Archive of SID

Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.4, Winter 2019 ORIGINAL ARTICLE

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]

Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

The effect of charantin on expression of Ngn3 gene in streptozotocin-induced diabetic rats

Abolfazl Nasirzadeh Vanhari[1], Hossein Sazgar[2]
[1]MSc in Biology and Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2]Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Background: Positive effects of medicinal herbs on diabetes have been demonstrated in previous studies. The aim of the present study was to evaluate the effect of charantin on the treatment of diabetes and increase the expression of the Ngn3 gene in diabetes, which is a key gene for transcription of the pancreas.
Materials and methods: In this experimental study, 42 adult male Wistar rats were randomly divided into 7 healthy control groups, diabetic control, control group, 150 control, and three groups receiving effective doses of charantin (50-100-200 mg/ Per kilogram). All groups except diabetic control group and control group with streptozotocin chemical injected intraperitoneally. Afterwards, they received a cartilage by gavage for four weeks (three times a week).
Results: The lowest expression was observed in the diabetic group. Among those who received different doses of charantine, the highest expression was among group with dose of 100 mg/kg, and the lowest expression in 50/kg group.
Conclusion: It can be concluded that increased expression of the Ngn3 gene was not dose-dependent. After the development of diabetes, the patient's severity declined sharply, and after the use of the charantin and metformin drug, this reduction was somewhat offset.
Keywords: *Diabetes, Streptozotocin, Charantin, Ngn3 gene.*

Cited as: Nasirzadeh Vanhari A, Sazgar H. The effect of quarantine on expression of Ngn3 gene in streptozotocin-induced diabetic rats (STZ). Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(4): **303-312.**

Correspondence to: Hossein Sazgar
Tel: *+98 9177121993*
E-mail: hoseinsazgar@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0001-9769-8932
Received: 20 May 2018; **Accepted:** 3 Sep 2018

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۴، زمستان ۹۸، صفحات ۳۰۳ تا ۳۱۲

Original Article

تاثیر چارانتین بر بیان ژن Ngn3 در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

ابوالفضل نصیرزاده ونهری[۱]، حسین سازگار[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی-بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲]استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *تاثیرات مثبت گیاهان دارویی بر روی دیابت در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ماده موثرچارانتین بر درمان بیماری دیابت و افزایش بیان ژن Ngn3، به عنوان ژن کلیدی در رونویسی از پانکراس در دیابت، بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۷ گروه شاهد سالم، شاهد دیابتی، کنترل متفرمین، کنترل چارانتین۱۵۰ و سه گروه دریافت کننده ماده موثرچارانتین با دوزهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. همه گروه‌ها به جز گروه شاهد و کنترل چارانتین، با ماده شیمیایی استرپتوزوتوسین با تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. پس از آن به مدت چهار هفته (هر هفته سه بار) از طرق گاواژ ماده موثرچارانتین را دریافت کردند.*

یافته‌ها: *کمترین میزان بیان مربوط به گروه دیابتی (C) بود. بیشترین میزان بیان بین گروه‌های دریافت کننده دوزهای مختلف چارانتین مربوط به دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (F) و کمترین مربوط به دوز دریافتی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم (E) بود.*

نتیجه‌گیری: *می‌توان نتیجه گرفت افزایش بیان ژن Ngn3 وابسته به دوز نیست. بیان ژن پس از ایجاد دیابت درگروهای بیمار به شدت افت پیدا کرد و بعد از استفاده از چارانتین و داروی متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شد.*

