Archive of SID.ir

مجله دیابت و متابولیسم ایران. خرداد و تیر ۱۴۰۳؛ دوره ۲۴ (شماره ۲) ۱۲۳-۱۱۴

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن‌های سیتوکین‌های پیش‌التهابی IL-6، IL-1β و TNF-α در بافت عصب سیاتیک موش‌های صحرایی هیپرگلیسمک پس از تجویز متفورمین و گالیک اسید

فاطمه نهتانی[۱]، مرتضی بهنام رسولی*[۱]، سجاد سحاب نگاه[۲]، معصومه خیرآبادی[۱]

چکیده

مقدمه: تحت شرایط هیپرگلیسمی، فرآیندهای التهابی با آسیب به اعصاب محیطی در بروز نوروپاتی دخیل هستند. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد التهابی متفورمین (داروی سنتزی) با گالیک اسید (ترکیب طبیعی) در شرایط هیپرگلیسمی صورت گرفت.

روش‌ها: برای القای هیپرگلیسمی به موش‌های صحرایی، استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۶۰ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. برای این تحقیق موش‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. دو گروه موش‌های کنترل سالم و هیپرگلیسمی بودند که دارویی دریافت نکردند. دو گروه دیگر، موش‌های هیپرگلیسمی بودند که به‌ترتیب، متفورمین با دوز ۳۰۰ mg/kg/day و گالیک اسید با دوز ۴۰ mg/kg/day دریافت نمودند. در پایان دورهٔ ۸ هفته‌ای، موش‌ها را در تمام گروه‌ها بیهوش کرده و نمونه‌ای از عصب سیاتیک برای سنجش میزان بیان ژن‌های مربوط به سیتوکین‌های پیش التهابی IL-6، IL-1β و TNF-α، گرفته شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و مقایسهٔ بین میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey صورت گرفت.

یافته‌ها: القای شرایط هیپرگلیسمی به موش‌های صحرایی باعث افزایش بیان ژن‌های مربوط به سیتوکین‌های پیش التهابی IL-6 (P= ۰/۰۰۰)، IL-1β (P= ۰/۰۰۸) و TNF-α (P= ۰/۰۰۵) شد، اما تجویز متفورمین و گالیک اسید به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمی به‌مدت ۸ میزان بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α را کاهش داد (P< ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: گالیک اسید همانند متفورمین، با ویژگی ضد التهابی خود، می‌تواند برای بهبود عوارض ناشی از شرایط هیپرگلیسمی به‌ویژه التهاب عصبی مؤثر واقع شود و امید است در آینده برای بیماران دیابتی کاربرد بالینی داشته باشد.

واژگان کلیدی: ضد التهابی، گالیک اسید، هیپرگلیسمی، متفورمین، سیتوکین‌های پیش التهابی

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

* ***نشانی:*** مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۰۳، نمابر: ۰۵۱۳۸۷۹۶۴۱۶، پست الکترونیک: behnam@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۱/۱۰

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقدمه

دیابت یا بیماری قند یک نوع بیماری متابولیکی و مزمن با پاتوژنز پیچیده است که نشانهٔ آن قند (گلوکز) خون بالا در یک برههٔ زمانی طولانیست. در افراد مبتلا به این بیماری، سرعت و توانایی بدن در استفاده و سوخت‌وساز کامل گلوکز کاهش می‌یابد؛ از این‌رو میزان قند خون افزایش یافته که به‌آن هیپرگلیسمی می‌گویند [۱]. نوروپاتی دیابتی نوعی آسیب عصبی است که در صورت ابتلا به دیابت ممکن است رخ دهد در این راستا گزارش شده است که بیش از نیمی از بیماران دیابتی دچار نوروپاتی می‌شوند [۲]. قند خون بالا می‌تواند به اعصاب سراسر بدن آسیب برساند. در بیماران دیابتی، آسیب به بافت عصبی افزایش می‌یابد و تغییرات پاتولوژیک در سیستم عصبی محیطی و مرکزی رخ می‌دهد [۳]. اما سیستم عصبی محیطی بیشتر در معرض آسیب است، به‌طوری که در افراد دیابتی، بیشتر موارد نوروپاتی (حدود ۸۰ درصد) به‌صورت دیستال ظاهر می‌شود [٤]. لذا در این مطالعه عصب سیاتیک به‌عنوان یک عصب محیطی انتخاب شد.

