



Scan online to view this article

Effect of Silymarin on Blood Glucose and Hnfla 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 Hnfla gene in diabetes, so the aim of this study was to investigate the effect of silymarin on blood sugar and expression of Hnfla 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 Hnfla gene using Real Time RT PCR..

Results: Evaluation of Hnflalpha at a dose of 150 mg / kg in silymarin-receiving rats showed a significant decrease in Hnflalpha 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: Hnfla, 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 سیلیمارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf1a* در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

رحمان جعفری هفچجانی، فرشید غبیبی حاجیور، سجاد نیک‌خواه*

گروه زیست‌شناختی، 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 کمتر دارند از سویی بررسی‌ها حاکی از نقش مهم ژن *Hnf1a* در بیماری دیابت است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سیلیمارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf1a* در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است.

مواد و روش‌ها: ۴۲ سر رت نر به صورت تصادفی انتخاب شدند و به ۷ گروه شش‌تایی تقسیم شدند، رت‌های دیابتی با ماد استرپتوزوتوسین (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت) دیابتی شدند و به سه گروه از آن‌ها دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلیمارین داده شد و قند خون ناشتای آن‌ها سنجیده شد و پس از پایان دوره رت‌ها با داروی بی‌هوش و تشریح شدن مقداری از بافت پانکراس جدا سازی و برای بررسی بیان ژن *Hnf1a* به روش Real Time RT-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی *Hnf1alpha* در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رت‌های دریافت کننده سیلیمارین کاهش چشمگیری در بیار ژن *Hnf1alpha* مشاهده شد و به عنوان دوز مؤثر معرفی شد ($P < 0.05$) و هم‌چنین میزان قند خون به ۱۰۰ میلی‌گرم؛ دسی‌لیتر رسید و با توجه به این که مصرف سیلیمارین در کشور رایج نیست، می‌توان در تحقیقات آینده اهمیت بیشتری به اثرهای سیلیمارین داده شود و به عنوان یه داروی مؤثر در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سیلیمارین باعث کاهش قند خون در بیماری دیابت می‌شود و در صورت تأیید در مطالعه‌های گسترده می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری دیابت مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: *Hnf1a* سیلیمارین، رت، استرپتوزوتوسین.

مقدمه

شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشمگیری داشته است و تخمین زده‌اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۱). به طور کلی دیابت به دو نوع دیابت نوع یک و دیابت نوع دو تقسیم می‌شود. در دیابت نوع یک تخریب سلول‌های بتا در پانکراس منجر به نقص در تولی انسولین می‌شود و در دیابت نوع دو تخریب گیرنده‌های انسولین در سلول‌های بافت‌ها از بین می‌روند و مقاومت پیش‌رونده بدن به انسولین وجود دارد و در نهایت ممکن است منجر به تخریب سلول‌های بتا پانکراس و هایپرگلیسمی و نقص کامل در تولید انسولین منجر شود (۲). دیابت نوع یک نوع دو، یک سبب‌شناسی ژنتیکی مشترک دارند. علت ایجاد این بیماری مشخص نیست اما فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارند (۳).

دیابت یکی از رایج‌ترین بیماری‌های متابولیک است که با هایپرگلیسمی مزمن و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و بروتئین همراه است. از شایع‌ترین علائم آن عدم تحمل گلوکز یا ازدیاد قند خون است و به همین دلیل فرد به عوارض کوتاه مدت و بلند مدت دیابت دچار می‌شود (۴).

نویسنده مسئول:

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

پست الکترونیکی nikkhah1993@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۴

Hepatic Nuclear Factor Homeobox) *HNF1A* (C) (A)، *HNF1A* و (B) *HNF1A*(A) را می‌کند که این سه ایزوفرم در اثر پردازش و پلی‌آدنیلاسیون متفاوت به وجود می‌آیند. *HNF1A* (A) دارای ۱۰ اگزون بوده اما (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 آن‌ها در اگزون ۷ یا در اگزون‌های ۸ تا ۱۰ Missense 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.) 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 بهنام 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 گلوتاتیون 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 درنتیجه 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 بهدلیل 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 (۶-۸).