واژگان کلیدی: *دیابت، استرپتوزوتوسین، چارانتین، ژن Ngn3.*

مقدمه

دیابت شایع ترین بیماری مزمن متابولیک است، که به صورت ناهنجاری در سوخت و ساز کربوهیدارت، پروتئین و چربی توصیف می‌شود شایع‌ترین علائم دیابت عدم تحمل گلوکز یا افزایش قند خون است، به همین دلیل افرد به عوارض کوتاه مدت و بلند مدت دیابت دچار می‌شوند. دیابت اغلب همراه با بیماری‌های میکروواسکولار (رتینوپاتی، نورپاتی، نفروپاتی) و بیماری‌های ماکروواسکولار (حمله قلبی، سکته مغزی، بیماری‌های عروق محیطی) است که با تعداد مرگ و میر قابل توجهی همراه است (۲، ۱). دیابت را می‌توان به دو گروه اصلی دیابت نوع یک و دیابت نوع دو تقسیم کرد. دیابت نوع یک یا دیابت وابسته به انسولین اغلب در کودکان و نوجوانان رخ می‌دهد. در این دیابت سلول‌های بتا پانکراس که مسئول ساخت هورمون انسولین در بدن هستند، به طور کلی از بین رفته یا غیر فعال می‌شوند (۳). بر اساس برآورد سازمان جهانی بهداشت، در صورتی که اقدامات موثر برای پیشگیری دیابت صورت نگیرد، تعداد افراد مبتلا به این بیماری تا سال ۲۰۳۰ درکشورهای در حال توسعه افزایش۶۰ ٪ خواهد داشت. این در حالی است که ایران با شیوع دیابت بیش از ۸٪ در منطقه، بالاترین نرخ ابتلا به دیابت را دارد (۴). از جمله داروهای استاندارد موجود برای کاهش قند خون می‌توان به سولفونیل اوره‌ها، بیوگوانیدها (این دسته از داروها شامل: متفورمین، بوفورمین و فن‌فورمین است)، مهارکننده آلفا گلوکوزیداز، و تیازولیدین دیون‌ها اشاره کرد (۵،۶). به‌طور سنتی، در طول‌تاریخ از گیاهان متفاوتی برای

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی، حسین سازگار
(**email**: hoseinsazgar@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-9769-8932
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۲/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۶/۱۲
www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

کاهش قند خون و بهبود اثرات دیابت، استفاده شده و درطب سنتی ایران و سایر کشورهای جهان، اطلاعات مفصلی در این باره به چشم می‌خورد. داروهای گیاهی به خاطرکم بودن اثرات جانبی، در دسترس بودن، هزینه نسبتا کم و موثر بودنشان، به طور وسیع در سرتاسر جهان تجویز می‌شوند (۷). تاکنون بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی در ۷۲۵ جنس و ۱۸۳ خانواده شناخته شده‌اند که اثرات ضد دیابتی دارند. بیش از نیمی از آنها به عنوان ضد دیابت شناخته شده‌اند (۸). از جمله این گیاهان، خار مریم (Silybum marianum)، خیار تلخ (Mamordica charantia L)، شنبلیله (Trigonella foenum graecum L)، سیاه گیله (Vaccinium Arctostaphylos L) و هندوانه ابوجهل (Citrullus colocynthis)) هستند (۹).

