



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

Hepatic Nuclear Factor Homeobox) *HNF1A* (C) و *HNF1A*(A) و *HNF1A*(B) را می‌کند که این سه ایزوفرم در اثر پردازش و پلی‌آدنیلایسیون 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. به‌تازگی 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 گزوجلوتارات دهیدروژناز تحت تأثیر نقص در *Hnf-1α* هستند. برخی مطالعه‌ها 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) دمین‌دایمر 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 سلول‌های بتا و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شود سیلی‌مارین این اختلال و کاهش را بهبود می‌بخشد و همچنین به‌طور 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 سیلی-دیانین نامیده می‌شوند (۱۶،۱۷).

داروی ضد دیابت متفورمین که یک داروی خوراکی متعلق به دسته بی‌گوانیدها 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 می‌شود. علاوه بر آن سبب مهار ترشح گلوکاگون، تحریک بیوسنتز انسولین، 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 داورهای صنعتی و شیمیایی در این مطالعه به بررسی تأثیر سیلی‌مارین بر قند خون و بیان ژن *Hnfla* 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 سر رت 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

گروه سالم و دریافت کننده سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. موش‌ها در قفس‌های 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).

گروه‌های مورد آزمایش که در جدول شماره (۱) نشان داده شده است، هر گروه شامل شش سر رت نژاد ویستار بود که همه گروه‌ها به‌جز 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 به‌صورت جداگانه در آب مقطر حل شد و به‌صورت خوراکی (گاواژ) به موش‌ها داده شد.

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

برای ایجاد دیابت از دآوری استرپتوزوتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت (۵۰ mg/kg) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ با یک‌بار تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. اثبات دیابتی بودن قند خون رت‌ها ۷۲ 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 گلوکز 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 کلروفورم بی‌هوش شده پس از تشریح، مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع حاوی RNAlater جهت اندازه‌گیری بیان ژن *Hnf-1a* ذخیره شد. برای اندازه‌گیری 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 به‌دلیل حساسیت بالا تمام لوازم مورد نیاز با محلول DEPC ۱ درصد تیمار شدند (۲۱).

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.

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

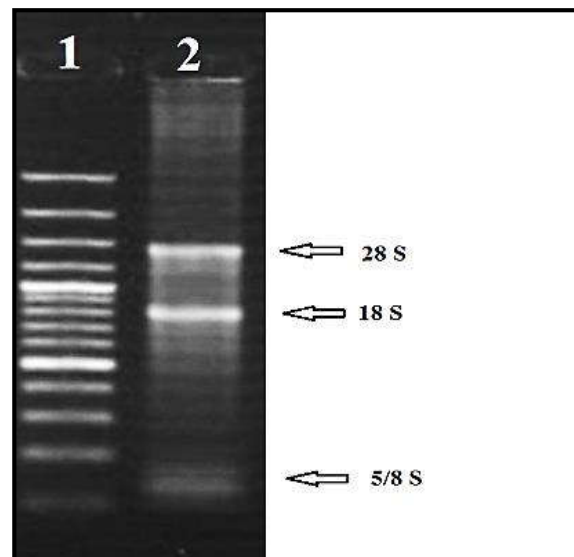
آنالیز آماری

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 تریزول 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 RNAها 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 150 mg/kg سیلی‌مارین (E)، دریافت‌کننده دوز 150 mg/kg متفورمین سیلی‌مارین (F)، دریافت‌کننده دوز 150 mg/kg سیلی‌مارین (G) است.

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

نتایج گروه سالم شاهد و کنترل منفی (شاهد دیابتی)

