



Scan online to view this article

Effect of Silymarin on Blood Glucose and Hnf1a Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats

Rahman jafari hafshejani, Farshid gheibi hajivar, Sajad nikkhah*.

Department of Biology, Science Faculty, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Abstract

Aim and Background: Today, research has shown that medicinal plants have fewer side effects than industrial and chemical judges. On the other hand, studies indicate the important role of Hnf1a gene in diabetes, so the aim of this study was to investigate the effect of silymarin on blood sugar and expression of Hnf1a gene in male Wistar rats diabetic with streptozoto.

Material and methods: 42 male rats were randomly selected and divided into seven groups. Sixty diabetic rats with diabetic streptozotocin have been measured and their fasting blood glucose was measured. After the end of the period, the rats were anesthetized with the drug. A portion of the pancreatic tissue was isolated and used to evaluate the expression of Hnf1a gene using Real Time RT PCR..

Results: Evaluation of Hnf1alpha at a dose of 150 mg / kg in silymarin-receiving rats showed a significant decrease in Hnf1alpha gene expression and was introduced as an effective dose (P-Value <0.05) due to the use of silymarin in the country. It is not common, in future research, more importance can be given to the effects of silymarin and it can be considered as an effective drug.

Conclusion: Based on the results of this study, it can be concluded that silymarin reduces blood sugar in diabetes and, if confirmed in extensive studies, can be considered as a therapeutic target in diabetes.

Keywords: Hnf1a, Silymarin, Rat, Streptozotocin.

Corresponding author:

Department of Biology, Science Faculty, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
Email: nikkhah1993@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

تأثیر سیلی مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnfla* در رت های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

رحمان جعفری هفشجانی، فرشید غیبی حاجیور، سجاد نیک خواه *

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تحقیقات نشان داده است که گیاهان دارویی نسبت به داورهای صنعتی و شیمیایی عوارض جانبی کم تر دارند از سویی بررسی ها حاکی از نقش مهم ژن *Hnfla* در بیماری دیابت است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سیلی مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnfla* در رت های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است.

مواد و روش ها: ۴۲ سر رت نر به صورت تصادفی انتخاب شدند و به ۷ گروه شش تایی تقسیم شدند، رت های دیابتی با ماد استرپتوزوتوسین (دوز ۵۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن رت) دیابتی شدند و به سه گروه از آن ها دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی مارین داده شد و قند خون ناشتای آن ها سنجیده شد و پس از پایان دوره رت ها با داروی بی هوش و تشریح شدند مقداری از بافت پانکراس جدا سازی و برای بررسی بیان ژن *Hnfla* به روش Real Time RT-PCR استفاده شد.

یافته ها: بررسی *Hnfla* در دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در رت های دریافت کننده سیلی مارین کاهش چشم گیری در بیان ژن *Hnfla* مشاهده شد و به عنوان دوز مؤثر معرفی شد ($P\text{-Value} < 0/05$) و همچنین میزان قند خون به ۱۰۰ میلی گرم دسی لیتر رسید و باتوجه به این که مصرف سیلی مارین در کشور رایج نیست، می توان در تحقیقات آینده اهمیت بیشتری به اثرهای سیلی مارین داده شود و به عنوان یه داروی مؤثر در نظر گرفته شود.

نتیجه گیری: با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که سیلی مارین باعث کاهش قند خون در بیماران دیابت می شود و در صورت تأیید در مطالعه های گسترده می تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری دیابت مطرح باشد.

واژه های کلیدی: *Hnfla*، سیلی مارین، رت، استرپتوزوتوسین.

مقدمه

دیابت یکی از رایج ترین بیماری های متابولیک است که با هایپرگلیسمی مزمن و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین همراه است. از شایع ترین علائم آن عدم تحمل گلوکز یا ازدیاد قند خون است و به همین دلیل فرد به عوارض کوتاه مدت و بلند مدت دیابت دچار می شود (۱).

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران.

پست الکترونیکی: nikkhah1993@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۴

شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشم گیری داشته است و تخمین زده اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۲). به طور کلی دیابت به دو نوع دیابت نوع یک و دیابت نوع دو تقسیم می شود. در دیابت نوع یک تخریب سلول های بتا در پانکراس منجر به نقص در تولید انسولین می شود و در دیابت نوع دو تخریب گیرنده های انسولین در سلول های بافت ها از بین می روند و مقاومت پیش رونده بدن به انسولین وجود دارد و در نهایت ممکن است منجر به تخریب سلول های بتا پانکراس و هایپرگلیسمی و نقص کامل در تولید انسولین منجر شود (۳). دیابت نوع یک نوع دو، یک سبب شناسی ژنتیکی مشترک دارند. علت ایجا این بیماری مشخص نیست اما فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارند (۴، ۵).

HNF1A (C) Hepatic Nuclear Factor Homeobox) *HNF1A*(A) و *HNF1A*(B)، *HNF1A*(A) را می‌کند که این سه ایزوفرم در اثر پردازش و پلی‌آدنیلایسون متفاوت به وجود می‌آیند. *HNF1A* (A) دارای ۱۰ اگزون بوده اما *HNF1A*(C) و *HNF1A*(B) به ترتیب ۶ و ۷ اگزون دارند. تمام این ایزوفرم‌ها دارای فعالیت هستند اما فعالیت ایزوفرم‌های B و C در حدود ۵ برابر بیش‌تر از *HNF1A* است. به تازگی نشان داده شده است که سن شروع دیابت ممکن است تحت تأثیر موقعیت جهش‌های وابسته به ایزوفرم‌های *Hnf-1α* باشد. جهش‌های Missense که در اگزون ۸ تا ۱۰ قرار دارند و خاص ایزوفرم *HNF1A* است باعث می‌شود دیابت دیرتر شروع شود و مشخص شده است افرادی که جهش‌های Missense آن‌ها در اگزون ۷ یا در اگزون‌های ۸ تا ۱۰ قرار گرفته است نسبت به افرادی که دارای جهش در اگزون‌های ۱ تا ۶ است ۱۰ سال دیرتر تشخیص داده می‌شود (۱۴-۱۲).