خیار تلخ یا کارلا با نام علمی مورموردیکا چارانتیا (Momordicacharatia) یک گیاه دارویی متعلق به خانواده (Cucurbitaceae) است. مورموردیکاچارانتیا بومی مناطق غربی هندوستان، چین و آسیا است. این گیاه دارای مومورديوم چارانتین، آسکوربیک اسید، گلیکوزید و آلکالوئید است. میوه و برگ گیاه کارلا در طب سنتی هندوستان برای درمان یرقان و بیماری دیابت کاربرد داشته است (۱۰). درپژوهش‌های پیشین ثابت شده است‌که برگ و میوه این گیاه ترشح انسولین را افزایش داده و ورود گلوگز را به سلول‌های کبدی تسهیل می‌کند (۱۱). میوه این گیاه دارای ترکیبی به نام کوئینین (Charantin) است و از این رو مزه‌ای تلخ دارد. در میوه این گیاه دارویی وجود دارد که دارای خاصیت گلیکوئیدی و استروئیدی است. میوه نارس گیاه فلاونوئید و ترکیبات فنولی بالایی دارد. در میوه رسیده میزان فلاونوئید کمتر از میوه نارس است. این گیاه سرشار از ویتامین‌های گروه B استئاریک اسید، اولئیک اسید و اسیدهای چرب است که برای درمان دیابت مفیدند (۱۲). دیابت نتیجه یک تعامل پیچیده بین فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است. این بیماری به‌عنوان یک بیماری شدید متابولیک با پیش‌زمینه ارثی و با دو شاخصه مهم نقص در ترشح و عملکرد انسولین شناخته می‌شود. پیشرفت‌ها در زمینه شناسایی تغییرات ژنتیکی دیابت می‌تواند در زمینه کنترل این بیماری کمک کننده باشد (۱۳،۱۴). فاکتورهای متفاوتی برتمایز سلول‌های بتا درلوزالمعده اثر می‌گذارند؛ از فاکتورهای رو نویسی دخیل در تکامل پانکراس می‌توان به Neurogenin3، Notch signaling، Neuron/Beta2، Pax1، Pax6، Nkx2.2، Nkx6.1، MafA، MafB، Mist1، HLxb9، Isi1 و Hes اشاره کرد (۱۵). در میان این فاکتورها می‌توان به اهمیت فاکتور (نوروژنین-۳) Ngn3 در پانکراس اشاره کرد که نقش آن طی تحقیقات متعدد اثبات شده است. Ngn3 یک پروتئین از خانوادهbHLH (helix-loop-helix) است. نوروژنین-۳ به عنوان یک فاکتور رونویسی برای توسعه سلول‌های اندوکرین پانکراس حیاتی است (۱۶). سلول‌های مزانشیم پانکراس زمان تمایز سلول‌های اندوکرینی را کنترل می‌کنند و روی تکثیر سلول‌های پیش‌ساز پانکراس اثر می‌گذارد. سلول‌های مزانشیم پانکراس به دو صورت بر بیان ژن Ngn3 تاثیر می‌گذارند: ۱- از طریق فاکتورهای ترشحی باعث مهار تمایز سلول‌های بیان کننده Ngn3 به سلول‌های بتا می‌شود، ۲- از طریق تماس سلول با سلول باعث تاخیر در بیان Ngn3 می‌شود. بیان Ngn3 در روز ۹ – ۹/۵ جنینی شروع شده، در روز ۱۵ زمانی که موج بزرگ ایجاد سلول‌های غدد درون ریز وجود دارد، به بیشترین مقدار خود می‌رسد. بیان Ngn3 یک شاخص عملکردی جمعیت‌های پیش ساز سلول‌های جزایر لانگرهانس طی تکامل پانکراس است (۱۸، ۱۷). خاصیت ضد دیابتی خیار تلخ در مطالعات گذشته اثبات شده است. در این مطالعه به بررسی اثر ماده موثر خیار تلخ (چارانتین) بر بیان ژن‌های پانکراسی ازجمله ژن Ngn3 که یک ژن مهم در رونویسی و تکامل پانکراس است، همچنین تاثیر چارانتین بر قند خون رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختیم.

مواد و روشها

تهیه رت‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۳۵۰-۲۵۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی 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.

گروه بندی رت‌ها

رت‌ها در ۷ گروه ۶ تایی به صورت تصادفی دسته‌بندی و در قفس‌های مجزا نگهداری شدند. آب و غذا برای همه یکسان بود.

گروه A (سالم شاهد): شامل شش سر رت سالم بود که روزانه فقط آب معمولی و غذای استاندارد دریافت می‌کردند.

گروه B (شاهد دریافت کننده چارانتین): شامل شش سر رت سالم بود که روزانه آب معمولی و غذای استاندارد و هرسه روز یک بار، طی سی روز هر نوبت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم چارانتین به صورت گاواژ دریافت می‌کردند.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

گروه C (کنترل منفی (شاهد دیابتی)): شامل شش سر رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که روزانه فقط آب معمولی و غذای استاندارد دریافت می‌کردند.