طبق مطالعات انجام شده، به‌نظر می‌رسد نقش التهاب و نیز آپوپتوز در بروز نوروپاتی دیابتی حائز اهمیت باشد. در این راستا گزارش شده است که تحت شرایط هیپرگلیسمی، نوعی فاکتور رونویسی به نام فاکتور هسته‌ای کاپا B[1] (NF-kB) از طریق مسیرهای محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته[2] (AGEs) [٥] و پروتئین کیناز C [٦] فعال‌سازی می‌شود. در این صورت، NF-kB فعال با ورود به هستهٔ منجر به بیان سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α[3]، IL-1β[4]، IL-6[5] و آنزیم‌های COX-2[6] و iNOS[7] می‌شود [۷، ۸].

از آنجا که شرایط هیپرگلیسمی مزمن در نهایت منجر به التهاب عصبی می‌شود. به‌نظر می‌رسد ترکیباتی که دارای خاصیت هیپوگلیسمی هستند؛ احتمالاً می‌توانند از طریق کاهش عوامل التهابی در پیشگیری و درمان نوروپاتی دیابتی مؤثر باشند. بنابراین به‌منظور بررسی این فرضیه، در این مطالعه یک ترکیب شیمیایی و یک ترکیب طبیعی که این ویژگی را دارا هستند؛ انتخاب می‌شوند و با یکدیگر مقایسه می‌شوند. در ادامه این دو ترکیب معرفی می‌شوند.

متفورمین عضوی از خانوادهٔ بیگوانیدهاست و به‌عنوان یک داروی سنتزی رایج، برای بیماران مبتلا به دیابت تجویز می‌شود. متفورمین ویژگی کاهش قند خون و افزایش حساسیت به انسولین را داراست و اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی نیز از این دارو گزارش شده است [۱۱-۹]. با توجه به اینکه نقش هیپوگلیسمی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی دوز ۳۰۰ mg/kg متفورمین گزارش شده است [۱۱، ۱۰] لذا برای انجام مطالعهٔ حاضر نیز از همین دوز استفاده شد.

با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی موجود، یافتن ترکیبات طبیعی که فاقد عوارض جانبی و یا با عوارض جانبی کم باشند؛ بسیارحائز اهمیت خواهد بود. از این‌رو با توجه به نقش گیاهان و میوه‌ها برای مدیریت بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه دیابت، در ادامه میوهٔ انار و ترکیبات آن، مورد توجه قرار می‌گیرند.

Punica granatum (انار)، یکی از اعضای شناخته شده خانواده Punicaceae، بومی مدیترانه و ایران است. این گیاه امروزه در آسیای مرکزی، خاورمیانه، هیمالیا، جنوب غرب آمریکا و مدیترانه کشت می‌شود و اعتقاد بر این است که منشاء آن از ایران و افغانستان باشد [۱۲]. علاوه بر میوهٔ انار، از دیگر قسمت‌های این درخت نیز از جمله برگ، ریشه و گل، به دلیل اثرات مفید شناخته شده آنها بر سلامتی، در طب سنتی بسیاری از کشورها استفاده می‌شوند [۱۳]. طبق مطالعات انجام شده، پوست میوهٔ P. granatum دارای اثرات ضد التهابی، ضد دردی و ترمیم زخم است [۱۵، ۱٤]. از جمله ترکیبات موجود در پوست میوهٔ انار می‌توان به گالیک اسید[8]، پونیکالین[9]، پونیکالاژین[10]، اسید الاژیک[11] و آنتوسیانین‌ها اشاره کرد [۱٦]. از میان این ترکیبات، گالیک اسید به‌عنوان یکی از ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی هستند [۱۷، ۱۱] و همچنین گالیک اسید با مهار آنزیم‌های α- آمیلاز و α-گلوکوزیداز، باعث کاهش قند خون می‌شود [۱۸]. ویژگی‌های

[1] Nuclear factor kappa B
[2] Advanced gycation end-products
[3] Tumor necrosis factor alpha
[4] Interleukin-1 beta
[5] Interleukin 6
[6] Cyclooxygenase 2
[7] Inducible nitric oxide synthase

[8] Gallic acid
[9] Punicalin
[10] Punicalagin
[11] Ellagic acid

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مختلفی از جمله فعالیت‌های ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد سرطانی نیز از گالیک اسید گزارش شده است [۱۹].

با توجه به ویژگی‌های هیپوگلیسمی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دردی گالیک اسید با دوز ۴۰ mg/kg [۱۷، ۱۱] در مطالعهٔ حاضر نیز انتظار می‌رود؛ تجویز همین دوز از گالیک اسید بتواند اثرات ضد التهابی از خود نشان دهد و در کاهش التهاب عصبی، مؤثر واقع شود.