استفاده از گیاهان دارویی از اولین درمان‌های دیابت بوده است. داورهای گیاهی نسبت به داورهای شیمیایی دارای سمیت کم‌تر و اثرهای جانبی کم‌تر هستند و اقبال عمومی برای مصرف آن‌ها بیش‌تر است (۱۵).

تاکنون بیش از ۲۱۰۰ گیاه دارویی در کاهش میزان قند خون و یا کاهش عوارض ناشی از آن شناخته شده است. از جمله این گیاهان می‌توان به خار مریم، خیار تلخ، شنبلیله، سیاه-گیله و هندوانه ابوجهل اشاره کرد. گیاه خار مریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) یک گیاه یک یا دو ساله از خانواده کاسنیان است که در درمان اختلال‌ها و بیماری‌های کبد استفاده می‌شود. این گیاه بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران به خصوص البرز مرکزی، خوزستان و آذربایجان رویش دارد. عصاره بذر گیاه خار مریم حاوی ترکیب‌های فلاونوئیدی به نام سیلی‌مارین است. فلاونوئیدها از ترکیب‌های بسیار مهم اکثر گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه‌ها هستند، فلاونوئیدها از قبیل کوئرستین موجب ترشح انسولین و مهارکننده قوی تجمع سوربیتول در بافت‌های بدن است. سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان گلوکوتائین سلولی و ثبات غشای سلولی در طب سنتی جهت بهبود اختلال‌های کبد تجویز می‌شود. تجویز این دارو برای افراد مبتلا به بیماری‌های کبدی موجب افزایش حساسیت سلولی به انسولین و در نتیجه کاهش میزان قند خون شده است. سیلی‌مارین خواص مختلفی از جمله: محافظت از کبد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطان و

باتوجه به افزایش دانش بشری در مورد تنوع بیماری دیابت و به دلیل این که این بیماری یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی، درمانی، اجتماعی و اقتصادی در جامعه بشری محسوب می‌شود، نیاز برای به دست آوردن ترکیب‌های مؤثر در درمان دیابت با عوارض جانبی کم‌تر، احساس می‌شود. بیماری دیابت ششمین علت مرگ و میر در ایالات متحده است. و حدود ۱۸ درصد موارد کل مرگ و میر بالای ۲۶ سالگی را تشکیل می‌دهد. بیماری‌های قلبی عروقی علت اصلی مرگ‌های مربوط به دیابت است و شیوع آن در مبتلایان به دیابت نسبت به جمعیت عمومی ۳ برابر بیش‌تر است. از طرفی دیگر خطر بروز سکته مغزی، نیز افزایش می‌یابد. شیوع بیماری دیابت در بزرگسالان و کودکان در قسمت‌های زیادی از دنیا به دلیل چاقی بیش از و شیوه زندگی بدون تحرک است (۸-۶).

فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول‌ها به سلول‌های بتا در پانکراس اثر می‌گذارند از جمله این فاکتورها عبارت‌اند از: *Pax4*, *Pax6*, *MafA*, *Pdx-1*, *Neuro-D1*, *Hnf-1α* و *Hnf-3β* هستند (۱۱-۹).

تحقیقات نشان داده است که *Hnf-1α* (Hepatocyte nuclear factor 1 alpha) در بافت‌های مختلف شامل روده، کبد، پانکراس و کلیه بیان می‌شود. شکل عملکردی پروتئین *Hnf-1α* همودایمر است و در ابتدا به عنوان فاکتوری که در رونویسی از ژن‌های مختلف کبد شامل آلبومین، بتا آلدوز، آلفا آنتی‌تریپسین، پیرووات و بتا فیبرینوژن نقش دارد تعریف شد. اما بعدها مشخص شد که این ژن محدود به کبد نیست. اکنون مشخص شده است که بیش‌تر از ۱۵۰ ژن توسط *Hnf-1α* تنظیم می‌شود که این ژن‌ها در کبد، کلیه، سلول‌های بتا پانکراس، روده و معده قرار گرفته‌اند. دسته بزرگی از ژن‌ها در پانکراس از قبیل انسولین، انتقال دهنده گلوکز ۲، ۳ هیدروکسیل ۳ متیل گلوکوتاریل کوآروکتاز، پیرووات کیناز و ۲ گزوغلوکوتارات دهیدروژناز تحت تأثیر نقص در *Hnf-1α* هستند. برخی مطالعات نشان داد که با وجود جهش در ژن *Hnf-1α* سطح mRNA ژن‌هایی مانند پیرووات کیناز و انتقال دهنده گلوکز ۲ در کبد، کلیه و روده تغییر نمی‌کنند. تحقیقات نشان داده است که اغلب ژن‌های هدف *Hnf-1α* در هیپاتوسیت‌ها به صورت ضعیفی تحت تأثیر جهش‌های *Hnf-1α* هستند. *Hnf-1α* دارای سه دمین فعال با نام‌های ۱) دمین دایمر شدن، ۲) دمین اتصال به DNA و دمین فعال کننده رونویسی تشکیل شده است. لازم به ذکر است که *Hnf-1α* از ۶۳۱ اسید آمینه تشکیل شده است. ژن *Hnf-1α* تولید سه ایزوفرم