گروه D: شامل شش سر رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که روزانه آب معمولی و غذای استاندارد و هر سه روز یک بار، طی سی روز (ده بار گاواژ) هر نوبت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متفورمین (داروی کاهنده قند خون) به صورت گاواژ (خوراکی) دریافت می‌کردند.

گروه E: گروه تیمار اول که شامل شش سر رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که روزانه آب معمولی و غذای استاندارد و هرسه روز یک بار، طی سی روز (ده بار گاواژ) هر نوبت ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم چارانتین به صورت گاواژ (خوراکی) دریافت می‌کردند.

گروه F: گروه تیمار دوم که شامل شش سر رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که روزانه آب معمولی و غذای استاندارد و هر سه روز یک بار، طی سی روز (ده بار گاواژ) هر نوبت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم چانتین به صورت گاواژ (خوراکی) دریافت می‌کردند.

گروه G: گروه تیمار سوم که شامل شش سر رت دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که روزانه آب معمولی و غذای استاندارد و هر سه روز یک بار، طی سی روز (ده بارگاواژ) هر نوبت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم چارانتین به صورت گاواژ (خوراکی) دریافت می‌کردند (۱۹،۲۰). برای ایجاد دیابت از داوری استرپتوزتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن رت استفاده شد. مقدار استرپتوزوتوسین مورد نیاز برای هر موش ۵ میلی گرم بود که این میزان استرپتوزوتوسین را در آب تزریق حل کردیم تا محلول شفاف به دست آید. همه موش‌ها، به جز گروه شاهد و کنترل چارانتین، این مقدار استرپتوزوتوسین را با تزریق درون صفاقی دریافت کردند (۲۱).

نمونه گیری از رت‌ها

پس از سی روز نگه داری و انجام دادن تزریق‌ها و گاواژ کردن رت‌ها با استفاده از کلروفرم رت‌ها بیهوش شدند. با استفاده از ستِ جراحی برداشت بافت پانکراس انجام گرفت. قطعه‌های کوچک به ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر از پانکراس جدا شد ودر داخل میکروتیوب ۱/۵ حاوی یک میلی لیتر RNA later قرار داده شد، به صورتی که بافت کاملا در RNA later غرق شد و سپس میکروتیوب و محتویاتش ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند و در نهایت به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (۲۱).

استخراج RNA

برای استخراج RNA، کیت ستونی ساخت شرکت یکتا تجهیزآزما ساخت ایران مورد استفاده قرار گرفت و تمامی مراحل طبق پرتوکل کیت و با استفاده از محلول‌های کیت و ستون اسپین کالم استخراج RNA انجام شد. برای بررسی درصد خلوص، غلظت RNA و میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ از دستگاه اسپکتوفتومتر (Nano Drop) استفاده شد (۲۲).

ساخت cDNA

پس از اطمینان از خالص بودن RNA استخراج شده سنتز cDNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما ساخت ایران انجام شد و تمامی مراحل طبق دستور العمل کیت و با استفاده از مواد و محلول‌های موجود در کیت در زیر هود و روی یخ انجام گرفت.

طراحی و سنتز پرایمرها

پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش بر اساس توالی ژن مربوطه که از سایت NCBI به دست آمدند با استفاده از نرم-افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت کیاژن بر اساس توالی ژنی Ngn3 و GAPDH سنتز شد. توالی مربوط در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است.