روش‌ها

این مطالعهٔ تجربی، در پائیز و زمستان ۱۴۰۱، در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. این مطالعه دارای کُد اخلاق به شناسه (IR.UM.REC.1401.083) از دانشگاه فردوسی مشهد است. برای انجام این پژوهش از آزمودنی‌های حیوان (موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار) استفاده شد و کلیهٔ اصول اخلاقی مربوط به نگه‌داری و کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیتهٔ اخلاق در پژوهش‌های پزشکی رعایت شد.

حیوانات: در انجام مطالعهٔ حاضر، از ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که در محدودهٔ وزنی ۲۹۰ تا ۲۷۰ گرم بودند و از حیوان‌خانهٔ گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی تهیه شدند؛ استفاده شد. این موش‌ها در محیطی با چرخهٔ تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته و درجهٔ حرارت ۲۴–۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری شدند.

روش القای دیابت و گروه‌های مورد مطالعه: برای القای دیابت، ابتدا استرپتوزوتوسین[1] (STZ) (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) در بافر سیترات (pH= ۴/۵) حل گردید و با دوز ۶۰ mg/kg به موش‌های صحرایی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد [۲۰] پس از گذشت ۷ روز از انجام تزریق، میزان قند خون این حیوانات به‌صورت ناشتا و با خونگیری از ورید دم این موش‌ها، با دستگاه گلوکومتر (مدل Accu check، ساخت شرکت Roch، آلمان) اندازه‌گیری گردید. حیوانات با قند خون بالاتر از ۳۰۰ mg/dL، برای این مطالعه انتخاب شدند. موش‌های صحرایی نرمال و هیپرگلیسمیک در ۴ گروه ۸ تایی به شرح زیر قرار گرفتند: موش‌های گروه ۱) کنترل سالم و ۲) کنترل هیپرگلیسمیک که دارویی دریافت نکردند و دو گروه آزمایشی دیگر، موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیکی بودند که ۳) ۳۰۰ mg/kg/day متفورمین (شرکت داروسازی ایران دارو، ایران) [۱۱، ۱۰] و ۴) ۴۰ mg/kg/day گالیک اسید (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) [۱۷، ۱۱] را به‌صورت خوراکی و از طریق گاواژ دریافت کردند. در این مطالعه دورهٔ درمانی برای تمام گروه‌ها، ۸ هفته [۲۱] در نظر گرفته شد.

بعد از پایان دورهٔ ۸ هفته‌ای، موش‌های صحرایی سالم و هیپرگلیسمی با تزریق کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بیهوش گردیده [۲۲] و نمونه‌هایی از بافت عصب سیاتیک موش‌های صحرایی در تمام گروه‌ها جدا و در دمای ۷۰– درجهٔ سانتی‌گراد برای سنجش بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α به روش Real Time qPCR نگه‌داری شدند.

استخراج RNA و Real Time-quantitative PCR (qPCR): RNA بافت عصب سیاتیک مربوط به هر گروه توسط کیت پارس طوس (خریداری شده از شرکت پارس طوس زیست فناوران مشهد، ایران) استخراج شد. سپس برای ساخت cDNA از کیت پارس طوس (خریداری شده از شرکت پارس طوس زیست فناوران مشهد، ایران) استفاده شد. پس از این مرحله برای اطمینان از صحت مراحل قبل و تعیین دمای مناسب برای اتصال پرایمر برای مرحلهٔ Real Time qPCR از روی نمونه‌های cDNA، توسط دستگاه ترموسایکلر (مدل MJ Mini، شرکت Bio Rad، آمریکا) PCR (واکنش زنجیرهای پلیمراز) معمولی انجام شد. سپس برای انجام Real Time qPCR از مسترمیکس مربوط به آن (شرکت Ampliqon، دانمارک، خریداری شده از شرکت سیناژن) استفاده شد و این کار با استفاده از دستگاه آشکارگر Real time qPCR (مدل iQ 5، شرکت Bio Rad، آمریکا) و با برنامه: ۱۵ دقیقه در ۹۵°C و (۱۵ ثانیه در ۹۵°C، ۱ دقیقه در ۶۲°C و ۳۰ ثانیه در ۷۲°C) به ۳۰ بار تکرار و سپس ۳ دقیقه در ۷۲°C، انجام شد. در نهایت برای کمی کردن بیان ژن‌ها از روش $۲^{(-\Delta\Delta Ct)}$ و Livak استفاده شد [۲۳]. پرایمر ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α و همچنین βactin (به‌عنوان ژن رفرنس) با استفاده از نرم‌افزار Gen Runner طراحی و BLAST پرایمرها توسط سایت NCBI صورت گرفت و برای سنتز به شرکت پیشگام سفارش داده شد. پرایمرهای استفاده شده برای این پژوهش در جدول ۱ لیست شده‌اند.

