



Scan online to view this article

The Effect of Silymarin on Neuro D1 Gene Expression and Blood Glucagon Level in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Rahman Jafari hafshejani, Hosein Sazgar*, Noosha Zia Jahromi

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

Abstract

Aim and Background: Due to the high rates of diabetes in Iran and the world, as well as due to the lower side effects of medicinal plants in comparison with chemical and industrial drugs, this study investigated the effect of the active ingredient of Mary Magenta (*Silybum marianum*) on the expression of the Neuro D1 gene, one of the genes of the genes And the restoration of beta and alpha pancreatic cells is also a study of blood glucagon levels in rats.

Material and methods: 42 male Wistar rats were randomly selected and divided into seven groups of six. Diabetic rats received different doses of silymarin and metformin every other day for 1-3 days and after 40 days anesthetized with chloroform. After blood sampling, the serum glucagon level was measured by glucagon assay kit ELISA Then, the stages of the description and operation of pancreatic tissue extraction and extraction of RNA and cDNA were performed and expression analysis was performed using Real Time RT-PCR technique.

Results: The results of this study showed that STZ causes the destruction of pancreatic tissue and type 1 diabetes. Application of Silymarin improved diabetes and decreased glucose levels and increased serum glucagon levels in rats receiving different doses of silymarin compared to the control group (diabetic). Also, the expression level of NeuroD1 gene increased significantly compared to the GAPDH gene (reference gene).

Conclusion: The expression of NeuroD1 gene in STZ-induced diabetic rats showed a significant increase (P-Value = 0.000), which resulted in improved pancreatic tissue and decreased blood glucose and increased rats and muscle mass by regenerating cells The pancreatic alpha, as well as the binding to the promoter of the glucagon gene, enhance the expression of this gene.

Keywords: Type 1 diabetes, Streptozotocin, Glucagon, Silymarin, NeuroD1 gene.

 Corresponding author:

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

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

تأثیر سیلیمارین بر بیان ژن Neuro D1 و بررسی سطح

گلوکاگون خون در رت‌های دیابتی شده با استرپتوپتوز و توسمین

رحمان جعفری هفچانی، حسین سازگار^{*}، نوش آضیاء جهرمی

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

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به آمار بالای دیابت در ایران و جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی و صنعتی در این مطالعه به بررسی اثر ماده مؤثره گیاه خار مریم (سیلیمارین) بر بیان ژن Neuro D1 که یکی از ژن‌های تکوین و بازسازی سلول‌های بتا و آلفا پانکراس هست همچنین بررسی سطح گلوکاگون خون در رت‌ها، پرداختیم.

مواد و روش‌ها: ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار به صورت تصادفی انتخاب شدند و به هفت گروه شش تایی تقسیم شدند. رت‌های دیابتی شده دوزهای مختلف سیلیمارین و متوفورمین را هر سه روز یکبار دریافت کردند و بعد از ۴۰ روز با کلروفوم بی‌هوش کرده بعد از خون‌گیری از قلب رت‌ها سطح سرمی گلوکاگون توسط کیت سنجش گلوکاگون به روش الیزا اندازه‌گیری شد و سپس مراحل تشریح و عمل برداشت بافت پانکراس و مراحل استخراج RNA و cDNA و بررسی بیان ژن با تکنیک Real-Time PCR انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد STZ باعث تخریب بافت پانکراس و ایجاد دیابت نوع یک می‌شود. کاربرد سیلیمارین باعث بهبود دیابت و کاهش قند خون و افزایش سطح سرمی گلوکاگون در رت‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف سیلیمارین نسبت به گروه کنترل منفی (دیابتی) شد. همچنین میزان بیان ژن NeuroD1 نسبت به ژن GAPDH (ژن رفرنس) افزایش معنی‌داری پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: بیان ژن NeuroD1 در رت‌های دیابتی شده با STZ به واسطه سیلیمارین، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P\text{-Value} = 0.0000$) که نتیجه آن بهبود بافت پانکراس و کاهش قند خون و افزایش وزن رت‌ها و سیلیمارین با بازسازی سلول‌های آلفای پانکراس و همچنین با اتصال به پروموتور ژن گلوکاگون باعث افزایش بیان این ژن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیابت نوع یک، استرپتوپتوز و توسمین، گلوکاگون، سیلیمارین، ژن NeuroD1

دیابت قندی سندرمی است که در آن متابولیسم کربوهیدرات،

مقدمه

چربی، و پروتئین‌ها مختلط می‌شود (۱). این بیماری به دلیل

نویسنده مسئول:

فقدان ترشح انسولین یا کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین

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

ایجاد می‌شود شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشم-

پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com

گیری داشته است و تخمین زده‌اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۸

از ۴۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۲). دیابت دارای دو نوع عمده

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۱

خوزستان و آذربایجان رویش دارد عصاره دانه خار مریم حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلانوئیدی است که در مجموع به نام سیلیمارین می‌گویند (۱۳). فلانوئیدها از ترکیب‌های بسیار مهم اکثر گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه‌ها هستند، فلانوئیدها از قبیل کوئرستین موجب ترشح انسولین و مهارکننده قوی تجمع سوربیتول در بافت‌های بدن است (۱۴). سیلیمارین خواص مختلفی از جمله: محافظت از کبد، فعالیت آنتیاکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطان و همچنین ضد دیابت دارد سیلیمارین به خاطر اثرهای آنتیاکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده انسولین جلوگیری و سبب بیهود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود (۱۵، ۱۶).

باتوجه به آمار بالای دیابت در ایران و جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی و صنعتی در این مطالعه به بررسی اثر ماده مؤثره گیاه خار مریم (سیلیمارین) بر بیان ژن Neuro D1 که یکی از ژن‌های تکوین و بازسازی سلول‌های بتا و آلفا پانکراس هست همچنین بررسی سطح گلوكاگون خون در رتها، پرداختیم.

روش بررسی

تعداد ۴۲ سرت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۲۰ که از شرکت دانته شهرکرد خریداری و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی کامل به آب و غذای استاندارد در لانه حیوانات دانشگاه آزاد شهرکرد نگهداری شدند.

گروه‌بندی حیوانات

رتها به صورت تصادفی به ۷ گروه ۶ تایی دسته‌بندی و در قفس‌های مجرزا نگهداری شدند و آب و غذا برای همه یکسان بود و همچنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه ۲۲-۲۵ و رطوبت‌نسبی ۵۰ درصد حفظ شد.