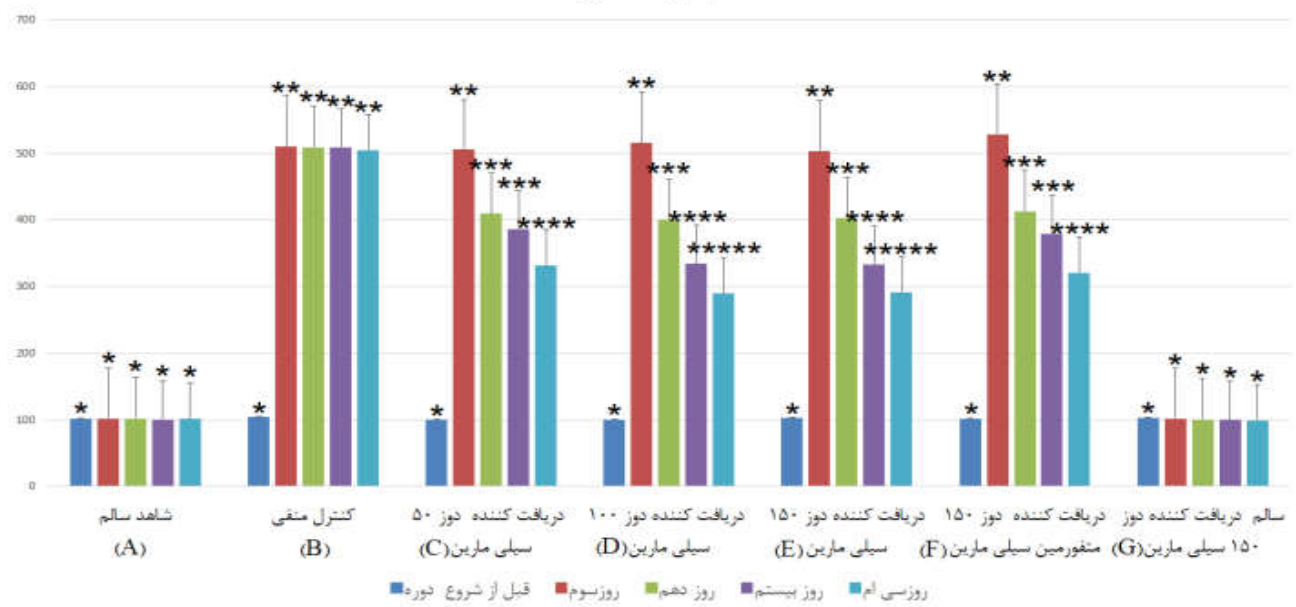
در این دو گروه مشخص شد که بیان ژن در گروه شاهد سالم بالا بوده و در گروه شاهد دیابتی افت شدیدی داشت و دارای اختلاف معنی‌دار است. ($P\text{-Value} < 0.05$). در جدول (۳) میانگین و انحراف معیار دو گروه سالم و شاهد دیابتی آورده شده است.

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

گروه‌ها	میانگین \pm انحراف معیار
شاهد سالم	110007 ± 0539^a
شاهد دیابتی	01174 ± 0072^b

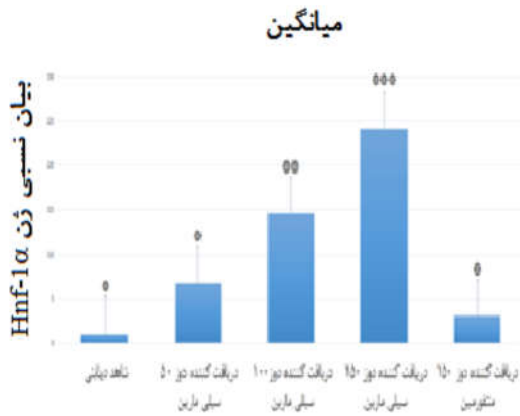
بررسی دو گروه شاهد دیابتی و سالم نشان داد که اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار است $P\text{-Value} = 0.02$ که در نمودار ۲ نشان داده شده است.

میانگین قند خون



نمودار ۱- تغییرهای قند خون رت‌ها

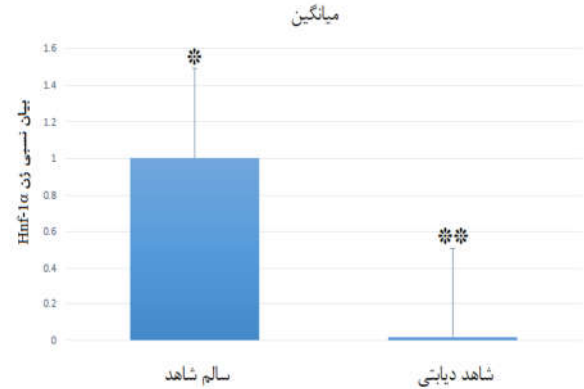
*تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. ($P\text{-Value} < 0.05$)