[1] Streptozotocin

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای Real Time qPCR

ژن‌ها	طوالی پرایمر
IL-6	(F) آغازگر جلوبرنده :5′- GCCCTTCAGGAACAGCTATGA-3′ (R) آغازگر معکوس :5′- TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA-3′
IL-1β	(F) آغازگر جلوبرنده :5′- CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA-3′ (R) آغازگر معکوس :5′- CCCAAGTCAAGGGCTTGGAA-3′
TNF-α	(F) آغازگر جلوبرنده :5′- AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3′ (R) آغازگر معکوس :5′- TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3′
βactin	(F) آغازگر جلوبرنده :5′- GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3′ (R) آغازگر معکوس :5′- AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3′

آنالیز داده‌ها: در این تحقیق آنالیز داده‌ها با استفاده از نسخهٔ ۱۹ نرم‌افزار SPSS انجام گردید و داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین، گزارش شدند و پس از تأئید نرمال بودن توزیع داده‌ها براساس آزمون کولموگروف – اسمیرنوف، مقایسهٔ بین میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام گرفت و اختلاف معنی‌داری با ارزش P کمتر از ۰/۰۵ گزارش گردید.

یافته‌ها

میزان بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α در موش‌های صحرایی پس از القای هیپرگلیسمی: مقایسهٔ میزان بیان ژن‌های مربوط به سیتوکین‌های پیش التهابی مورد مطالعه در این تحقیق در گروه موش‌های هیپرگلیسمیک با گروه موش‌های سالم نشان دهندهٔ افزایش معنی‌دار در سطح سرمی گلوکز (P= ۰/۰۰۲) (جدول ۲) و میزان بیان ژن‌های IL-6 (P= ۰/۰۰۰)، IL-1β (P= ۰/۰۰۸) و TNF-α (P= ۰/۰۰۵)، پس از ایجاد شرایط هیپرگلیسمی است (شکل ۱، ۲ و ۳).

اثر تجویز متفورمین بر میزان گلوکز خون و بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α: نتایج حاصل از تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان می‌دهد که تجویز متفورمین با دوز ۳۰۰ mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک نسبت به گروه کنترل هیپرگلیسمیک به‌مدت ۸ هفته باعث کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز خون (P= ۰/۰۴۷) (جدول ۲) و بیان ژن‌های IL-6 (P= ۰/۰۰۹)، IL-1β (P= ۰/۰۴۳) و TNF-α (P= ۰/۰۱۸) شد (شکل ۱، ۲ و ۳).

اثر تجویز گالیک اسید بر سطح گلوکز خون و بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α: داده‌های به‌دست آمده از مطالعهٔ حاضر بیانگر کاهش معنی‌دار در سطح گلوکز خون (P= ۰/۰۴۴) (جدول ۲) و بیان ژن‌های سیتوکی‌های پیش التهابی IL-6 (P= ۰/۰۱۶)، IL-1β (P= ۰/۰۳۸) و TNF-α (P= ۰/۰۲۳) پس از تجویز گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک به‌مدت ۸ هفته نسبت به گروه موش‌های کنترل هیپرگلیسمیک است (شکل ۱، ۲ و ۳).

جدول ۲- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز و گالیک اسید بر سطح سرمی گلوکز

گروه‌ها	گلوکز (mg/dl)
سالم	۸۴/۵۵ ± ۸/۷۲
هیپرگلیسمیک	۴۳۹/۴۷ ± ۴۴/۴۶**
هیپرگلیسمیک+متفورمین	۲۳۶/۹۱ ± ۲۴/۴۰#
هیپرگلیسمیک+گالیک اسید	۲۳۴/۸۸ ± ۱۲/۸۳#

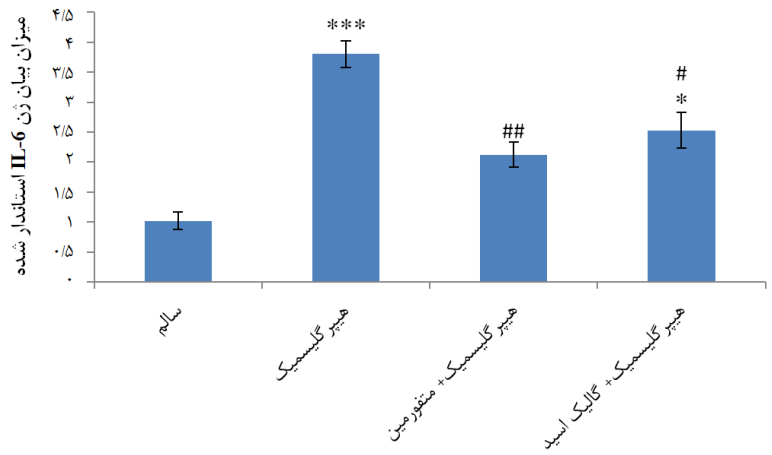
اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰ mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰ mg/kg به مدت ۸ هفته بر سطح سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک. مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n= ۸) موش صحرایی است و مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی گردید.