۷ گروه آزمایشی شامل:

است. دیابت نوع I، که دیابت قندی وابسته به انسولین نیز نامیده شده، بهدلیل فقدان ترشح انسولین ایجاد می‌شود (۳). دیابت نوع II، که دیابت قندی غیر وابسته به انسولین نامیده می‌شود (۴).

پانکراس از نظر آناتومیک غده طویلی است که در زیر و موازی با معده قرار گرفته و بیشتر ساختار درونی آن، شبیه غده بزاقی است و از غدد ضمیمه دستگاه گوارشی است (۶، ۵). پانکراس به میزان زیادی در تنظیم متابولیسم مواد مغذی در گیر است. اهمیت پانکراس در موازنده مواد مغذی در کل بدن به‌وسیله این حقیقت مشخص شده است که در شرایط پاتولوژیک مختلف مثل دیابت نوع یک و دو، که در گیر در متابولیسم مواد مغذی‌اند، به عدم تنظیم سلول‌های پانکراس مربوط هستند (۷، ۸). فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول‌ها به سلول‌های بتا در پانکراس اثر می‌گذارند. از جمله این فاکتورها می‌توان به Neuro D1، MafA، Pax6، Pax4 و Neuro D1 اشاره کرد (۹). ژن Neuro D1 که بر روی بازوی بلند کروموزم شماره ۲ واقع شده است (۳۹۲۴)، دارای وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون است. این ژن در ترشح گلوكاگون، انسولین و سوماتوتاستاتین نقش دارد بیان ژن Neuro D1 در سلول‌های اندوکرین پانکراس و دیگر بافت‌های غیر پانکراتیک مثل روده و مغز یافت می‌شود عملکرد ژن Neuro D1، رونویسی ژن انسولین و پیش‌بردن بیشتر تمایز به سمت سلول‌های islet عملکردی است. وجود ژن Neuro D1 در سلول‌های بیان کننده گلوكاگون نشان می‌دهد که سرکوب فعالیت گلوكاگون با این ژن ارتباطی دارد. در حقیقت طبق گزارش‌های اخیر، ژن Neuro D1 سبب فعل شدن پرموموتور گلوكاگون می‌شود (۱۰-۱۲) داورهای گیاهی نسبت به داورهای شیمیایی دارای سمتی کمتر و اثرهای جانبی کمتر هستند 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: خار مریم، خیار تلخ، شنبلیله، هستند (۱) گیاه خار مریم از خانواده کاسنیان است. این گیاه بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران به خصوص البرز مرکزی،

مراحل انجام تکنیک Real-Time PCR

استخراج RNA با استفاده از روش تراپیزول ساخت شرکت کیان انجام گردید. لازم به ذکر است که RNA پس از استخراج دستخوش تغییرهایی خواهد شد و برای رفع این مشکل بالافاصله پس از برداشت باید در مجاورت محلول ثبیت کننده (RNA later) قرار گیرد و همچنین بهدلیل حساسیت بالا تمام لوازم مورد نیاز با محلول DEPC ۱ درصد تیمار شدند (۱۷). در سلول‌ها برای لیز و هموژنیزه کردن بافت پانکراس مقداری ازت مایع بروی بافت ریخته شد و سپس یک سی‌سی تراپیزول اضافه گردید و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، به سه فاز مجزا تقسیم می‌شود که فاز رویی را به اپندروفهای جدید منتقل شده، و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوفروپانول سرد به آن اضافه شد و مواد داخل به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و سپس فاز روی به آرامی خارج شده و رسوب RNA حاصل با اتانول ۷۵ درصد سرد شستشو داده شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ رسوب باقی‌مانده در ۲۰ میکرولیتر آب حل شده و برای استفاده‌های بعدی در دمای -۷۰ نگهداری شد. برای از بین بردن آلدگی ژنومی از کیت آنزیم DNase (شرکت Thermo) مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد.

پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن آن و هم‌چنین میزان خلوص و عدم آلدگی ژنومی آن از نظر کیفی بالولد کردن روی ژل آگاروز ۲ درصد و هم از نظر کمی به وسیله دستگاه نانو درآپ میزان خلوص (OD) آن اندازه‌گیری شد. همه غلظت‌های RNA‌ها بیشتر از $9000\text{ ng}/\mu\text{l}$ بود.

سپس مقداری از RNA برای ساخت cDNA استفاده شد به این منظور از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا-ژاپن مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد.

- ۱ گروه A: شاهد سالم
- ۲ گروه B: کنترل منفی
- ۳ گروه C: دیابتی دریافت کننده دوز ۵۰۰ میکروگرم
- ۴ گروه D: دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰۰ میکروگرم
- ۵ گروه E: دیابتی دریافت کننده دوز ۱۵۰۰ میکروگرم
- ۶ گروه F: دیابتی دریافت کننده متفورمین
- ۷ گروه G: شاهد سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰۰ میکروگرم

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

برای دیابتی کردن رت‌ها از استرپتوزوتوسین (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ براساس وزن شان، غلظت ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم (۵۰ mg/kg) به صورت تک دوز درون صفاقی تزریق گردید. حیواناتی که پس از سه روز از تزریق STZ قند خون بالای ۲۵۰ میکروگرم بر دسی‌لیتر داشتند دیابتی تلقی شدند. سنجش قند خون همه گروه‌ها هر ده روز یک مرتبه با رعایت ۱۴ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت گردید.

پس از گذشت سه روز از تزریق استرپتوزوتوسین، گروه‌های دریافت کننده میکروگرم و همچنین گروه دیابتی دریافت کننده متفورمین هر سه روز یک بار (۱۰ مرتبه) در طول یک ماه، ماده مؤثره و متفورمین را از طریق گواژ کردن دریافتند.

پس از گذشت ۳۰ روز، حیوانات با کلروفوم بی‌هوش و بعد از خون گیری از قلب برای بررسی میزان گلوکاگون به روش الایزا که از کیت گلوکاگون با مارک EASTBIOPHARM ساخت کشور آمریکا استفاده شد طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت، تشريح مقداری از بافت پانکراس به نسبت ۱ به ۴ در مایع RNA later جهت اندازه‌گیری بیان زن Neuro D1 ذخیره شد. برای اندازه‌گیری بیان زن مورد بررسی در پژوهش حاضر از روش Real Time RT PCR استفاده شد.