همچنین ضد دیابت دارد. دیابت باعث کاهش سلول های بتا و اختلال در عملکرد آن ها می شود سیلی مارین این اختلال و کاهش را بهبود می بخشد و همچنین به طور قابل توجهی باعث افزایش بیان انسولین می شود. سیلی مارین شامل مخلوطی از چند ترکیب فنولی است که ایزومراز هم هستند که این ترکیب ها سلی بین، ایزوسیلی بین، سیلی کریستین و سیلی-دیانین نامیده می شوند (۱۶، ۱۷).

داروی ضد دیابت متفورمین که یک داروی خوراکی متعلق به دسته بی گوانیدها است، آنالوگ (GLP-1) (Glucagon-Like Peptide-1) است. GLP-1 پپتید آزاد کننده انسولین معدی-روده ای است که موجب افزایش رها شدن انسولین وابسته به گلوکز می شود. علاوه بر آن سبب مهار ترشح گلوکاگون، تحریک بیوسنتز انسولین، توسعه توده سلول های بتا و افزایش فنوتیپ سلول های بتا از طریق مسیر وابسته به PDX-1 می-شود (۱۸). با توجه به عوارض جانبی کم تر گیاهان دارویی نسبت به داورهای صنعتی و شیمیایی در این مطالعه به بررسی تأثیر سیلی مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf1a* در رت های نر و یستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جامعه مورد مطالعه و گروه بندی

بر مبنای مطالعه های کتابخانه ای و بررسی پژوهش های گذشته، در این مطالعه تعداد ۴۲ سر رت نر^۱ به وزن ۲۲۰-۱۸۰ از شرکت دانت ه شهرکرد خریداری گردید و به اتاق حیوانات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. حیوانات در قفسه ای مخصوص خود نگهداری شدند و آب و غذا به اندازه کافی در اختیارشان قرار داده شد. برای تغذیه حیوانات از غذای مخصوص موش از شرکت خوراک دام کابيله اصفهان تهیه شده بود استفاده گردید و آب لوله کشی توسط شیشه های آبخوری در اختیارشان قرار می گرفت (۱۹).

موش ها در ۷ گروه ۶ تایی دسته بندی شدند که شامل گروه A (شاهد)، گروه B بیمار دیابتی (شاهد دیابتی)، گروه C (بیمار دیابتی و تیمار با سیلی مارین دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه D (بیمار دیابتی و تیمار با سیلی مارین دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه E (بیمار دیابتی و تیمار با سیلی مارین دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه F (بیمار دیابتی و تیمار با متفورمین دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه G که

گروه سالم و دریافت کننده سیلی مارین ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بودند. موش ها در قفس های مجزا نگهداری شدند آب و غذا برای همه یکسان بود و همچنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه در دمای ۲۵-۲۲ و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت در شبانه روز حفظ شد (۱۹).

گروه های مورد آزمایش که در جدول شماره (۱) نشان داده شده است، هر گروه شامل شش سر رت نژاد ویستار بود که همه گروه ها به جز گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی (B)، هر سه روز یک بار طی یک ماه (۱۰ نوبت در ماه) دوزهای مختلف داروهای سیلی مارین (۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) و متفورمین (با استفاده از نتایج پژوهش های گذشته دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین (۲۰) برای گروه بیمار دریافت کننده متفورمین انتخاب شد) و به صورت جداگانه در آب مقطر حل شد و به صورت خوراکی (گاواژ) به موش ها داده شد.

قبل از انجام آزمایش تمامی موش ها با استفاده از دستگاه گلوکومتر BIONAM ساخت کشور تایوان و با اخذ یک قطره خون از طریق دم، گلوکز خون آن ها اندازه گیری شد.

برای ایجاد دیابت از دآوری استرپتوزوتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن رت (۵۰ mg/kg) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ با یک بار تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. اثبات دیابتی بودن قند خون رت ها ۷۲ ساعت از زمان تزریق (STZ) در محدوده بالاتر از ۲۴۰ میلی گرم بر دسی لیتر بود (۲۹، ۳۰). سنجش قند خون همه گروه ها هر ده روز یک مرتبه با رعایت ۸ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت گردید. پس از پایان دوره آزمایش در روز سی ام حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شدند و سپس با استفاده از کلروفرم بی هوش شده پس از تشریح، مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع حاوی RNAlater جهت اندازه گیری بیان ژن *Hnf-1a* ذخیره شد. برای اندازه گیری بیان ژن مورد بررسی در پژوهش حاضر از روش Real Time RT PCR (RT-qPCR) استفاده شد. باید این نکته را ذکر نمود که RNA پس از استخراج دستخوش تغییر خواهد شد و برای رفع این مشکل بلافاصله پس از برداشت باید در مجاورت محلول تثبیت کننده (RNA later) قرار گیرد و همچنین به دلیل حساسیت بالا تمام لوازم مورد نیاز با محلول DEPC ۱ درصد تیمار شدند (۲۱).