**:P< ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم، #: P< ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمیک

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۱- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به‌مدت ۸ هفته بر میزان بیان ژن IL-6، در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک

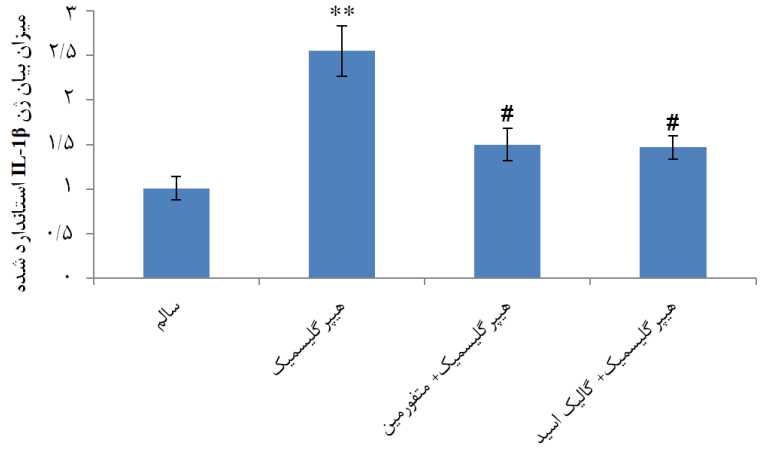
مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n= ۸) موش صحرایی است و مقایسهٔ بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی گردید.

***:P< ۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

*:P< ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

##: P< ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمیک

#: P< ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمیک



شکل ۲- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به‌مدت ۸ هفته بر میزان بیان ژن IL-1β در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک

مقادیر بیان‌گر میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n= ۸) موش صحرایی است و مقایسهٔ بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شد.

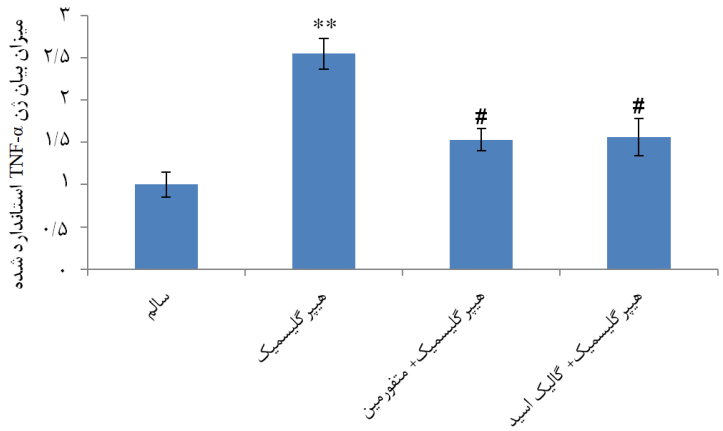
**:P< ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

#: P< ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمیک

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۳- اثر تجویز خوراکی متفورمین با دوز ۳۰۰mg/kg و گالیک اسید با دوز ۴۰mg/kg به‌مدت ۸ هفته برمیزان بیان ژن TNF-α در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار مربوط به (n= ۸) موش صحرایی بیان شده است و مقایسهٔ بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey بررسی گردید.

**:p< ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم

#: p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه هیپرگلیسمیک

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در موش‌های صحرایی با شرایط هیپرگلیسمی نسبت به موش‌های سالم میزان بیان ژن‌های IL-6، IL-1β و TNF-α (درگیر در فرآیند التهاب) افزایش می‌یابد. تجویز STZ برای القای دیابت در موش‌های صحرایی پیشنهاد می‌شود. STZ از طریق ناقل گلوکز GLUT2[1] به سلول‌های β منتقل می شود و منجر به آسیب DNA می‌شود. با آسیب دیدن DNA، فعالیت پلی (ADP-ribose) پلیمراز (PARP-1[2]) برای ترمیم DNA، افزایش می‌یابد. با این حال، فعالیت بیش از حد این آنزیم منجر به تخلیه NAD^+ و ATP داخل سلولی می‌شود و سلول‌های ترشح کنندهٔ انسولین دچار نکروز می‌شوند و در نهایت منجر به بروز شرایط هیپرگلیسمی می‌شود [۲۴].