پرایمرهای انتخابی این ژن هاساخت شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی بودند. الگوی پرایمرها مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آمده است.

برای تعیین میزان بیان ژن Neuro D1 از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل (فرنس) استفاده شد.

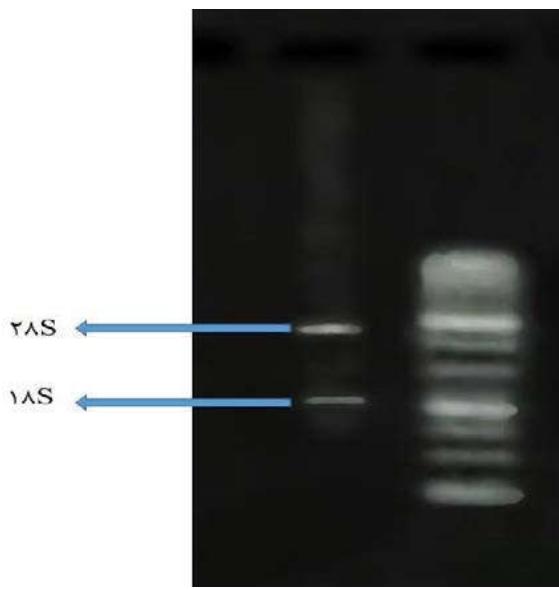
جدول ۱- توالی ژن Neuro D1

GAPDH R	5'-TCCATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'
GAPDH F	5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAACGGAT-3'
Neuro D1 R	5'-TTTGGTCATGTTCCACTTCC-3'
Neuro D1 F	5'-CGCAGAAGGCAAGGTGTC-3'

آنالیز آماری داده های این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ انجام شد. از آنجا که داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون پشتیبان post test LSD ارزیابی شدند و نتایج به صورت Mean \pm SEM ارائه و تفاوت بین گروه های مختلف با $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

بررسی کیفی RNA استخراج شده در شکل ۱ RNA استخراج شده بر روی ژل دو درصد نشان داده شده است.



شکل ۱- RNA تام سلولی الکتروفورز شده در ژل آگارز ۲ درصد

سپس به وسیله سیستم Rotor-Gene6000 و با استفاده از کیت سابرمستر ریل تایم ساخت شرکت تاکارا ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورد استفاده در دستگاه Rotor-Gene6000 در روش Real-Time PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است. CT های مربوط به واکنش توسط نرم افزار سیستم Real-Time PCR استخراج و ثبت گردید. بعد از اتمام واکنش Real-Time PCR سیکل آستانه هر نمونه به صورت جداگانه به دست آمده شد که با مقایسه سیکل آستانه ژن مورد نظر با ژن مرجع (GAPDH)، می توان fold میزان بیان ژن موردنظر را به صورت کمی از فرمول change = $2^{-\Delta\Delta ct}$ به دست آورد و میزان بیان ژن NeuroD1 را در هفت گروه مختلف اندازه گیری شد.

جدول ۲- پروتکل دمایی برای ژن

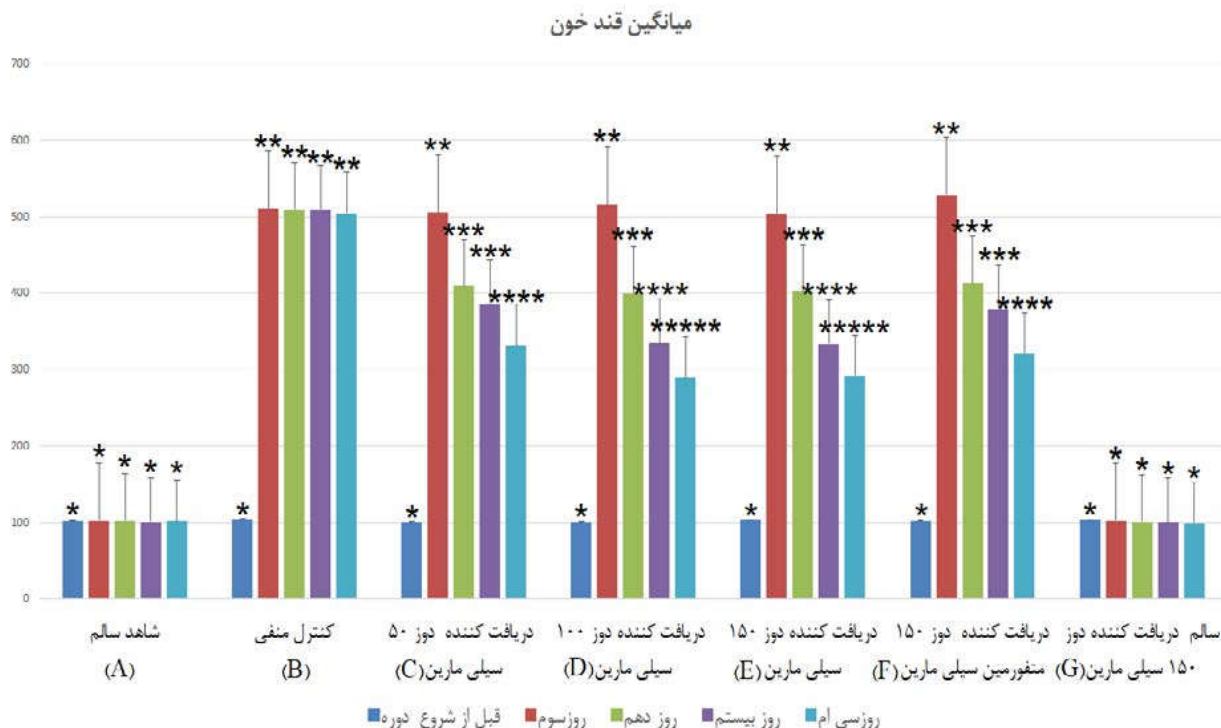
۱ سیکل	۹۴°C	۵ دقیقه	Initial denaturation step
۴۰ سیکل	۹۴°C	۱۵ ثانیه	Denaturation
	۶۱°C	۲۰ ثانیه	Annealing
	۷۲°C	۲۰ ثانیه	Extension

تجزیه و تحلیل آماری

بار قند خون ناشتا 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.