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

تحقیقات نشان داده است که *Hnf-1α* (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، پیروات و بتا فیبرینوژن نقش دارد تعریف شد. اما بعداً 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 گلوتاریل کواروکتاز، پیروات کیناز و ۲ گزوگلوتارات دهیدروژناز تحت تاثیر نقص در *Hnf-1α* هستند. برخی مطالعه‌ها نشان داد که با وجود جهش در ژن *Hnf-1α* mRNA ژن‌هایی مانند پیروات کیناز و انتقال دهنده گلوکوز ۲ در کبد، کلیه و روده تغییر نمی‌کنند. تحقیقات نشان داده است که اغلب ژن‌های هدف *Hnf-1α* در هپاتوسیت‌ها 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. لازمه ذکر است که *Hnf-1α* از ۶۳۱ اسید آمینه تشکیل شده است. ژن *Hnf-1α* تولید سه ایزوفرم

گروه سالم و دریافت کننده سیلیمارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. موش‌ها در قفسه‌های مجزا نگهداری شدند آب و غذا برای همه یکسان بود و همچنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه در دمای ۲۵-۲۶°C و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعت در شبانه روز حفظ شد (۱۹).

گروه‌های مورد آزمایش که در جدول شماره (۱) نشان داده شده است، هر گروه شامل شش سررت زیاد ویستار بود که همه گروه‌ها به جز گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی (B)، هر سه روز یکبار طی یک ماه (۱۰ نوبت در ماه) دوزهای مختلف داروهای سیلیمارین (۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) و متفورمین (با استفاده از نتایج پژوهش‌های گذشته دوز ۱۵۰ میلی‌گرم 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 (گاواز) به موش‌ها داده شد.

قبل از انجام آزمایش تمامی موش‌ها با استفاده از دستگاه گلوكومتر BIONAM ساخت کشور تایوان و با اخذ یک قطره خون از طریق دم، گلوكز خون آن‌ها اندازه‌گیری شد.

برای ایجاد دیابت از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت (۵۰ mg/kg) محلول در بافر سیترات ۱/۰ مولار با اسیدیته ۴/۵ با یکبار تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. اثبات دیابتی بودن قند خون رت‌ها ۲۲ ساعت از زمان تزریق (STZ) در محدوده بالاتر از ۲۴۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود (۲۹،۳۰). سنجش قند خون همه گروه‌ها هر ده روز یکمرتبه با رعایت ۸ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوكز خون ثبت گردید. پس از پایان دوره آزمایش در روز سی‌ام حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شدند و سپس با استفاده از کلروفرم بی‌هوش شده پس از تشریح، مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع حاوی RNAlater جهت اندازه‌گیری بیان ژن *Hnf-1α* ذخیره شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن مورد بر بررسی در پژوهش حاضر از روش Real Time RT PCR 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 ثبت کننده (RNA later) قرار گیرد و همچنین بهدلیل حساسیت بالا تمام لوازم مورد نیاز با محلول ۱ DEPC درصد تیمار شدند (۲۱).

همچنین ضد دیابت دارد. دیابت باعث کاهش سلول‌های بتا و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شود سیلیمارین این اختلال و کاهش را بهبود می‌بخشد و همچنین به طور قابل توجهی باعث افزایش بیان انسولین می‌شود. سیلیمارین شامل مخلوطی از چند ترکیب فنولی است که ایزومراز هم هستند که این ترکیب‌ها سلی‌بین، ایزو‌سیلی‌بین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین نامیده می‌شوند (۱۷،۱۶).