هیپرگلیسمی نقش به‌سزایی در بروز نوروپاتی دارد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که در بیماران دیابتی، آسیب به بافت عصبی افزایش و تغییرات پاتولوژیک به‌ویژه در سیستم عصبی محیطی به‌وجود می‌آید [۴] و علاوه براین نتایج حاصل از تحقیقات بافت شناسی مؤید آن است که دیابت منجر به آسیب‌های بافتی در عصب سیاتیک می‌گردد [۲۵]. به‌نظر می‌رسد؛ التهاب عصبی، تحت شرایط هیپرگلیسمی نقش به‌سزایی در بروز نوروپاتی داشته باشد. به این علت هیپرگلیسمی از طریق مسیرهای ۱) AGES [۵]، ۲) پروتئین کیناز C [۶] و ۳) افزایش در عملکرد زنجیره انتقال الکترون در غشای داخلی میتوکندری [۸] با فعال کردن کینازهایی، باعث فسفریلاسیون NF-kB و متعاقباً فعال‌سازی این فاکتور رونویسی می‌شوند. در این صورت، NF-kB می‌تواند وارد هستهٔ سلول شده و به ژنوم متصل شود و باعث بیان ژن‌های سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α، IL-1β، IL-6 می‌شود بنابراین نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر مبنی بر افزایش بیان ژن‌های ذکر شده، تحت شرایط هیپرگلیسمی هم‌خوانی دارد و قابل توجیه است.

سیتوکین‌های پیش التهابی با اتصال بر گیرندهٔ خود در سطح سلول و در ادامه با به راه انداختن مسیر JAK/STAT[3] عملکرد سلول را از طریق تغییر در بیان ژن‌های مختلف، تغییر می‌دهند. از جمله این تغییرات می‌توان به تولید سیتوکین‌های بیشتر، افزایش در تعداد گیرنده‌های سطح سلولی سیتوکین‌ها، اشاره کرد که منجر به بروز التهاب و پاسخ ایمنی می‌شوند و در نهایت منجر به آسیب به اعصاب می‌شوند [۲۶].

برای این مطالعه، با توجه به اهمیت التهاب عصبی تحت شرایط هیپرگلیسمی در بروز نوروپاتی، اثرات ضد التهابی یک داروی شیمیایی متداول و یک ترکیب طبیعی که هر دو، ویژگی هیپرگلیسمی را دارند؛ بررسی و با یکدیگر مقایسه می‌گردند.

[1] Glucose transporter 2
[2] Poly (ADP-ribose) polymerase
[3] JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activators of transcription)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

متفورمین به‌عنوان یک داروی شیمیایی، به‌صورت رایج برای بیماران مبتلا به دیابت تجویز می‌شود. اثرات این دارو کاهش قند خون، افزایش حساسیت به انسولین، اثرات ضد التهابی، ضد دردی و آنتی‌اکسیدانی است [۹–۱۱] و از گالیک اسید به‌عنوان یک ترکیب طبیعی موجود در پوست میوهٔ انار، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد دردی و کاهندگی قند خون و همچنین فعالیت‌های ضد قارچی، ضد میکروبی و ضد سرطانی گزارش شده است [۱۹–۱۱].

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که متفورمین با دوز ۳۰۰ mg/kg/day و گالیک اسید با دوز ۴۰ mg/kg/day به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمی به‌مدت ۸ هفته باعث کاهش سطح بیان ژن‌های مربوط به سیتوکین‌های پیش التهابی IL-6، IL-1β و TNF-α می‌شوند.

طبق مطالعات انجام شده، مشخص شد که گالیک اسید باعث کاهش سطح سرمی سیتوکین‌های التهابی TNF-α، IL-1، IL-6، IL-12، IL-17 و IL-23 و نیز کاهش آپوپتوز در رودهٔ بزرگ موش‌های UC[1] و نیز سلول‌های HIEC-6 می‌شود. [۲۷]. همچنین تجویز گالیک اسید به موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک نیز توانست اثرات آنتی دیابتیک و ضد دردی از خود نشان دهد و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش داد [۱۱].

در مطالعهٔ حاضر که در مدل موش‌های صحرایی هیپرگلیسمی انجام شد نیز همانند مطالعات ذکر شده از گالیک اسید اثرات ضد التهابی مشاهده شد که احتمالاً این ویژگی‌های گالیک اسید مربوط به نقش آن در مهار NF-κB باشد. با این وجود برای تأئید آن نیازمند مطالعات بیشتری با استفاده از مهارکننده‌های زیر واحدهای NF-κB است.