مراحل انجام Real Time RT-PCR

برای انجام واکنش Real Time RT- PCR از کیت SYBR green ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. تمام مراحل در شرایط استاندارد و طبق پروتوکل کیت انجام گرفت. مخلوط واکنش پس از آماده سازی تحت تاثیر برنامه دمایی

جدول ۱. توالی ژن Ngn3

Ngn3F	5′-CAC CGC TGC TTG ACT CTG ACC-3′	Tm:62
Ngn3R	5′-CAC TCC CCT CTT CTA CCC TTT G-3′	Tm:62

جدول ۲. توالی ژن GAPDH

GAPDH F	5′-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC-3′	Tm:62
GAPDH R	5′-TTG AAC TTG CCG TGG GTA GAG-3′	Tm:62

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

ذکر شده در پروتوکل کیت در دستگاه Real Time قرار گرفت. تمامی واکنش‌ها ۳ مرتبه تکرار شد و به منظور تائید ژن‌های مورد نظر آنالیز منحنی melting محصول PCR با استفاده از نرم افزار Real Time RT- PCR انجام گرفت (۲۲).

این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد با کد اخلاقی IR.IAU.SHK.REC.1397009 به تصویب رسید.

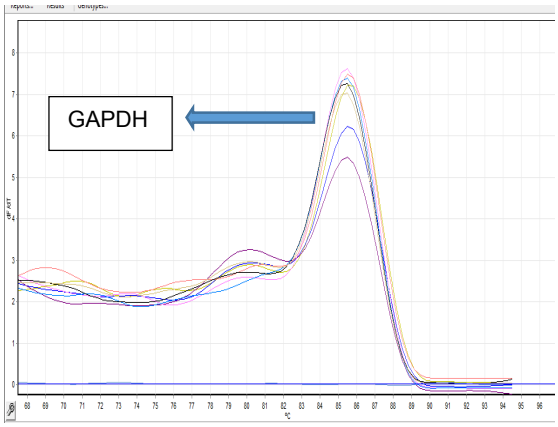
آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌های این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از آنجا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون پشتیبان LSD post test تحلیل انجام شد و نتایج بصورت Mean±SEM ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با P<۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

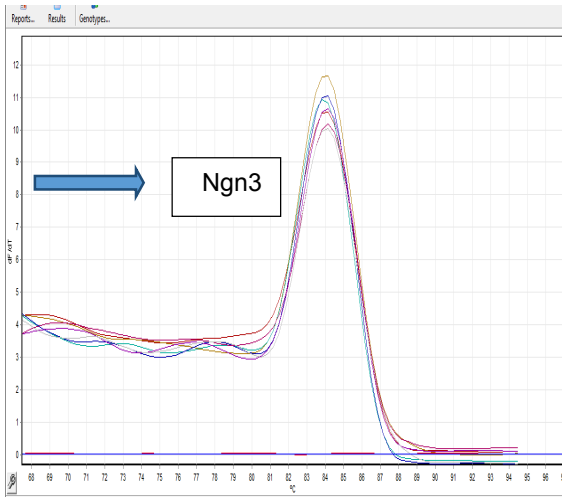
یافته‌ها

منحنی‌های ذوب Real time RT-PCR

در این منحنی شدت فلورسنت در برابر دمای ذوب DNA دو رشته‌ای ترسیم می‌شود و اتصال اختصاصی پرایمر و وجود یا عدم وجود پرایمردایمر را نیز می‌توان متوجه شد. منحنی ذوب مربوط بهGAPDH و Ngn3 به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است که وجود تک منحنی در نمونه‌ها نشان دهنده اختصاصی بودن تکثیر ژن Ngn3 و ژن GAPDH است. باتوجه به دمای مشابه میزان بیان در نمونه‌هایی که دیابتی شده بودند و دوز متفاوت چارانتین مصرف کرده بودند بیشتر و تک منحنی بودن دلالت بر اختصاصی بودن تکثیر ژن Ngn3 است.