داروی ضد دیابت متفورمین که یک داروی خوراکی متعلق به دسته‌ی گوانیدها است، آنالوگ (GLP-1) (Peptide-1 GLP-1) است. GLP-1 پیتید آزاد کننده انسولین معدی-روده ای است که موجب افزایش رها شدن انسولین وابسته به گلوكز می‌شود. علاوه‌بر آن سبب مهار ترشح گلوكاگون، تحريك بيوسنتز انسولين، توسعه توده سلول‌های بتا و افزایش فنوتیپ سلول‌های بتا از طریق مسیر وابسته به PDX-1 می‌شود (۱۸). با توجه به عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی در این مطالعه به بررسی تأثیر سیلیمارین بر قند خون و بیان ژن *Hnf-1α* در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه و گروه بندی

بر مبنای مطالعه‌های کتابخانه‌ای و بررسی پژوهش‌های گذشته، در این مطالعه تعداد ۴۲ سررت نر^۱ به وزن ۲۲۰-۱۸۰ از شرکت دانته شهرکرد خریداری گردید و به اتاق حیوانات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. حیوانات در قفسه‌ای 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 کابیله اصفهان تهیه شده بود استفاده گردید و آب لوله‌کشی توسط شیشه‌های آبخوری در اختیارشان قرار می‌گرفت (۱۹).

موش‌ها در ۷ گروه ۶ تایی دسته‌بندی شدند که شامل گروه A (شاهد)، گروه B بیمار دیابتی (شاهد دیابتی)، گروه C (بیمار دیابتی و تیمار با سیلیمارین دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه D (بیمار دیابتی و تیمار با سیلیمارین دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه E (بیمار دیابتی و تیمار با سیلیمارین دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه F (بیمار دیابتی و تیمار با متفورمین دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه G که

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'-TGGTCAAGGTC GTGTGAACGGAT-3'
GAPDH Reverse	5'-TCCATGGTGGTG AAGACGCCAGTA-3'

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

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

در انتهای CT های مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار سیستم 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)، می‌توان میزان بیان ژن موردنظر را به صورت کمی از فرمول شماره ۱ به دست آورد و میزان بیان ژن Hnf-1 α در هفت گروه مختلف اندازه‌گیری شد.

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$$

فرمول شماره ۱

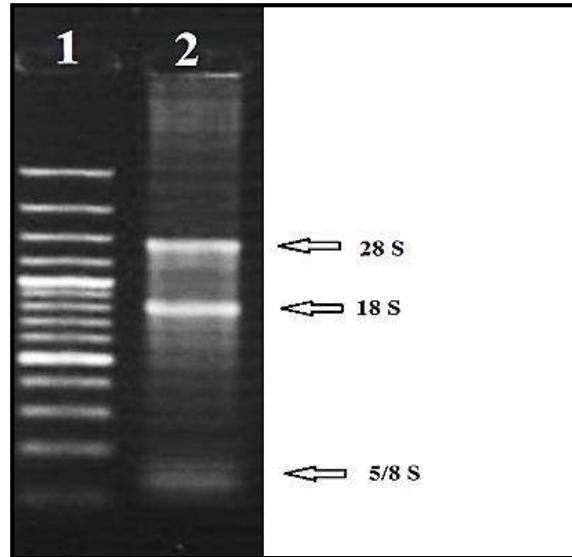
آنالیز آماری

برای محاسبه آماری و آنالیز آماری از نتایج به دست آمده از دستگاه Fold change Real time RT-PCR مقدار محاسبه Fold change Real time RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۲۲ انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۲۲ انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها، از آنجا که داده‌ها از توزیع نرمال شده‌اند، داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm STD) بیان شده است. نرمالیته داده‌ها با استفاده از تست کولموجروف-اسمیروف بررسی شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، اختلاف بیان ژن بین نمونه‌های شاهد سالم (کنترل مثبت) و گروه شاهد دیابتی (کنترل منفی) و همچنین گروه‌های سالم شاهد و سالم دریافت کننده سیلی-مارین با استفاده از آزمون تی (T test) استفاده شد، میزان بیان ژن در سایر گروه‌ها (گروه‌های دیابتی دریافت کننده داروی سیلی‌مارین و متغورین) بر اساس میزان بیان ژن در گروه شاهد دیابتی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با آزمون پشتیبان post test LSD ارزیابی

Real Time RT-PCR

استخراج RNA به وسیله هاون و ازت مایع و تراپیزول ساخت شرکت کیان مطابق پروتکل استاندارد شرکت‌های 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 هم‌چنین 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 نانودرایپ میزان خلوص (OD) آن اندازه‌گیری شد که غلظت همه غلظت RNA ها بیشتر از ۹۰۰۰ ng/ μ l بود.