1 norvegicus

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای ژن Hnf-1 α و GAPDH

ژن	توالی
Forward Hnf-1 α	5'-TCCCTGTGTAT CATCCGTGGT-3'
Reverse Hnf-1 α	5'-TCAGTTCTC CTTGACCGTT-3'
GAPDH Forward	5'-TGGTGAAGGTCG GTGTGAACGGAT-3'
GAPDH Reverse	5'-TCCATGGTGGTG AAGACGCCAGTA-3'

جدول ۲- پروتکل دمایی مورد استفاده برای ژن Hnf-1 α در دستگاه روتورژن

مرحله	مدت زمان	دما	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۴ دقیقه	۹۴°C	۱ سیکل
واسرشت	۲۰ ثانیه	۹۴°C	۴۰ سیکل
اتصال	۲۰ ثانیه	۶۱°C	
گسترش	۲۰ ثانیه	۷۲°C	

در انتها CTهای مربوط به واکنشها توسط نرم افزار سیستم Real Time RT-PCR استخراج و ثبت گردید.

بعد از اتمام واکنش Real Time RT-PCR سیکل آستانه هر نمونه به صورت جداگانه به دست آمد؛ که با مقایسه سیکل آستانه ژن Hnf-1 α با ژن مرجع (GAPDH)، می توان میزان بیان ژن مورد نظر را به صورت کمی از فرمول شماره ۱ به دست آورد و میزان بیان ژن Hnf-1 α در هفت گروه مختلف اندازه گیری شد.

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{فرمول شماره ۱}$$

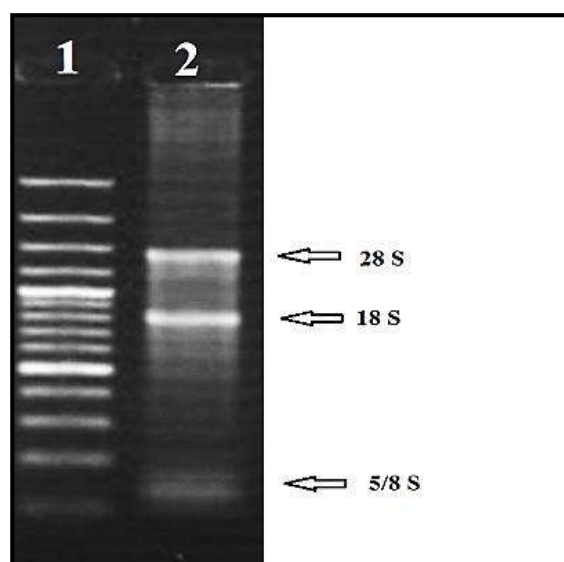
آنالیز آماری

برای محاسبه آماری و آنالیز آماری از نتایج به دست آمده از دستگاه Real time RT-PCR مقدار Fold change محاسبه شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار spss نسخه ۲۲ انجام شد. آنالیز آماری داده ها، از آنجا که داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، داده ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ STD) بیان شده است. نرمالیت داده ها با استفاده از تست کولموگروف-اسمیروف بررسی شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده ها، اختلاف بیان ژن بین نمونه های شاهد سالم (کنترل مثبت) و گروه شاهد دیابتی (کنترل منفی) و همچنین گروه های سالم شاهد و سالم دریافت کننده سیلی-مارین با استفاده از آزمون تی (T test) استفاده شد، میزان بیان ژن در سایر گروه ها (گروه های دیابتی دریافت کننده داروی سیلی-مارین و متفورین) بر اساس میزان بیان ژن در گروه شاهد دیابتی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون پشتیبان post test LSD ارزیابی

انجام تکنیک Real Time RT-PCR

استخراج RNA به وسیله هاون و ازت مایع و تراپیزول ساخت شرکت کیان مطابق پروتکل استاندارد شرکت های سازنده انجام شد و Total RNA استخراج شد و سپس برای حذف آلودگی ژنومی از کیت آنزیم DNase (شرکت Thermo) مطابق دستورالعمل این شرکت استفاده شد.

پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن آن و هم چنین میزان خلوص و عدم آلودگی ژنومی آن، از نظر کیفی به واسطه لود کردن روی ژل آگارز ۲ درصد (شکل ۱) و هم از نظر کمی به وسیله دستگاه نانودراپ میزان خلوص (OD) آن اندازه گیری شد که غلظت همه غلظت RNA ها بیش تر از ۹۰۰۰ ng/ μ l بود.



شکل ۱- حضور سه باند ۲۸ S، ۱۸ S و ۵/۸ S ریبوزومی در RNA تام

سپس مقداری از RNA برای ساخت cDNA استفاده شد. به این منظور از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا طبق دستورالعمل شرکت سازنده این کیت استفاده شد. برای تعیین میزان بیان ژن Hnf-1 α از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی (رفرنس) استفاده شد. پرایمرهای انتخابی این ژن ها ساخت شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی بودند. (الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول شماره (۱) آمده است).

در مرحله بعد به وسیله سیستم روتورژن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت سایبر مستر ریل تایم ساخت شرکت تاکارا کشور ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورد استفاده در دستگاه روتورژن در روش Real Time RT-PCR در جدول شماره (۲) آورده شده است.

شدند و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد (۲۲).

یافته‌ها

تغییرهای قند خون رت‌ها

در ابتدا تغییرهای قند خون در گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد. برای اندازه‌گیری قند خون هر ۱۰ روز یک‌بار قند خون ناشتای رت‌ها (۱۴ ساعت گرسنگی) با خون‌گیری از ناحیه دم و با استفاده از دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد و نتایج گروه‌های تیمار و شاهد در نمودار (۱) آمده است.