تغییرهای قند خون رت‌ها

در ابتدا تغییرهای قند خون در گروه‌های مورد مطالعه را مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری قند خون هر ۱۰ روز یک



نمودار ۱- تغییرهای قند خون رت‌ها

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

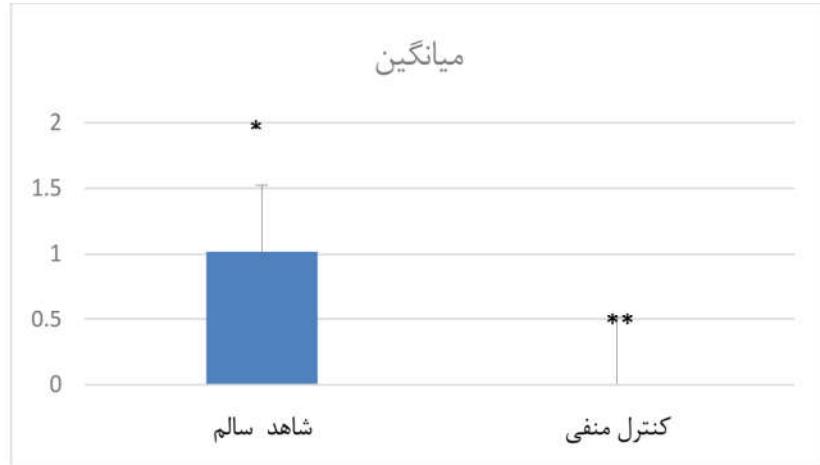
دریافت کننده سیلی‌مارین (G) تغییر معناداری مشاهده نشد. (P-Value > 0.05)

نتایج Real-Time PCR

نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن Neuro D1 در گروه‌ها A و B

بررسی میزان بیان ژن Neuro D1 در گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی به عنوان کنترل منفی (B) نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن Neuro D1 در رت‌های دیابتی و سالم دارای اختلاف معناداری است. (P-Value = 0.000)

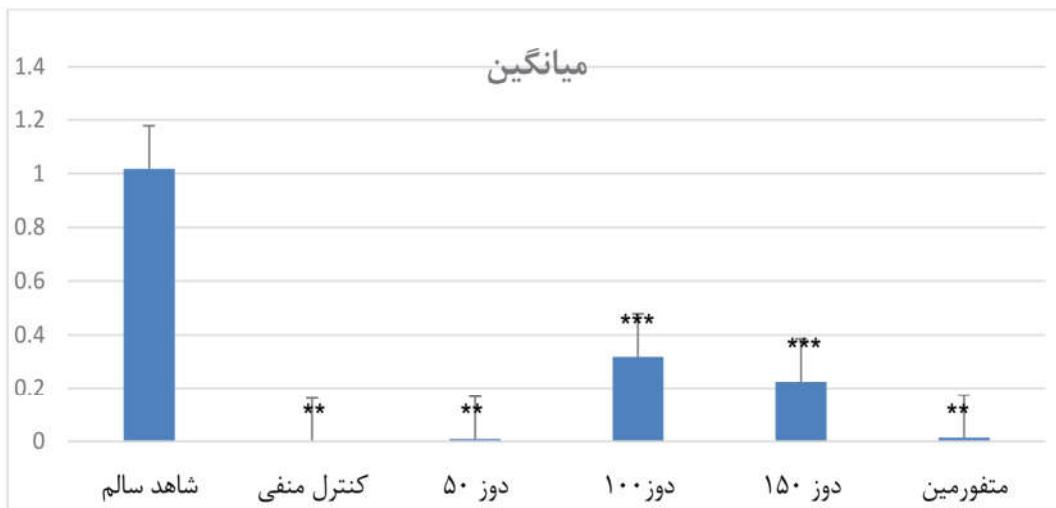
میزان قند خون با تزریق استریپتوزوتوسین بهشت افزایش یافت؛ اما پس از آن با دریافت سیلی‌مارین در طول مدت درمان همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان قند خون در هر گروه با توجه به میزان دوز دریافتی سیلی‌مارین تغییر یافت. تغییرهای قند خون در گروه‌های تحت درمان (سیلی‌مارین و متفورمین)، گروه شاهد دیابتی (B) و گروه شاهد سالم (A) در طول دوره تیمار نسبت به هم تغییرهای معنی‌دار داشته و بیشترین تغییرها در گروه‌های دریافت کننده دوز mg/kg ۱۵۰ (D) و ۱۰۰ mg/kg (E) نسبت به سایر گروه‌های تیمار است و تمامی گروه‌ها در انتهای دوره درمان تغییرهای معناداری نسبت به شروع دوره دیابتی شدن داشتند (P<0.05). ولی بین گروه شاهد سالم (A) و گروه سالم



نمودار ۲- بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه شاهد سالم و کنترل منفی

بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروههای (A-F) در نمودار ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروههای A-F



نمودار ۳- بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروههای (A-F)

* وجود تعداد ستاره های متفاوت نشان دهنده وجود گروههای معنی دار است.

دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه سالم شاهد (A) نتایج معنی دار است.

میزان بیان این ژن به ترتیب گروه دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلیمارین (C)، گروه دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg

با توجه به نتایج به دست آمده بیان ژن NeuroD1 قبل از ایجاد دیابت در همه گروهها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروههای بیمار بهشدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلیمارین و متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جریان شده است. همچنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد

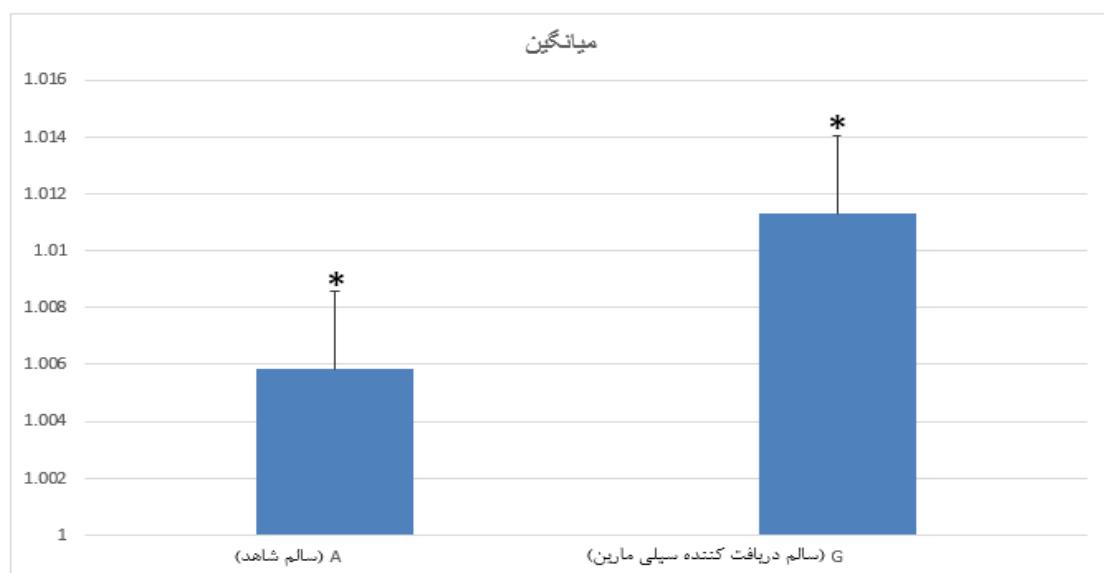
شاهد سالم معنی دار نبود. ($P\text{-Value} > 0.05$). همچنین گروه دریافت کننده دوزهای 100 mg/kg سیلیمارین (D) اثردهی بهتری نسبت به دوز 150 mg/kg (E) داشته است که نشان دهنده عدم وابسته به دوز بودن اثردهی سیلیمارین است. به احتمال دوز 150 mg/kg بهدلیل غلظت بالای آن توسط موش بیشتر دفع شده است علی‌رغم این یافته‌ها، نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است.

نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های A و G

بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های شاهد سالم (A) و سالم دریافت کننده سیلیمارین (G) در نمودار ۴ نشان داده شده است.

متغورمین (F)، گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلی- مارین (E)، دریافت کننده دوز 100 mg/kg (D)، بیشترین بیان را داشته‌اند؛ اما میزان بیان گروه‌های D و E نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین (C) و گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg (F) معنی دار نبود. ($P\text{-Value} < 0.05$)؛ اما میزان بیان در گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت کننده دوز 50 mg/kg سیلیمارین (C) و گروه دریافت کننده دوز 150 mg/kg متغورمین (F) معنی دار نبود. ($P\text{-Value} > 0.05$)

دوز 100 mg/kg داروی سیلیمارین تأثیر بسزایی نسبت به همه دوزهای تیمار سیلیمارین و همچنین داروی متغورمین در بیان ژن NeuroD1 داشته است و اختلاف آن با گروه

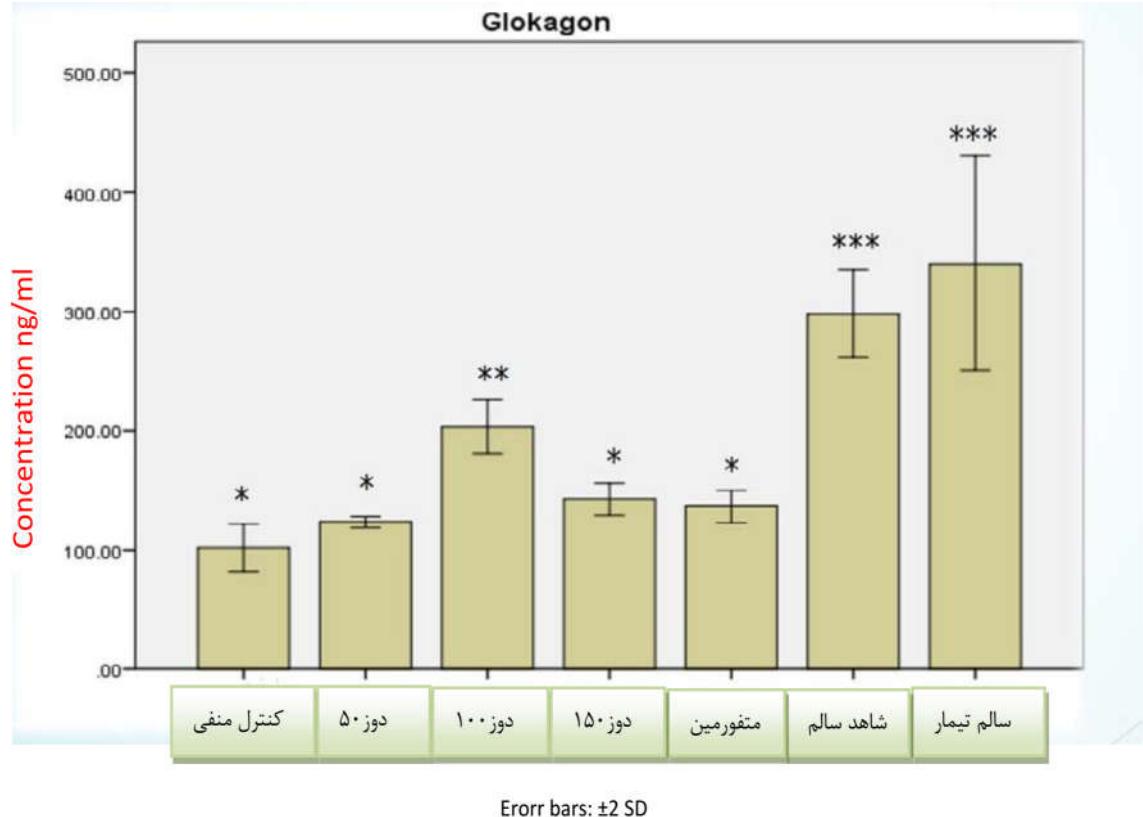


نمودار ۴ - بررسی میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه‌های A و G

میانگین مقادیر پلاسمایی گلوکاگون بر حسب نانوگرم/میلی‌لیتر بود و با سطح معنی داری ($p < 0.1$) گزارش شد. آنالیز آماری داده‌ها در گلوکاگون نشان داد که دوز 100 mg/kg سالم و تیمار با کنترل منفی ارتباط معنی داری دارد، رت‌های دریافت کننده دوز 50 mg/kg و متغورمین، 150 mg/kg ارتباط معنی داری با کنترل منفی ندارد (نمودار ۵).

این نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NeuroD1 در گروه سالم دریافت کننده دوز 150 mg/kg سیلیمارین (G) نسبت به گروه سالم شاهد (A) کمی افزایش یافته ولی این افزایش میزان معنی دار نبود ($P\text{-Value} = 0.946$).

نتایج کلی سنجش مقادیر گلوکاگون



نمودار ۵- تغییرها در سطوح پلاسمایی گلوکاگون در رت‌ها

* وجود تعداد ستاره‌های متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است ($P-Value < 0.05$).