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

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 (فرنس) استفاده شد. پرایمرهای انتخابی این ژن‌ها 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 روتورزن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت سایبر مستر ریل تایم ساخت شرکت تاکارا کشور ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورد Real Time RT-PCR استفاده در دستگاه روتورزن در روش در جدول شماره (۲) آورده شده است.

متفورمین (F)، دریافت‌کننده دوز ۵۰ 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	$1/0007 \pm 0/0539^a$
شاهد دیابتی	$0/0174 \pm 0/072^b$

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.

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

یافته‌ها

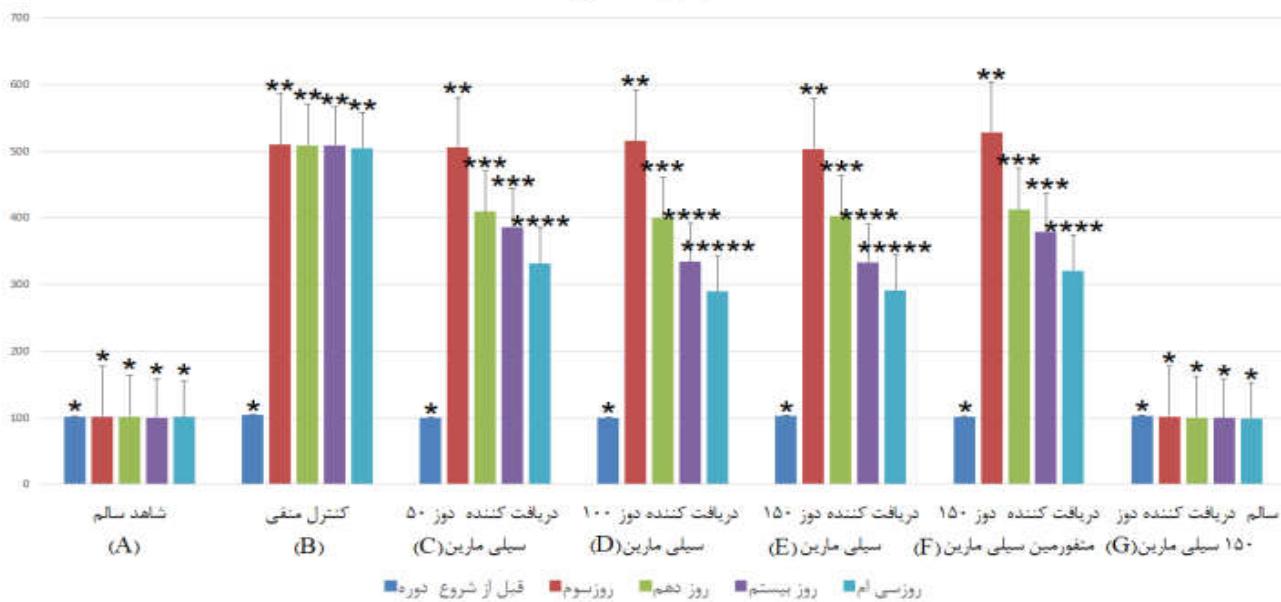
تغییرهای قند خون رت‌ها

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

نتایج Real Time RT-PCR

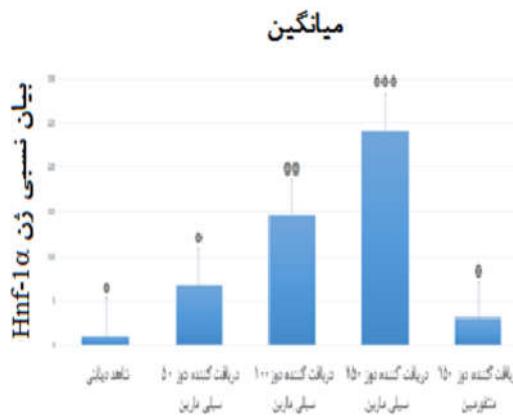
نتایج حاکی از میزان تکثیر در ژن‌های Hnf-1 α و GAPDH را نشان داد که بیان ژن رفرنس (GAPDH) در همه نمونه‌ها یکسان بوده است و بیشترین بیان ژن Hnf-1 α مربوط به گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg دوز ۱۵۰ سیلیمارین (G) و بعد از آن به گروه‌های سالم شاهد (A)، دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg ۱۰۰ سیلیمارین (D)، دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ سیلیمارین (E)، دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg ۱۵۰ سیلیمارین (F)، دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg ۱۰۰ سیلیمارین (G)، دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ سیلیمارین (H) آمده است.