نتایج Real Time RT-PCR

نتایج حاکی از میزان تکثیر در ژن‌های $Hnf-1\alpha$ و $GAPDH$ را نشان داد که بیان ژن رفرنس ($GAPDH$) در همه نمونه‌ها یکسان بوده است و بیش‌ترین بیان ژن $Hnf-1\alpha$ مربوط به گروه سالم دریافت‌کننده دوز 150 mg/kg سیلی‌مارین (G) و بعد از آن به گروه‌های سالم شاهد (A)، دریافت‌کننده دوز 100 mg/kg سیلی‌مارین (D)، دریافت‌کننده دوز 50 mg/kg سیلی‌مارین (C)، دریافت‌کننده دوز 150 mg/kg سیلی‌مارین (E)، دریافت‌کننده دوز

متفورمین (F)، دریافت‌کننده دوز 50 mg/kg سیلی‌مارین (C) و شاهد دیابتی (B) است.

نتایج گروه سالم شاهد و کنترل منفی (شاهد دیابتی)

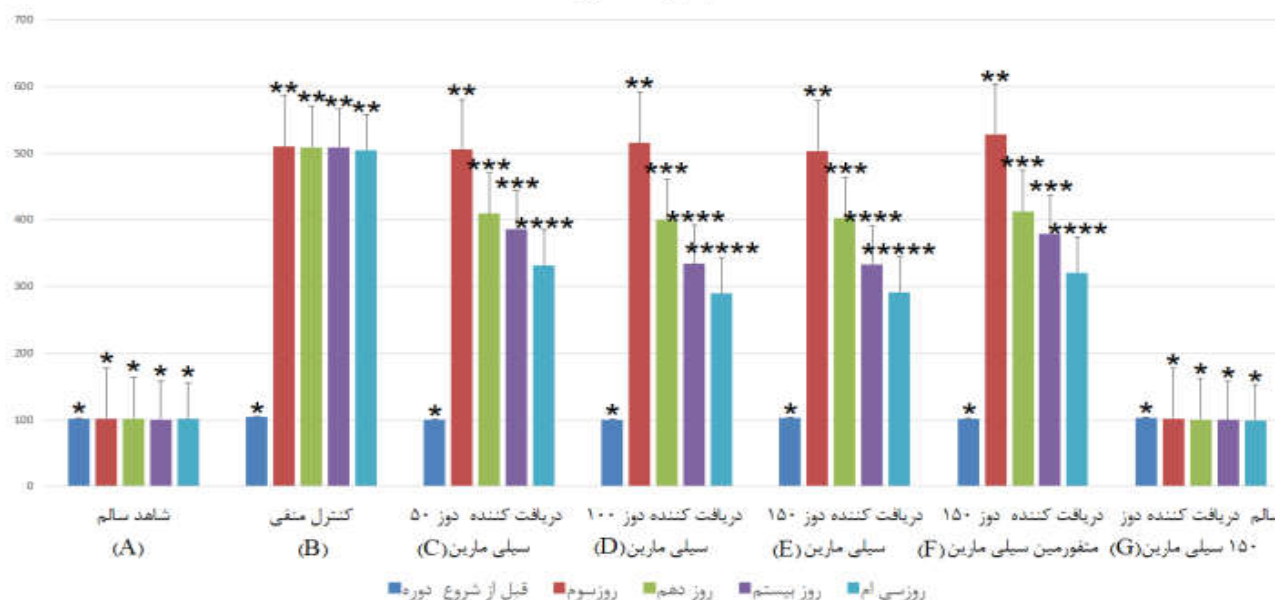
در این دو گروه مشخص شد که بیان ژن در گروه شاهد سالم بالا بوده و در گروه شاهد دیابتی افت شدیدی داشت و دارای اختلاف معنی‌دار است. ($P\text{-Value} < 0.05$). در جدول (۳) میانگین و انحراف معیار دو گروه سالم و شاهد دیابتی آورده شده است.

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار دو گروه سالم و شاهد دیابتی

گروه‌ها	میانگین $\pm$ انحراف معیار
شاهد سالم	11000.7 ± 0.539^a
شاهد دیابتی	0.124 ± 0.072^b

بررسی دو گروه شاهد دیابتی و سالم نشان داد که اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار است $P\text{-Value} = 0.002$ که در نمودار ۲ نشان داده شده است.

میانگین قند خون



نمودار ۱- تغییرهای قند خون رت‌ها

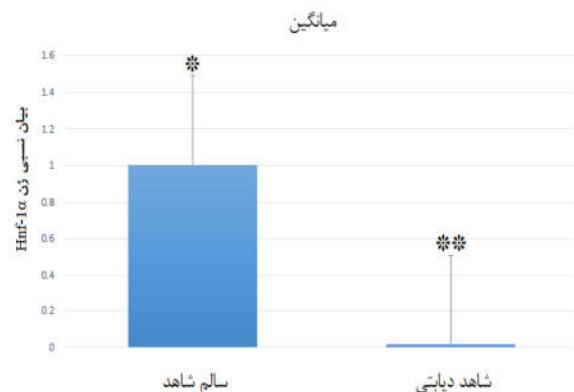
*تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. ($P\text{-Value} < 0.05$)



نمودار ۳- بررسی بیان نسبی در گروه‌های تیمار. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. ($P\text{-Value} < 0.05$). گروه دریافت کننده سیلی‌مارین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیش‌ترین تأثیر را داشته است. گروه‌های دریافت کننده سیلی‌مارین بیش‌ترین تأثیر را بر بیان ژن دارند و می‌توان گفت نسبت به داروی متفورمین که برای کنترل دیابت در بیماران استفاده می‌شود تأثیر سیلی‌مارین بیش‌تر است.