انسولین جلوگیری و سبب بهبود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود. در تأیید این نظریه، مطالعات تجربی و کلینیکی متعدد نشان داده‌اند ترکیب‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان دارای اثرهای مطلوبی بر روی اختلال‌های متابولیکی ناشی از افزایش قند خون دارند. گیاه خار مریم باعث افزایش عملکرد آنزیم‌های دفع کننده رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود. این آنزیم‌ها شامل سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالازها است (۱۸، ۱۹).

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیدانتیو به اثبات رسیده است (۲۰). پیش‌تر نشان داده شده است که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسمایی و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۲۱-۲۳). علاوه‌بر این مکانیسم‌های محافظت کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از

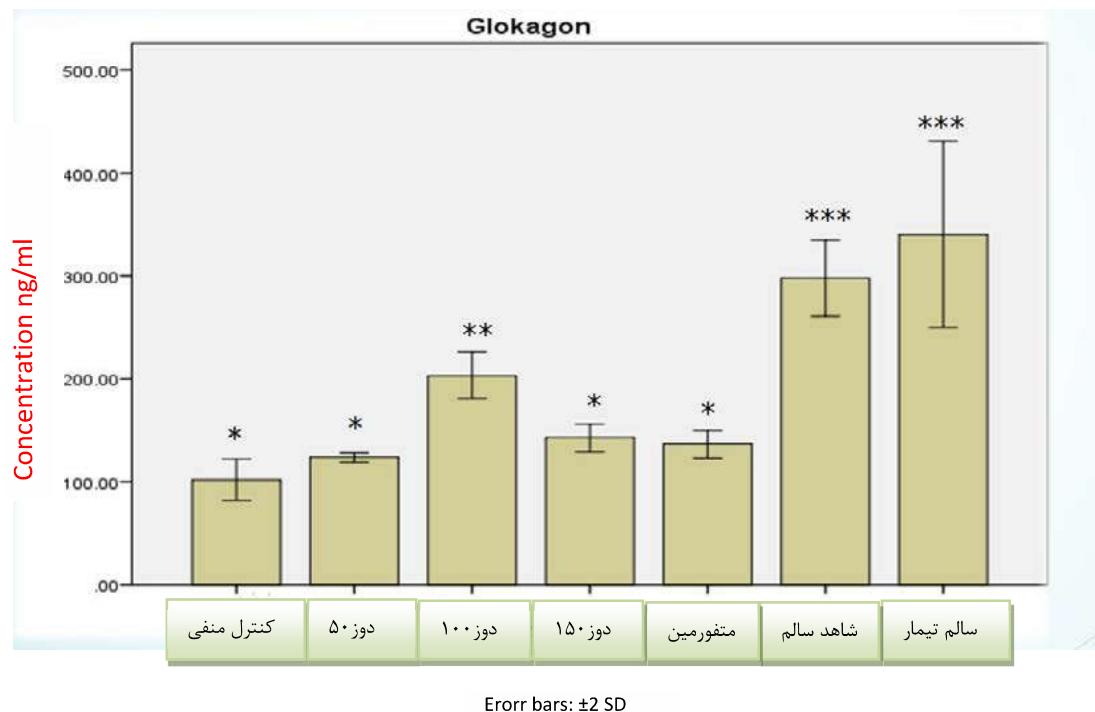
بحث

علت اصلی دیابت آن است که در بدن یا انسولین ساخته نمی‌شود و یا این که مقدار آن به قدری ناچیز است که نیازهای بدن را برآورده نمی‌سازد. در دیابت نوع I سلول‌های بتا پانکراس که انسولین ترشح می‌کنند تخریب شده. در نتیجه انسولین ساخته نمی‌شود و در جریان خون وجود ندارد یا مقدار آن بسیار کم است در حال حاضر بیماران مبتلا به دیابت نوع یک با تزریق روزانه انسولین، قند خود را کنترل می‌کند (۱۶).

که در این مطالعه از عصاره دانه خار مریم که حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلاونوئیدی است که در مجموع به آن سیلی‌مارین می‌گویند که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است، استفاده شد. سیلی‌مارین به خاطر اثرهای آنتی‌اکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده

پانکراس موش و تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های آلفا و پس از آن به سلول‌های بتا به این نتیجه رسیدند که بیان نابجا و بیش از حد ژن Pax4 بر پانکراس در حال تکوین موش‌های تاریخته منجر به پیدایش جزایر لانگرهانس بزرگ می‌شود که این جزایر به طور عمده از سلول‌های بتا تشکیل شده‌اند (۳۰). این نتایج نشان دهنده این است که بیان این ژن باعث افزایش سلول‌های بتا و آلفا می‌شود که نتایج به دست آمده از الایزا ما هم گویای این نتیجه است. Soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی‌مارین در بیان ژن Pdx-1 و گسترش سلول‌های بتای پانکراس در یک مدل پانکراتومی که توسط Soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ممکن است سیلی‌مارین تکثیر سلول‌های تولیدکننده انسولین را افزایش گویایی تأثیر سیلی‌مارین بر بهبود سلول‌های تخربی شده بافت پانکراس و همچنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رتها و کاهش قند خون افزایش گلوكاگون خون در رتهاي تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. از سوی دیگر Mafa و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی نقش collombat ژن-1 PDX-1 و Neuro D1 به طور قابل توجهی باعث بیوسنتز انسولین می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که این ژن‌ها نقش بسیار مهمی در سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس دارند و می‌توانند یک هدف درمانی جدید برای دیابت باشد (۳۰). با توجه به نتایج به دست آمده بیان ژن NeuroD1 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 ژن در گروه شاهد دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه سالم شاهد (A) نتایج معنی‌دار است. در نهایت Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی تأثیر

وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که سیلی‌مارین از طریق تحریک پلی‌مراز I و رونویسی rRNA سنتر RNA ریبوزومی (rRNA) را افزایش می‌دهد (۲۴-۲۶). Saitoh و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی سلول‌ها بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز به این نتیجه رسیدند که بیان همزمان PDX-1 و Neurod-1 منجر به تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز می‌شود (۲۷). Valenzuela و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی‌مارین که یک آنتی-اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد همچنین گلوتاپتیون را کاهش می‌دهد (۲۸). Soto و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادن سیلی‌مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود: و افزایش گلوتاپتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتان رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استریپتوزوتوسین می‌شود (۱۶). سلول‌های انسولین ساز با بیان مداوم این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی توسط Blysyczuk و همکاران تولید شدند. آن‌ها تلاش کردند تا نشان دهنند با استفاده از روش ساده ترانسفکشن ژن Pax4 می‌توان سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز داد. در این روش آن‌ها ابتدا اجسام جنینی را از سلول‌های بنیادی جنین به وجود آورده و سپس از اجسام جنینی به وجود آمده سلول‌های منفرد را برای ترانسفکت ژن Pax4 جداسازی کردند. سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکت شده بعد از چهار روز به سلول‌های ترشح کننده انسولین تمایز یافتند. در طی این مدتی که اجسام شبه جنینی به صورت قطره‌های آویزان هستند ژن‌های مخصوص آندودرم در آن‌ها بیان می‌شوند (۲۹). در تحقیق ما هم بیان ژن Pax4 به وسیله داروی سیلی‌مارین افزایش یافته که این نتایج بیانگر است که سیلی‌مارین باعث ترمیم و افزایش سلول‌های جزایر به واسطه پیش‌سازهای آن‌ها می‌شود. collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مقاله‌ای تحت عنوان بیان بیش از حد ژن Pax4 در



نمودار ۵- تغییرها در سطوح پلاسمایی گلوکاگون در رت‌ها

* وجود تعداد ستاره‌های متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است ($P\text{-Value} < 0.05$).

انسولین جلوگیری و سبب بهبود بافت آسیب دیده پانکراس می‌شود. در تأیید این نظریه، مطالعات تجربی و کلینیکی متعدد نشان داده‌اند ترکیب‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان دارای اثرهای مطلوبی بر روی اختلال‌های متابولیکی ناشی از افزایش قند خون دارند. گیاه خار مریم باعث افزایش عملکرد آنزیم‌های دفع کننده رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود. این آنزیم‌ها شامل سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالازها است (۱۸، ۱۹).

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی است که اثرهای محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۰). پیش‌تر نشان داده شده است که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۲۱-۲۳). علاوه‌بر این مکانیسم‌های محافظت کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از

بحث

علت اصلی دیابت آن است که در بدن یا انسولین ساخته نمی‌شود و یا این که مقدار آن به قدری ناچیز است که نیازهای بدن را برآورده نمی‌سازد. در دیابت نوع I سلول‌های بتا پانکراس که انسولین ترشح می‌کنند تخریب شده. در نتیجه انسولین ساخته نمی‌شود و در جریان خون وجود ندارد یا مقدار آن بسیار کم است در حال حاضر بیماران مبتلا به دیابت نوع یک با تزریق روزانه انسولین، قند خود را کنترل می‌کند (۱۶).

که در این مطالعه از عصاره دانه خار مریم که حاوی ترکیب‌های شیمیایی متعدد شامل چندین لیگنان فلاونوئیدی است که در مجموع به آن سیلی‌مارین می‌گویند که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است، استفاده شد. سیلی‌مارین به خاطر اثرهای آنتی‌اکسیدانی از تخریب سلول‌های سازنده

پانکراس موش و تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های آلفا و پس از آن به سلول‌های بتا به این نتیجه رسیدند که بیان نابجا و بیش از حد ژن Pax4 بر پانکراس در حال تکوین موش‌های تاریخته منجر به پیدایش جزایر لانگرهانس بزرگ می‌شود که این جزایر به طور عمدۀ از سلول‌های بتا تشکیل شده‌اند (۳۰). این نتایج نشان دهنده این است که بیان این ژن باعث افزایش سلول‌های بتا و آلفا می‌شود که نتایج به دست آمده از الیزا ما هم‌گویای این نتیجه است. soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی‌مارین در بیان ژن Pdx-1 و گسترش سلول‌های بتای پانکراس در یک مدل پانکراتومی که توسط soto و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ممکن است سیلی‌مارین تکثیر سلول‌های تولیدکننده انسولین را افزایش دهد (۳۱). نتایج به دست آمده از این تحقیق گویایی تأثیر سیلی‌مارین بر بهبود سلول‌های تخریب شده بافت پانکراس و همچنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رتها و کاهش قند خون افزایش گلوکاگون خون در رتهاي تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. از سوی دیگر Mafa و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی نقش collombat در سلول‌های بتا پانکراس دریافتند که بیان ژن Mafa همراه با ژن PDX-1 و Neuro D1 به طور قابل توجهی باعث بیوسنتز انسولین می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که این ژن‌ها نقش بسیار مهمی در سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس دارند و می‌توانند یک هدف درمانی جدید برای دیابت باشد (۳۰). با توجه به نتایج به دست آمده بیان ژن NeuroD1 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 ژن در گروه شاهد دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار افت پیدا کرده و نسبت به گروه سالم شاهد (A) نتایج معنی‌دار است. در نهایت zhaو و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی تأثیر

واقعی مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که سیلی‌مارین از طریق تحریک پلی‌مراز I و رونویسی rRNA سنتز RNA ریبوزومی (rRNA) را افزایش می‌دهد (۲۶-۲۴). saitoh و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی سلول‌ها بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سلول‌های انسولین‌ساز به این نتیجه رسیدند که بیان همزمان PDX-1 و Neurod-1 منجر به تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز می‌شود (۲۷). valenzuela و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی‌مارین که یک آنتی-اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود و اثرهای دفاعی زیادی برای بدن دارد همچنین گلوکوتاتیون را کاهش می‌دهد (۲۸). soto و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادن سیلی‌مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود: و افزایش گلوکوتاتیون پراکسیداز، سوبر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استریپتوزوتوسین می‌شود (۱۶). سلول‌های انسولین ساز با بیان مداوم این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی توسط Blysyczuk و همکاران تولید شدند. آن‌ها تلاش کردند تا نشان دهند با استفاده از روش ساده ترانسفکشن ژن Pax4 می‌توان سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز داد. در این روش آن‌ها ابتدا اجسام جنینی را از سلول‌های بنیادی جنین به وجود آوردند و سپس از اجسام جنینی به وجود آمده سلول‌های منفرد را برای ترانسفکت ژن Pax4 جداسازی کردند. سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکت شده بعد از چهار روز به سلول‌های ترشح کننده انسولین تمایز یافته‌ند. در طی این مدتی که اجسام شبه جنینی به صورت قطره‌های آویزان هستند ژن‌های مخصوص آندودرم در آن‌ها بیان می‌شوند (۲۹). در تحقیق ما هم بیان ژن Pax4 به‌وسیله داروی سیلی‌مارین افزایش یافته که این نتایج بیانگر است که سیلی‌مارین باعث ترمیم و افزایش سلول‌های جزایر به‌واسطه پیش‌سازهای آن‌ها می‌شود. collombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مقاله‌ای تحت عنوان بیان بیش از حد ژن Pax4 در