میانگین قند خون



نمودار ۱- تغییرهای قند خون رت‌ها

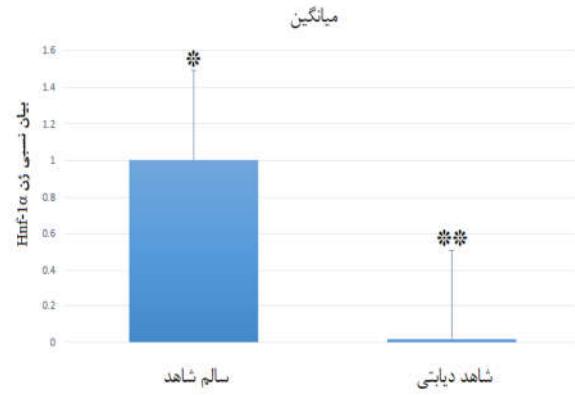
*تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. ($P\text{-Value} < 0.05$)



نمودار ۳- بررسی بیان نسبی در گروههای تیمار، تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد. ($P\text{-Value} < 0.05$). گروه دریافت کننده سیلیمارین با دوز ۱۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم بیشترین تأثیر را داشته است. گروههای دریافت کننده سیلیمارین بیشترین تأثیر را بر بیان زن دارند و می توان گفت نسبت به داروی متغورمین که برای کنترل دیابت در بیماران استفاده می شود تأثیر سیلیمارین بیشتر است.

میزان بیان زن در گروه شاهد دیابتی با توجه به نتایج به دست آمده بیان زن $Hnf1\alpha$ 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 متغورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است همچنین میزان بیان این زن در گروه شاهد دیابتی که دارویی دریافت نکرده است بسیار کم بود. میزان بیان این زن به ترتیب گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg ، دریافت کننده دوز 100 mg/kg سیلیمارین، 50 mg/kg سیلیمارین، گروه دریافت کننده دوز 100 mg/kg سیلیمارین، گروه دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین، بیشترین بیان را داشته اند؛ اما میزان بیان گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg متغورمین و دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین نسبت به گروههای شاهد دیابتی اختلاف معنی دار نداشت ($P\text{-Value} > 0.05$). بنابراین می توان نتیجه گرفت داروی سیلیمارین عملکرد بهتری نسبت به متغورمین داشته است.

گروههای بیمار دریافت کننده دوز 100 mg/kg سیلیمارین و دوز 150 mg/kg سیلیمارین نسبت به گروههای شاهد دیابتی و گروههای دریافت کننده دوز 150 mg/kg متغورمین و همچنان دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین دارای اختلاف معنی دار بودند ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ همچنان گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلیمارین نسبت گروه دریافت کننده دوز 100 mg/kg سیلیمارین دارای اختلاف معنی دار بود ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ دوز 150 mg/kg داروی



نمودار ۴- بیان نسبی زن $Hnf-1\alpha$ در دو گروه شاهد دیابتی و سالم که تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد. بیان زن 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 معنی دار بودن اختلاف بین این گروههای بود ($P < 0.05$) که در نمودار ۳ نشان داده شده است.