میزان بیان ژن در گروه شاهد دیابتی با توجه به نتایج به دست آمده بیان ژن *Hnf1α* قبل از ایجاد دیابت در همه گروه‌ها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروه‌های بیمار به شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلی‌مارین و متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد دیابتی که دارویی دریافت نکرده است بسیار کم بود. میزان بیان این ژن به ترتیب گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین، دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی‌مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین، بیش‌ترین بیان را داشته‌اند؛ اما میزان بیان گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین و دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی اختلاف معنی‌دار نداشت ($P\text{-Value} > 0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت داروی سیلی‌مارین عملکرد بهتری نسبت به متفورمین داشته است.

گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی‌مارین و دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی و گروه‌های دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین و هم-چنین دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ هم‌چنین گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین نسبت گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی‌مارین دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ دوز ۱۵۰ mg/kg داروی



نمودار ۲- بیان نسبی ژن *Hnf-1α* در دو گروه شاهد دیابتی و سالم که تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. بیان ژن در گروه شاهد دیابتی افت شدیدی داشته است ($P\text{-Value} < 0.05$)

نتایج بررسی گروه‌های تیمار

در جدول ۴ میانگین و انحراف معیار گروه‌های تیمار نشان داده شده است و از سوی دیگر بررسی گروه‌های تیمار حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف بین این گروه‌های بود ($P < 0.05$).

جدول ۴- نتایج بررسی گروه‌های تیمار

گروه	میانگین $\pm$ انحراف معیار
شاهد دیابتی	0.4329 ± 1.0458^a
دریافت کننده دوز ۵۰ سیلی مارین	6.7738 ± 3.1931^a
دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین	14.5591 ± 2.2741^b
دریافت کننده دوز ۱۵۰ سیلی مارین	24.1681 ± 0.2369^c
دریافت کننده دوز ۱۵۰ متفورمین	3.0036 ± 0.2059^d

در گروه شاهد دیابتی میزان بیان ژن به شدت پایین بوده است. در اینجا گروه دیابتی به عنوان رفرنس سایر گروه‌ها است و برحسب این گروه $P\text{-Value}$ سایر گروه‌ها به دست آورده شد. طبق تعریف اگر $P\text{-Value}$ کم‌تر از ۰/۰۵ باشد یعنی بین گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد اما اگر $P\text{-Value}$ بیش-تر از ۰/۰۵ باشد یعنی اختلاف معناداری بین آن‌ها وجود ندارد. میزان بیان این ژن به صورت ستونی نیز در نمودار ۳ آورده شده است.

سیلی مارین تأثیر بسزایی نسبت به همه دوزهای تیمار سیلی مارین و این دوز اثردهی بهتری نسبت به سایر دوزهای مورد استفاده داشته است که نشان دهنده وابسته به دوز بودن داروی سیلی مارین است. علی رقم این یافته ها، نیاز به انجام تحقیقات بیش تری است.

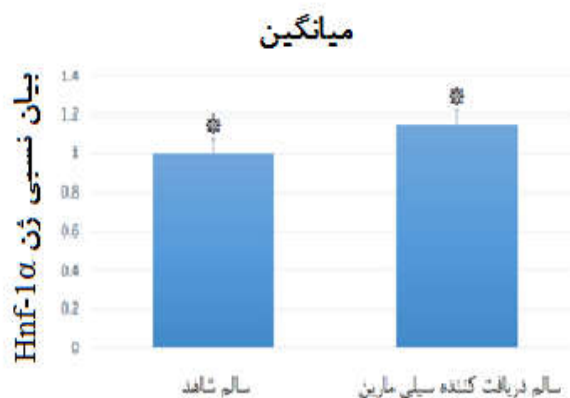
نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین

نتایج بیان ژن در دو گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین نیز مقایسه شد و مشخص شد که سیلی مارین در بیان ژن *Hnf1α* در موش های سالم اثر سویی ندارد حتی کمی هم افزایش بیان مشاهده شد اما معنی دار نبود ($P\text{-Value} > 0.05$).

میانگین و انحراف معیار نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین در جدول ۵ آورده شده است. همچنین نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که اختلاف بین این دو معنادار نیست ($P\text{-Value} = 0.262$) که در نمودار ۴ نشان داده شده است.

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار بین دو گروه

میانگین $\pm$ انحراف معیار	گروه ها
$1/0007 \pm 0/0539^a$	شاهد سالم
$1/1480 \pm 0/1225^a$	سالم دریافت کننده سیلی مارین



نمودار ۴- بررسی بیان نسبی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی مارین. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد. این نتایج نشان داد که میزان بیان ژن در گروه سالم دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلی مارین نسبت به گروه سالم شاهد کمی افزایش یافته ولی این افزایش بیان معنی دار نبود ($P\text{-Value} > 0.05$).