اکستانید-۴ بر بیان Neurod-1 و Glut-2 در سلول‌های تولیدکننده انسولین مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در موش به این نتیجه رسیدند که اکستانید-۴ به طور قابل توجهی رونویسی ژن Neurod1 و Glut2 را تسهیل کرد و قادر به ایجاد تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های تولیدکننده اندوکرین و انسولین شد (۳۲). نتایج پژوهش حاضر نیز حاکی از آن بود که سیلی‌مارین باعث بهبود بافت پانکراس و بیان ژن Neuro D1 در نتیجه باعث افزایش سطح گلوکاگون می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری در این تحقیق نشان داده شد که سیلی‌مارین باعث بهبود بافت پانکراس و بیان ژن Neuro D1 و در نتیجه باعث افزایش سطح گلوکاگون می‌شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق گویایی تأثیر سیلی‌مارین بر بهبود سلول‌های تخریب شده بافت پانکراس و همچنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Neuro D1 و افزایش وزن رتها و کاهش قند خون افزایش گلوکاگون خون در رتهای تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین نسبت به گروه کنترل منفی شده است. در نتیجه شواهد ارائه شده در این تحقیق حاکی از آن است که سیلی‌مارین نه تنها باعث کاهش دیابت ایجاد شده با استرپتوزتوزسین می‌شود بلکه باعث بهبودی پانکراس و بازگرداندن آن به عملکرد طبیعی اش نیز می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و 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.

منابع

1. Sobolová L, Škottová N, Večeřa R, Urbánek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharma research.* 2006;53(2):104-12.
2. Das-Munshi J, Stewart R, Ismail K, Bebbington PE, Jenkins R, Prince MJ. Diabetes, common mental disorders, and disability: findings from the UK National Psychiatric Morbidity Survey. *Psychosom med.* 2007;69(6):543-50.
3. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature.* 2007;450(7170):712.
4. Sharifirad G, Kamran A, Entezari M. The effect of diabetic diet education on FBS and BMI of patients with type II diabetes mellitus. *J Ardabil University Med Sciences.* 2007;7(4):375-80.
5. Schlachterman A, Forsmark CE. Pancreatic function testing for the early diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endo.* 2017;86(6):1056-8.
6. Hao L, Wang L-S, Liu Y, Wang T, Guo H-L, Pan J, et al. The different course of alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis: A long-term study of 2,037 patients. *PloS one.* 2018;13(6):e0198365.
7. Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardévol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2008;7(4):299-308.
8. Turrell G, Hewitt B, Patterson C, Oldenburg B, Gould T. Socioeconomic differences in food purchasing behaviour and suggested implications for diet-related health promotion. *J Human Nutrition Dietetics.* 2002;15(5):355-64.
9. Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Molecular cellular Endo.* 2001;185(1-2):99-108.
10. Zhu Y, Li Y, Dai C, Sun L, You L, De W, et al. Inhibition of Lincpint expression affects insulin secretion and apoptosis in mouse pancreatic β cells. *internati j biochem cell biology.* 2018;104171-9.
11. Meusel L-AC, Kansal N, Tchistiakova E, Yuen W, MacIntosh BJ, Greenwood CE, et al. A systematic review of type 2 diabetes mellitus and hypertension in imaging studies of cognitive aging: time to establish new norms. *Frontiers in aging neuroscience.* 2014;6148.
12. Sandovici I, Hammerle CM, Ozanne SE, Constância M. Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes. *Cell Molecular Life Sciences.* 2013;70(9):1575-95.
13. Voroneanu L, Nistor I, Dumea R, Apetrii M, Covic A. Silymarin in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J diabetes research.* 2016;2016.
14. Sakai I, Izumi S-i, Murano T, Okuwaki S, Makino T, Suzuki T. Presence of aldose reductase inhibitors in tea leaves. *Japanese J Pharmacology.* 2001;85(3):322-6.
15. Velussi M, Cernigoi AM, Dapas F, Caffau C, Zilli M. Long-term (23 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J hepatology.* 1997;26(4):871-9.

16. 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.
17. Hosseinpour Feizi M, Saed S, Babaei E, Montazeri V, Halimi M. Evaluation of Nucleostemin Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors. J Kerman Uni Med Sciences. 2012;19(2).
18. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytotherapy Research. 2010;24(10):1423-32.
19. Soto C, Raya L, Pérez J, González I, Pérez S. Silymarin induces expression of pancreatic Nkx6. 1 transcription factor and β -cells neogenesis in a pancreatectomy model. Molecules. 2014;19(4):4654-68.
20. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. Biomedical and Environmental Sciences. 2015;28(1):36-43.
21. Stolf AM, Cardoso CC, Acco A. Effects of silymarin on diabetes mellitus complications: a review. Phytotherapy research. 2017;31(3):366-74.
22. 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;101244-50.
23. Pradhan S, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Research. 2006;124(5):491-504.
24. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. Integrative cancer therapies. 2007;6(2):120-9.
25. Katiyar SK, Mantena SK, Meenan SM. Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. PloS one. 2011;6(6):e21410.
26. Lettéron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, et al. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice: evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. Biochem pharmacol. 1990;39(12):2027-34.
27. Saitoh K, Yamato E, Miyazaki S, Miyazaki J-I. Both Pdx-1 and NeuroD1 genes are requisite for the maintenance of insulin gene expression in ES-derived differentiated cells. Diabetes research clinical practice. 2007;77(3):S138-S42.
28. Valenzuela A, Aspíllaga 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. Blysaczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(3):998-1003.

۱. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells. *Cell.* 2009;138(3):449-62.
۲. Soto C, Raya L, Juárez J, Pérez J, González I. Effect of Silymarin in Pdx-1 expression and the proliferation of pancreatic β -cells in a pancreatectomy model. *Phytomedicine.* 2014;21(3):233-9.
۳. Zhao Q, Yang Y, Hu J, Shan Z, Wu Y, Lei L. Exendin-4 enhances expression of Neurod1 and Glut2 in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *Archives medical science: AMS.* 2016;12(1):199.