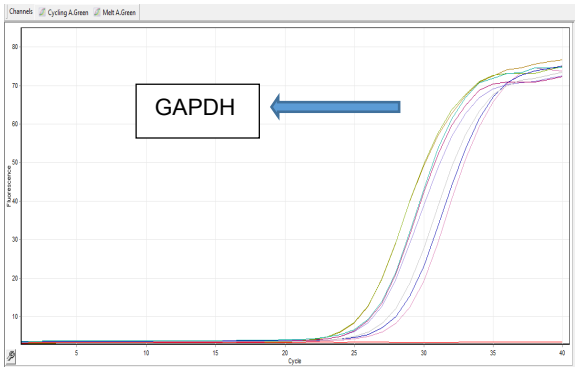
شکل ۲. مربوط به نمودار ذوب GAPDH در نمونه کنترل و دیابتی



شکل۲. مربوط به نمودار ذوب Ngn3 در نمونه کنترل و نمونه دیابتی

منحنی تکثیرReal time RT-PCR

پس از انجام RT-PCR، منحنی تکثیر cDNA برای Ngn3 و GAPDH رسم شد و Ct هر کدام تعیین گردید. منحنی تکثیر برای GAPDH وNgn3 به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.



شکل۳. مربوط به منحنی تکثیر GAPDH در نمونه کنترل و نمونه‌های دیابتی. نمودار نارنجی و سبز گروه سالم، نمودار آبی گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ چارانتین، نمودار قرمز گروه کنترل متفورمین، نمودار بنفش گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰ چارانتین، نمودار خاکستری گروه دیابتی دریافت کننده دوز۲۰۰ چارانتین، نمودار آبی تیره گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۵۰ چارانتین، نمودار صورتی گروه دیابتی یا کنترل منفی است.

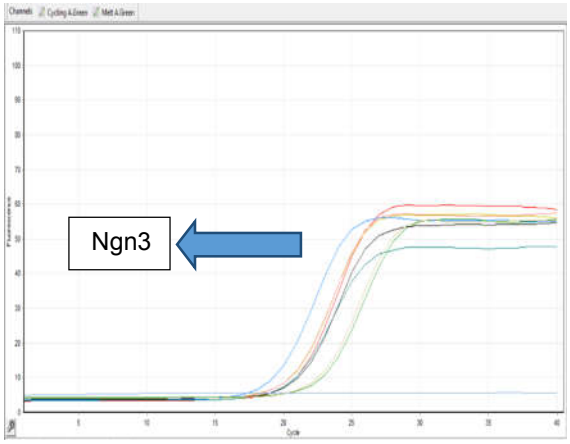
تحلیل آماری ژن Ngn3 با استفاده از نرم‌فزار SPSS V.22 انجام شد و از آن‌جایی که داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

شاهد سالم (A) و شاهد دیابتی (C) در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۴. مربوط به منحنی تکثیر Ngn3 در نمونه کنترل و نمونه‌های دیابتی. نمودارآبی گروه سالم، نمودار نارنجی گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ چارانتین، نمودار قرمز گروه کنترل متفورمین، نمودار آبی تیره گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰ چارانتین، نمودار بنفش گروه دیابتی دریافت کننده دوز۲۰۰ چارانتین، نمودار خاکستری گروه دیابتی دریافت کننده دوز۵۰ چارانتین، و نمودار سبز گروه دیابتی یا کنترل منفی است.

بررسی میزان بیان ژن Ngn3 در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی به عنوان کنترل منفی نشان داد میزان بیان این ژن در رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های سالم به صورت معنی‌داری کاهش یافته است (P-Value=۰/۰۴۵) که در شکل ۵ آورده شده است.

میزان بیان ژن Ngn3 در گروه شاهد سالم (A) و گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ چارانتین (B) در جدول ۴ آمده است.