بحث

در تحقیق حاضر بررسی *Hnf1α* در دوز 150 در رت های دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که در این دوز کاهش چشم گیری در ژن *Hnf1α* و به عنوان دوز مؤثر معرفی می گردد ($P\text{-Value} < 0.05$) و باتوجه به این که مصرف سیلی مارین در کشور ما رایج نیست این ایده را می دهد که در تحقیقات آینده اهمیت بیش تری به اثرهای سیلی مارین داده شود. بیمارانی که دچار موتاسیون در ژن *HNF1α* هستند در آغاز قند نرمال دارند سپس به تدریج هیپرگلیسمی شروع می شود که علت آن نارسائی سلول های بتای پانکراس است، که در طول بیماری رو به افزایش می گذارد. درمان این گروه بدین صورت است که یک سوم بیماران با رژیم غذایی، یک سوم با قرص و یک سوم آخر با انسولین درمان می شوند. در این گروه عوارض میکروواسکولار بیش تر گزارش شده است. Valenzuela و همکاران در سال 1994 دریافتند که سیلی مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (23). Soto و همکاران نیز در سال 1998 نشان دادند که سیلی مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (24). در سال 1976 Stockinger و همکاران دریافتند که سیلی مارین و سیلی بنین به عنوان مواد محافظتی سیتوپلاسمی عمل می کنند (25). Soto و همکاران در تحقیقی دیگر در سال 2003 نشان دادن سیلی مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم های آنتی اکسیدانی می شود و افزایش گلوکاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می شود، این آنزیم ها باعث از بین رفتن رادیکال های آزاد و سموم حاصل از استرپتوزوتوسین می شود (26). Hunt و همکاران در سال 1999 دریافتند که در حالت های هیپرگلیسمی رادیکال های آزاد افزایش قابل توجهی می یابند علاوه بر این، گلوکز به همراه فلزات اکسید می شود و تولید رادیکال های آزاد سوپراکسید و هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و کیت آلدئیدهای واکنشی می کند (27). Valenzuela و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی مارین که یک آنتی اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال های آزاد می شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد همچنین گلوکاتیون را کاهش می دهد (28). در سال 1996 Utrilla و همکاران مکانیسم های محافظت کننده از سیلی مارین شامل تعدادی از وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که

دریافت کننده سیلی مارین نشان داد که در این دوز باعث کاهش چشم گیری در ژن *HNF1alpha* و به عنوان دوز مؤثر معرفی می گردد و باتوجه به این که مصرف سیلی مارین در کشور ما رایج نیست این ایده را می دهد که در تحقیقات آینده اهمیت بیش تری به اثرهای سیلی مارین داده شود.

سپاسگزاری

این مقاله تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است و مؤلفین این تحقیق مراتب سپاس خود را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که امکان اجرای این طرح را فراهم کردند، ابراز می دارند.

سیلی مارین از طریق تحریک پلی مرز I و رونویسی rRNA سنتز RNA ریوزومی (rRNA) را افزایش می دهد (۲۹). در سال ۲۰۱۲ Malekinejad و همکاران به بررسی سیلی مارین بر روی بیان *Hnf1alpha* در ماهی ها پرداختند و نتایج نشان داد که سیلی مارین می تواند یک داروی مناسب برای کاهش آسیب های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک باشد (۳۰). در سال ۲۰۱۴ Atawia و همکاران به بررسی سیلی مارین در سرطان پروستات و بیان ژن *Hnf1a* پرداختند و نتایج نشان داد که سیلی مارین اثرهای مثبتی بر روی بیان این ژن دارد (۳۱). در سال ۲۰۱۶ Jin و همکاران به بررسی سیلی مارین بر روی ژن *Hnf-1α* بر روی ریه موش ها پرداختند. این دانشمندان اظهار داشتند که درمان با سیلی مارین باعث فعال شدن کاسپازها می شود و همچنین با تأثیر بر بیان ژن *Hnf-1α* در اختلال های ریوی مؤثر است (۳۲). در سال ۲۰۱۸ Locke و همکاران به بررسی پلی مورفیسم های rs1169288 و rs1800574 در ژن *HNF1A* پرداختند و نتایج آن ها حاکی از آن بود که بین ژنوتیپ و سن در تشخیص دیابت ارتباط معنی داری وجود داشت و همچنین برای تشخیص دیابت مؤثر هستند (۳۳).

در سال ۲۰۱۸ Haliyur و همکاران به بررسی ژن *HNF1A* پرداختند. آن ها دریافتند که اختلال در ژن *HNF1A* منجر به دیابت می شد. همچنین سن شروع دیابت ممکن است تحت تأثیر موقعیت جهش های وابسته به ایزوفرم های *Hnf-1α* باشد و مشخص شده است افرادی که جهش های Missense آن ها در اگزون ۷ یا در اگزون های ۸ تا ۱۰ قرار گرفته است نسبت به افرادی که دارای جهش در اگزون های ۱ تا ۶ است ۱۰ سال دیرتر تشخیص داده می شود (۳۴).

Ozsu و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی جهش واقع در ژن *hfa-1* آلفا پرداختند و دریافتند که در کودکان ترکیه با تشخیص جهش می توان گفت که این کودکان مبتلا به دیابت نوع اول خواهند شد (۳۵).

Najmi و همکاران در سال ۲۰۱۷ ژن *HNF1A* را به عنوان عوامل خطر برای دیابت نوع ۲ در جمعیت عمومی اعلام کردند (۳۶).

