role of AMPK/SIRT1 and JAK2/STAT3/NF-κB signalling pathway modulation. Toxicol Appl Pharmacol. 2018;352:153-61. Doi:10.1016%2Fj.taap.2018.05.035
36. Zhang M, Tang Z. Therapeutic potential of natural molecules against Alzheimer's disease via SIRT1 modulation. Biomed Pharmacother. 2023;161:114474. Doi: 10.1016%2Fj.biopha.2023.114474
37. Giacometti J, Grubić-Kezele T. Olive leaf polyphenols attenuate the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and provide neuroprotection by reducing oxidative stress, regulating microglia and SIRT1, and preserving myelin integrity. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020(1):6125638. Doi:10.1155%2F2020%2F6125638
38. Nimmagadda VK, Bever CT, Vattikunta NR, Talat S, Ahmad V, Nagalla NK, et al. Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. J Immunol. 2013;190(9):4595-607. Doi:10.4049%2Fjimmunol.1202584
39. Rakshe PS, Dutta BJ, Chib S, Maurya N, Singh S. Unveiling the Interplay of AMPK/SIRT1/PGC-1α axis in Brain Health: Promising Targets Against Aging and NDDs. Ageing Res Rev. 2024:102255. Doi:10.1016%2Fj.arr.2024.102255

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.22034/30.5.33]