در مورد متفورمین نیز گزارش شده است که تجویز این دارو باعث کاهش، NF-κB، TNF-α، IL-1β و کاسپاز ۳ (درگیر در فرایند آپوپتوز) در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۰]. از سوی دیگر مشخص شده است که آسیب تروماتیک مغزی باعث پاسخ التهابی می‌شود با این وجود تزریق داخل صفاقی متفورمین، یک ساعت پس از ایجاد آسیب فیزیکی به مغز، به‌طور قابل توجهی آپوپتوز سلول‌های عصبی و تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1β، TNF-α و IL-6 را کاهش می‌دهد [۲۸]. بنابراین ویژگی ضد التهابی به‌دست آمده از متفورمین در این مطالعه که بروی موش های صحرایی هیپرگلیسمیک انجام گردیده است؛ قابل توجیه است و می‌توان آن را به نقش مهاری این دارو در مهار NF-κB و نیز به اثر کاهندگی قند خون توسط این دارو نسبت داد. شایان ذکر است که احتمالاً کاهش قند خون توسط متفورمین تا حدودی توانسته است باعث مهار مسیرهای التهابی شود.

امروزه استفاده از گیاهان و یا ترکیبات استخراج شده از آنها، به‌عنوان دارو، به‌دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی، در بسیاری از کشورها، گسترش یافته است [۲۹]. در این مطالعه مشخص شد که گالیک اسید به‌عنوان یک ترکیب طبیعی، توانست ویژگی ضد التهابی قابل توجهی از خود نشان دهد و تقریباً همانند متفورمین به‌عنوان یک داروی سنتزی، عمل کند و همان‌طور که مطرح شد؛ ترکیبات با ماهیت طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی کمتری هستند. بنابراین یافتن ترکیبات طبیعی برای درمان بیماری‌ها، بسیار ارزشمند است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که گالیک اسید به‌عنوان یک ترکیب طبیعی موجود در پوست میوهٔ انار، همانند متفورمین احتمالاً بخشی از اثرات خود در بهبود عوارض ناشی از دیابت به‌ویژه نوروپاتی دیابتی را از طریق ویژگی ضد التهابی خود اعمال می‌کند و امید است به‌دلیل ماهیت طبیعی گالیک اسید، بتوان از این ترکیب برای درمان بیماران دیابتی استفاده کرد. البته نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامهٔ دکتری تخصصی تحت عنوان بررسی مقایسه‌ای اثرات محافظت کنندگی و ضد دردی سدیم سالیسیلات، گالیک اسید، نانو ذرات نقره پوشیده شده با گالیک اسید و پلاسمای غنی از پلاکت بر عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی هیپرگلیسمیک القا شده با استرپتوزوتوسین با کُد ۳/۵۷۹۹۵ است و با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد در حال اجرا است. نویسندگان این مقاله از دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین هزینه‌های مورد نیاز برای انجام این پژوهش، نهایت قدردانی را دارند.