نتیجه گیری

با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که سیلی مارین باعث کاهش قند خون در بیماری دیابت می شود. بررسی *HNF1alpha* در دوز ۱۵۰ در رت های

1. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, et al. An expanded genome-wide association study of type 2 diabetes in Europeans. *Diabetes*. 2017;db161253.
2. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66(2):241-55.
3. Volkov P, Bacos K, Ofori JK, Esguerra JLS, Eliasson L, Rönn T, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of human pancreatic islets reveals novel differentially methylated regions in type 2 diabetes pathogenesis. *Diabetes*. 2017;db160996.
4. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, et al. Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Diabetes*. 2017;66(1):193-205.
5. Association AD. 15. Diabetes Advocacy: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes care*. 2018;41(Suppl 1):S152.
6. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Medical Science Monitor*. 2006;12(7):RA130-RA47.
7. Gatreh-Samani K, Farrokhi E, Khalili B, Rafieian-Kopaei M, Moradi M. Purslane (*Portulaca oleracea*) effects on serum paraoxanase-1 activity. *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences*. 2011;13.
8. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatement of diabetes mellitus: an overview. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2003;49(4):635-9.
9. Topaloğlu Ö, Evren B, Şahin İ. Monogenic Diabetes Case Presented with Symptomatic Hyperglycemia and Atypical Mutation. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2017;9(1):14.
10. Iacovazzo D, Flanagan SE, Walker E, Quezado R, de Sousa Barros FA, Caswell R, et al. MAFA missense mutation causes familial insulinomatosis and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;201712262.
11. López-Noriega L, Cobo-Vuilleumier N, Narbona-Pérez AJ, Araujo-Garrido JL, Lorenzo PI, Mellado-Gil JM, et al. Levothyroxine enhances glucose clearance and blunts the onset of experimental type 1 diabetes mellitus in mice. *British journal of pharmacology*. 2017;174(21):3795-810.
12. Stueck AE, Qu Z, Huang MAY, Campreciós G, Ferrell LD, Thung SN, editors. *Hepatocellular Carcinoma Arising in an HNF-1α-Mutated Adenoma in a 23-Year-Old Woman with Maturity-Onset Diabetes of the Young: A Case Report*. *Seminars in liver disease*; 2015: Thieme Medical Publishers.
13. Jonasson ME, Wicklow BA, Sellers EA, Dolinsky VW, Doucette CA. Exploring the role of the HNF-1α G319S polymorphism in β cell failure and youth-onset type 2 diabetes: Lessons from MODY and Hnf-1α-deficient animal models. *Biochemistry and Cell Biology*. 2015;93(5):487-94.
14. Knebel B, Mack S, Haas J, Herman-Friede MK, Lange S, Schubert O, et al. Divergent phenotypes in siblings with identical novel mutations in the HNF-1α gene leading to maturity onset diabetes of the young type 3. *BMC medical genetics*. 2016;17(1):36.
15. Bahmani M, Sarrafchi A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Autism: Pathophysiology and promising herbal remedies. *Current pharmaceutical design*. 2016;22(3):277-85.
16. García-Ramírez M, Turch M, Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Silymarin prevents diabetes-induced hyperpermeability in human retinal endothelial cells. *Endocrinologia, diabetes y nutricion*. 2018;65(4):200-5.

17. Rahimi R, Karimi J, Khodadadi I, Tayebinia H, Kheiripour N, Hashemnia M, et al. Silymarin ameliorates expression of urotensin II (U-II) and its receptor (UTR) and attenuates toxic oxidative stress in the heart of rats with type 2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;101:244-50.
18. Green BD, Irwin N, Duffy NA, Gault VA, O'Harte FP, Flatt PR. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1. *European journal of pharmacology*. 2006;547(1-3):192-9.
19. Mortazavi P, Aghaey MM, Poosty I, Hoseiny S. Histopathologic study of Pancreas in Streptozotocin-Induced diabetic Rats treated with ethanolic extract of *protulaca oleracea* (Purslane) 2014.
20. Musavi-Ezmarch SF, Mazani M, Heidarian E, Alipanah-Moghadam R, Rafieian-Kopaei M, Ebrahimi M, et al. Effect of hydroalcoholic extract of Chevil (*Ferulago angulata*) on glucose and lipid in diabetic male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2015;17(3):230-7.
21. Hosseinpour Feizi M, Saed S, Babaei E, Montazeri V, Halimi M. Evaluation of Nucleostemin Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2012;19(2).
22. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*. 2006;7(1):85.
23. Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*. 1994;27:105-.
24. Soto CP, Perez BL, Favari LP, Reyes JL. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1998;119(2):125-9.
25. Stockinger L, Trost W, Uebel H. Quantification électronique des lésions hépatiques expérimentales, mises en évidence en histologie. *Arch Anat Cytol Pathol*. 1976;24:203-9.
26. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003;136(3):205-12.
27. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochemical journal*. 1988;256(1):205-12.
28. Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta medica*. 1989;55(05):420-2.
29. Utrilla M. Natural products with hepatoprotective action. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 1996;18:11-2.
30. Malekinejad H, Taheri-Brujerdi M, Janbaz-Acyabar H, Amniattalab A. Silymarin regulates HIF-1 α and iNOS expression in the brain and gills of hypoxic-reoxygenated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Biology*. 2012;15(3):261-73.
31. Atawia RT, Mosli HH, Tadros MG, Khalifa AE, Mosli HA, Abdel-Naim AB. Modulatory effect of silymarin on inflammatory mediators in experimentally induced benign prostatic hyperplasia: emphasis on PTEN, HIF-1 α , and NF- κ B. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2014;387(12):1131-40.
32. Jin Y, Zhao X, Zhang H, Li Q, Lu G, Zhao X. Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(2):1135-40.