جدول ۳. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه‌های شاهد سالم (A) و شاهد دیابتی (C)

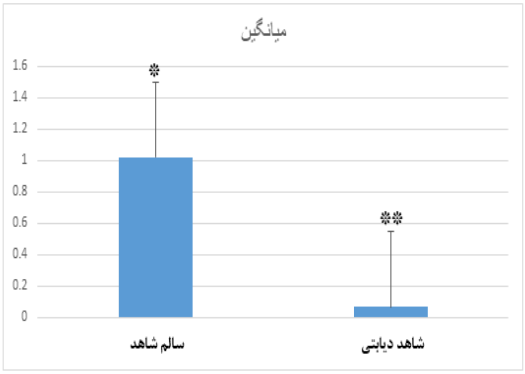
گروه	انحراف معیار ± میانگین
سالم شاهدA	۱/۰۲۱۷ ±۰/۲۹۶۲ [a]
شاهد دیابتیC	۰/۰۶۷۰ ± ۰/۰۱۹۴ [b]

حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است. (P = ۰/۰۰۰۱)

جدول ۴. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه شاهد سالم (A) و گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ چارانتین (B)

گروه	انحراف معیار ± میانگین
سالم شاهد A	۱/۰۲۱۹ ± ۰/۲۹۶۲ [a]
سالم دریافت کننده چارانتین B	۱/۰۴۶۸ ± ۰/۰۵۶۴ [a]

حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی وجود گروه‌های معنی‌دار است. (P < ۰/۰۵)



شکل ۵. بررسی میزان بیان ژن Ngn3 در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد (P=۰/۰۴۵).

میزان بیان این ژن در گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰mg/kg چارانتین (B) نسبت به گروه سالم شاهد (A) تا حدودی افزایش بیان داشت، ولی این افزایش بسیار محدود بود و معنی‌دار نبود (P=۰/۹۱۷) (شکل ۶).

در گروه شاهد دیابتی (C) میزان بیان ژن Ngn3 به شدت پایین بود. در اینجا گروه دیابتی به عنوان رفرنس سایر گروه‌ها در نظر گرفته شد که در جدول ۵ اختلاف معنی-داری سایر گروه‌های مورد مطالعه با این گروه، نشان داده شده است. میزان بیان ژن به صورت ستونی نیز در شکل۷ زیر آورده شده است.

جدول ۵. مقایسه گروه‌های مورد بررسی

گروه	میانگین ± انحراف معیار
شاهد دیابتی C	۱/۰۲۱۷ ± ۰/۲۰۹۴ a
دریافت کننده متفورمین D	۸/۲۰۴۸ ± ۰/۳۶۹۴ bc
دریافت کننده دوز ۵۰ چارانتین E	۶/۷۴۶۷ ± ۰/۵۱۳۴ b
دریافت کننده دوز۱۰۰ چارانتین F	۱۲/۹۴۰۵ ± ۱/۷۸۲۵ c
دریافت کننده دوز ۲۰۰ چارانتین G	۹/۸۵۰۱ ± ۰/۱۳۶۵ bc

حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار است. (P < ۰/۰۵)

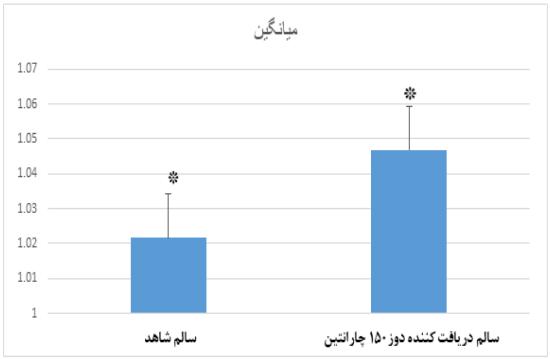
کمترین میزان بیان مربوط به گروه دیابتی (C) بود. بیشترین میزان بیان بین گروه‌های دریافت کننده دوزهای مختلف چارانتین مربوط به دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (F) و کم‌ترین مربوط به دوز دریافتی ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (E) بود. پس طبق شواهد می‌توان نتیجه گرفت افزایش بیان ژن وابسته به دوز نبوده است. پس از ایجاد دیابت درگروهای بیمار به شدت افت پیدا کرده و بعد از