[1] Ulcerative Colitis

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مآخذ

1. Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med*, 2020; 10(4):174–188.
2. Tan SY, Mei-Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed-Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr*, 2019; 13(1):364–72.
3. Vinik AI, Nevoret ML, Casellini C, Parson H. Diabetic neuropathy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2013; 42(4):747–787.
4. Bruschi LKM, Rocha DA, Filho ELG, Barboza NMP, Frisanco PAB, Callegaro RM, et al. Diabetes Mellitus and Diabetic Peripheral Neuropathy. *Open J Endocr Metab Dis*, 2017;7(1): 12–21.
5. Cepas V, Collino M, Mayo JC, Sainz RM. Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. *Antioxidants*, 2020; 9(2):142.
6. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammationassociated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018; 9(6):7204–7218.
7. Sandireddy R, Ganesh-Yerra V, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets. *Int J Endocrinol*, 2014; 2014:674987.
8. Fu J, Shi Q, Song X, Xia X, Su C, Liu Z, et al. (2016). Tetrachlorobenzoquinone exhibits neurotoxicity by inducing inflammatory responses through ROS-mediated IKK/IκB/NF-κB signaling. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016; 41:241–250.
9. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, et al. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med*, 2013; 19(5):1649–54.
10. Nna VU, Abu Bakar AB, Md-Lazin MRML, Mohamed M. Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin–induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 2018; 120(2):305–20.
11. Nohtani F, Behnam Rasouli M, Kheirabadi M. Comparative investigation of antioxidant and analgesic effects of gallic acid and metformin in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Birjand Univ Med Sci*, 2023; 30(2): 141–52. [In Persian]
12. Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *J Nutr Metab*, 2021; 2021: 5297162.
13. Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends Food Sci Technol*, 2017; 69(1): 59–73.
14. Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br J Nutr*, 2012; 109(5):802–809.
15. Moreira J, Klein-Junior LC, Cechinel Filho V, Campos Buzzi F. Anti-hyperagesic activity of corilagin, a tannin isolated from phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, 2013; 146(1):318–323.
16. Ulrike AF, Reinhold C, Dietmar RK. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food Chem*, 2011; 127(2):807–821.
17. Zhou D, Yang Q, Tian T, Chang Y, Li Y, Duan LR, et al. Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role. *Biomed Pharmacother*, 2020; 126:110075.
18. Oboh G, Ogunsuyi OM, Ogunbadejo MD, Adefegha SA. Influence of gallic acid on a-amylase and a-glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J Food Drug Anal*, 2016; 24(3):1–8.
19. Rosas EC, Correa LB, Henriques MG. Antiinflammatory Properties of Schinus terebinthifolius and Its Use in Arthritic Conditions. Bioactive Food as Dietary Intervention for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. In book: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases 2019; Chapter 28:489–503.
20. Delfan M, Rabiee M, Amadeh JR. Synergistic Effect of High Intensity Interval Training (Hiit) Combined with Curcumin on Bax And Bcl-2 Gene Expression In Soleus Muscle of Diabetic Rats. *IJDM*, 2021; 20(3):210–219.
21. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101(3): 823–828.
22. Bhatia A, Saikia PP, Dkhar B, Pyngrope H. Anesthesia protocol for ear surgery in Wistar rats (animal research). *Anim Models Exp Med*, 2022; 5(2):183–188.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *Methods*, 2001; 25(4):402–408.
24. Szkudelski T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med*, 2012; 237(5):481–490.
25. Várkonyi T, Körei A, Putz Z, Martos T, Keresztes K, Lengyel C, et al. Advances in the management of diabetic neuropathy. *Minerva Med*, 2017; 108(1):419–437.
26. Satarker S, Tom AA, Shaji RA, Alosious A, Luvis M, Nampoothiri M. JAK-STAT pathway inhibition and their implications in COVID-19 therapy. *Postgrad Med J*, 2020; 133(5):489–507.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

27. Zhu L, Gu p, Shen H. Gallic acid improved inflammation via NF-KB pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol*, 2019; 67: 129–137.
28. Tao L, Li D, Liu H, Jiang F, Xu Y, Cao Y, et al. (2018). Neuroprotective effects of metformin on traumatic brain injury in rats associated with NF-kappaB and MAPK signaling pathway. *Brain Res Bull*, 2018;140:154–161.
29. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 2016; 21(5):559.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Investigating the Expression of IL-6, IL-1β and TNF-A Pro-Inflammatory Cytokines Genes in the Sciatic Nerve Tissue of Hyperglycemic Rats after the Administration of Metformin and Gallic Acid

Fatemeh Nohtani[1], Morteza Behnam Rasouli[*1], Sajad Sahab Negah[2], Masoumeh Khairabadi[1]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

ABSTRACT

Background: Under hyperglycemic conditions, inflammatory processes with damage to the peripheral nerves are involved in the occurrence of neuropathy. This study aimed to compare the anti-inflammatory effects of metformin (synthetic drug) with gallic acid (natural compound) in hyperglycemic conditions.
Methods: Hyperglycemia was induced in male rats by the intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ) at a dose of 60 mg/Kg. For this research, rats were divided into four groups. Two groups were healthy control and hyperglycemic control rats that did not receive any drugs. The other two groups were hyperglycemic rats, which respectively received Metformin at a dose of 300 mg/kg/day and gallic acid at a dose of 40 mg/kg/day. At the end of the 8-week period, the rats in all groups were anesthetized and a sample of their sciatic nerve was taken to measure the expression level of genes related to pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1β and TNF-α. Data analysis was done by SPSS software and comparison between average data was done by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.
Results: Induction of hyperglycemic conditions in rats increased the expression of genes related to pro-inflammatory cytokines IL-6 ($p=0/000$), IL-1β ($p=0/008$) and TNF-α ($p=0/005$). However, administration of metformin and gallic acid to hyperglycemic rats for 8 weeks reduced the expression of IL-6, IL-1β and TNF-α genes ($p<0.05$).
Conclusion: Gallic acid, like metformin, with its anti-inflammatory properties, can be effective in improving complications caused by hyperglycemic conditions, especially neuroinflammation, and it is hoped that it will be clinically useful for diabetic patients in the future.

Keywords: Anti-inflammatory**,** Gallic acid, Hyperglycemia, Metformin, Pro-inflammatory Cytokines

* Azadi Square, Mashhad**,** Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Science, Department of Biology, Tel: +985138805503, Fax: +985138796416, E-mail: behnam@um.ac.ir

Copyright © 2024 Iranian Journal of Diabetes and Metabolism and Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-09-29]

Archive of SID.ir