جدول ۴- نتایج بررسی گروههای تیمار

گروه	میانگین \pm انحراف معیار
شاهد دیابتی	0.4329 ± 1.0458^a
دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین	6.7738 ± 3.1931^a
دریافت کننده دوز 100 mg/kg سیلیمارین	14.5591 ± 2.2741^b
دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلیمارین	24.1681 ± 0.2369^c
دریافت کننده دوز 200 mg/kg متغورمین	37.0036 ± 0.2059^a

در گروه شاهد دیابتی میزان بیان زن به شدت پایین بوده است. در اینجا گروه دیابتی به عنوان رفرانس سایر گروهها است و بر حسب این گروه P -Value سایر گروهها به دست آورده شد. طبق تعریف اگر P -Value کمتر از 0.05 باشد یعنی بین گروهها اختلاف معناداری وجود دارد اما اگر P -Value تر از 0.05 باشد یعنی اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد. میزان بیان این زن به صورت ستونی نیز در نمودار ۳ آورده شده است.

بحث

در تحقیق حاضر بررسی *Hnf1alpha* در دوز ۱۵۰ در رت‌های دریافت کننده سیلی‌مارین نشان داد که در این دوز کاهش چشم‌گیری در ژن *Hnf1alpha* و به عنوان دوز مؤثر معرفی می‌گردد ($P\text{-Value} < 0.05$) و با توجه به این که مصرف سیلی‌مارین در کشور ما رایج نیست این ایده را می‌دهد که در تحقیقات آینده اهمیت بیشتری به اثرهای سیلی‌مارین داده شود. بیمارانی که دچار موتاسیون در ژن *HNF1alpha* هستند در آغاز قند نرمال دارند سپس به تدریج هیپرگلیسمی شروع می‌شود که علت آن نارسائی سلول‌های بتای پانکراس است، که در طول بیماری رو به افزایش می‌گذارد. درمان این گروه بدین صورت است که یک سوم بیماران با رژیم غذائی، یک سوم با قرص و یک سوم آخر با انسولین درمان می‌شوند. در این گروه عوارض میکروواسکولار بیشتر گزارش شده است. همکاران در سال ۱۹۹۴ دریافتند که سیلی‌مارین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۳). *Soto* و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوكز پلاسمای پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوكسان در موش صحرایی است (۲۴). در سال ۱۹۷۶ *Stockinger* و همکاران دریافتند که سیلی‌مارین و سیلی‌بینین به عنوان مواد محافظتی سیتوپلاسمی عمل می-کنند (۲۵). *Soto* و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادن سیلی‌مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی می‌شود و افزایش گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیمهای باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استریوتزوتوسین می‌شود (۲۶). *Hunt* و همکاران در سال ۱۹۹۹ دریافتند که در حالت‌های هیپرگلیسمی رادیکال‌های آزاد افزایش قابل توجهی می‌یابند علاوه بر این، گلوكز به همراه فلزات اکسید می‌شود و تولید رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید و هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و کیت‌آلدیدهای واکنشی می‌کند (۲۷). *Valenzuela* و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی‌مارین که یک آنتی‌اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد هم‌چنین گلوتاتیون را کاهش می‌دهد (۲۸). در سال ۱۹۹۶ *Utrilla* و همکاران مکانیسم‌های محافظت‌کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که

سیلی‌مارین تأثیر بسزایی نسبت به همه دوزهای دریافت سیلی‌مارین و این دوز اثردهی بهتری نسبت به سایر دوزهای مورد استفاده داشته است که نشان‌دهنده وابسته به دوز بودن داروی سیلی‌مارین است. علی‌رغم این یافته‌ها، نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است.

نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین

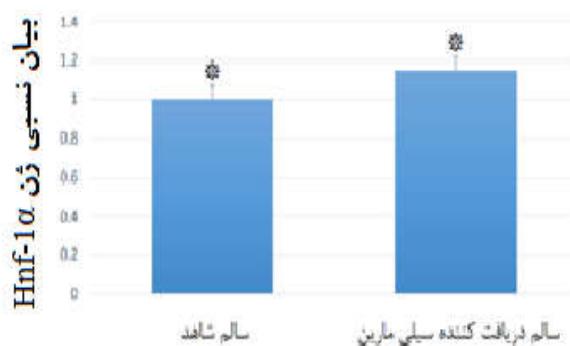
نتایج بیان ژن در دو گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین نیز مقایسه شد و مشخص شد که سیلی‌مارین در بیان ژن *Hnf1α* در موش‌های سالم اثر سویی ندارد حتی کمی هم افزایش بیان مشاهدی شد اما معنی‌دار نبود ($P\text{-Value} > 0.05$).