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 سیلی مارین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیش‌ترین تأثیر را داشته است. گروه‌های دریافت کننده سیلی مارین بیش‌ترین تأثیر را بر بیان ژن دارند و می‌توان گفت نسبت به داروی متفورمین که برای کنترل دیابت در بیماران استفاده می‌شود تأثیر سیلی مارین 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 سیلی مارین 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 سیلی مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ سیلی مارین، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی مارین، بیش‌ترین بیان را داشته‌اند؛ اما میزان بیان گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین و دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی مارین نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی اختلاف معنی‌دار نداشت ($P\text{-Value} > 0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت داروی سیلی مارین عملکرد بهتری نسبت به متفورمین داشته است.

گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی مارین و دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی مارین نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی و گروه‌های دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین و هم-چنین دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی مارین دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ هم‌چنین گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی مارین نسبت گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی مارین 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 ($P < 0.05$ Value < ۳ که در نمودار ۳ نشان داده شده است.

جدول ۴- نتایج بررسی گروه‌های تیمار

گروه	میانگین \pm انحراف معیار
شاهد دیابتی	0.4229 ± 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.

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 به‌عنوان دوز مؤثر معرفی می‌گردد ($P\text{-Value} < 0/05$) و باتوجه به این‌که 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 بدین‌صورت است که یک سوم بیماران با رژیم غذایی، یک سوم با قرص و یک سوم آخر با انسولین درمان می‌شوند. در این گروه عوارض میکروواسکولار بیش‌تر گزارش شده است. Valenzuela و همکاران در سال ۱۹۹۴ دریافتند که سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای 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 گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۲۴). در سال ۱۹۷۶ Stockinger و همکاران دریافتند که سیلی‌مارین و سیلی‌بنین به‌عنوان مواد محافظتی سیتوپلاسمی عمل می‌کنند (۲۵). Soto و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادند سیلی‌مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود و افزایش گلوکاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استرپتوزوتوسین می‌شود (۲۶). Hunt و همکاران در سال ۱۹۹۹ دریافتند که در حالت‌های هیپرگلیسمی رادیکال‌های آزاد افزایش قابل‌توجهی می‌یابند علاوه‌بر این، گلوکز به‌همراه فلزات اکسید می‌شود و تولید رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و کیت‌آلدئیدهای 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 گلوکاتیون 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 نسبت‌به همه دوزهای تیمار سیلی‌مارین و این دوز اثردهی بهتری نسبت‌به سایر دوزهای مورد استفاده داشته است که نشان‌دهنده وابسته‌به دوز بودن داروی سیلی‌مارین است. علی‌رغم این یافته‌ها، نیاز به انجام تحقیقات بیش‌تری است.

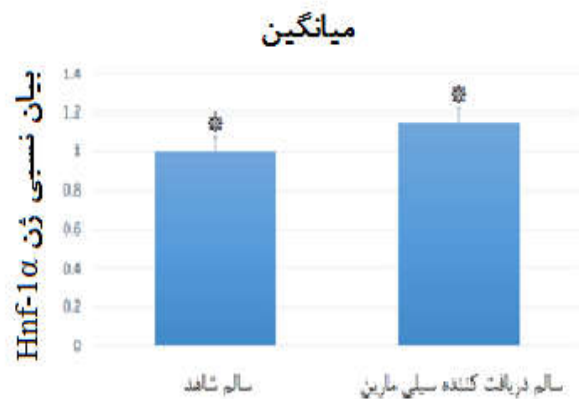
نتایج بررسی گروه سالم شاهد و گروه سالم دریافت کننده سیلی‌مارین

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 مشاهده 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

میانگین \pm انحراف معیار	گروه‌ها
$1/0007 \pm 0/0539^a$	شاهد سالم
$1/1480 \pm 0/1225^a$	سالم دریافت کننده سیلی‌مارین



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 ($P\text{-Value} > 0/05$).

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 rs1800574 و rs1169288 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 هم چنین 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. هم چنین 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 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 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-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. *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-Ezmareh 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.