میانگین و انحراف معیار نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین در جدول ۵ آورده شده است. هم‌چنین نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین 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

گروه‌ها	میانگین ± انحراف معیار
شاهد سالم	۱/۰۰۰۷ ± ۰.۰۵۲۹ ^a
سالم دریافت کننده سیلی‌مارین	۱/۱۴۸۰ ± ۰.۱۲۳۵ ^a

میانگین



نمودار ۴- بررسی بیان نسبی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که میزان بیان ژن در گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین نسبت به گروه سالم شاهد کمی افزایش یافته ولی این افزایش بیان معنی‌دار نبود ($P\text{-Value} > 0.05$).

دربافت کننده سیلیمارین نشان داد که در این دوز باعث کاهش چشمگیری در ژن *HNFlalpha* و به عنوان دوز مؤثر معرفی می‌گردد و با توجه به این که مصرف سیلیمارین در کشور ما رایج نیست این ایده را می‌دهد که در تحقیقات آینده اهمیت بیشتری به اثرهای سیلیمارین 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 می‌دارند.

سیلیمارین از طریق تحریک پلیمراز I و رونویسی rRNA سنتر RNA ریبوزومی (rRNA) را افزایش می‌دهد (۲۹). در سال ۲۰۱۲ Malekinejad و همکاران به بررسی سیلیمارین بر روی بیان *Hnf1alpha* در ماهی‌ها پرداختند و نتایج نشان داد که سیلیمارین می‌تواند یک داروی مناسب برای کاهش آسیب‌های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک باشد (۳۰). در سال ۲۰۱۴ Atawia و همکاران به بررسی سیلیمارین در سرطان پروستات و بیان ژن *Hnf1a* پرداختند و نتایج نشان داد که سیلیمارین اثرهای مثبتی بر روی بیان این ژن دارد (۳۱). در سال ۲۰۱۶ Jin و همکاران به بررسی سیلیمارین بر روی ژن *Hnf-1α* بر روی ریه موش‌ها پرداختند. این دانشمندان اظهار داشتند که درمان با سیلیمارین باعث فعال شدن کاسپارها می‌شود و همچنین با تأثیر بر بیان ژن *Hnf-1α* در اختلال‌های ریوی مؤثر است (۳۲). در سال ۲۰۱۸ Locke و همکاران به بررسی پلیمورفیسم‌های rs1800574 و rs1169288 در ژن *HNFlA* پرداختند و نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که بین ژنتیک و سن در تشخیص دیابت ارتباط معنی‌داری وجود داشت و همچنین برای تشخیص دیابت مؤثر هستند (۳۳).

در سال ۲۰۱۸ Haliyur و همکاران به بررسی ژن *HNFlA* پرداختند. آن‌ها دریافتند که اختلال در ژن *HNFlA* منجر به دیابت می‌شود. همچنین سن شروع دیابت ممکن است تحت تأثیر موقعیت جهش‌های وابسته به ایزوفرم‌های *Hnf-1α* باشد و مشخص شده است افرادی که جهش‌های Missense 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 (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 می‌توان گفت که این کودکان مبتلا به دیابت نوع اول خواهند شد (۳۵).

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

نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سیلیمارین باعث کاهش قند خون در بیماری دیابت می‌شود. بررسی *HNFlalpha* در دوز ۱۵۰ در رت‌های

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 University of Medical Sciences*. 2011;13.
8. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment 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 ÁJ, 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-1 α -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-1 α G319S polymorphism in β cell failure and youth-onset type 2 diabetes: Lessons from MODY and Hnf-1 α -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-1 α 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. *Endocrinología, 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, Aghaei MM, Poosty I, Hoseiny S. Histopathologic study of Pancreas in Straptozotocin-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 experimentales, 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.