www.SID.ir

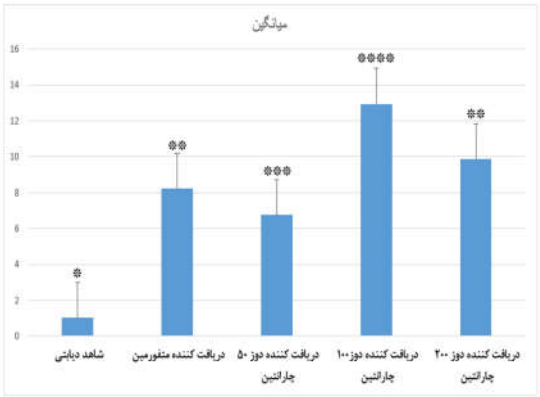
Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

استفاده از چارانتین و داروی متفورمین تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است.



شکل۶. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰mg/kg چارانتین (B) نسبت به گروه سالم شاهد (A). تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد. (P< ۰/۰۵)



شکل ۷. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه‌های مختلف. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵)

بحث

دیابت بیماری شایعی در عصر حاضر است که می‌تواند حاصل روش‌های زندگی، تغذیه و ژنتیک فرد باشد. دیابت دو نوع دارد: نوع یک که بیشتر در نوجوانان شایع است و نوع دو که شیوع بیشتری در میان بزرگسالان دارد. به طور کلی این بیماری باعث ایجاد تغییرات در سطح گلوکز و لیپیدهای سرمی می‌شود که تاثیرات نامطلوبی در بیماران به جای می‌گذارد. کاهش دادن سطح گلوکز و لیپیدهای نامطلوب سرم در بیماران دیابتی با استفاده از گیاهان دارویی از اهمیت بالینی زیادی برخوردار است؛ زیرا گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کند. دیابت چه در اثر خودایمنی و تخریب پانکراس (نوع یک) و چه در اثر اختلال در جذب و ترشح انسولین (نوع دو) ایجاد شود، زمینه ساز بروز بیماری‌های چشمی، پوستی و قلبی‌عروقی خواهد بود و نیاز به ساخت ترکیبی گیاهی که علاوه بر عوارض جانبی محدود قدرت کنترل عوارض خاص را از بیماری را داشته باشند به شدت احساس می‌شود. بر اساس پیش‌بینی به عمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت. با توجه به پیشرفت‌های حاصله در مورد چند عاملی بودن این بیماری، نیاز برای یافتن ترکیبات موثر در درمان بیماری دیابت با عوارض جانبی کمتر، امروزه ضروری است (۲۳). مطالعه‌ای توسط لنزن و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی مکانیسم اثر آلوکسان و استرپتوزوتوسین در ایجاد دیابت انجام شد و به این نتیجه رسیدند که دیابت القا شده توسط استرپتوزوتوسین، منجر به آسیب سلول‌های بتای پانکراس شده و در نتیجه کاهش انسولین و افزایش قند خون را به دنبال دارد (۲۴). در مطالعه‌ای که راتد و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی القای دیابت در موش‌های صحرایی انجام دادند دریافتند که القای دیابت با استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی با استفاده از استرپتوزوتوسین، باعث کاهش وزن بدن و افزایش آشکار قند خون و تغیرات نامطلوب در سطح لیپیدها و لیپوپروتئین‌های پلاسما رخ می‌دهد (۲۵). در این مطالعه با توجه به مطالعات قبلی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین مشاهده شد که استرپتوزوتوسین با تخریب پانکراس ایجاد دیابت می‌کند و روی وزن و رفتار رت‌ها تاثیر می‌گذارد. اثر کاهندگی قند خون توسط عصاره گیاهان، به میزان تخریب سلول‌های بتای پانکراس وابسته است. برای توضیح این یافته‌ها، دو دلیل می‌تواند وجود داشته باشد: ۱- به احتمال زیاد ترکیبات موجود در عصاره گیاه، سبب جلوگیری از مرگ سلول‌های‌بتا شده است، ۲- ممکن است این عصاره، سبب بهبود سلول‌های بتای تخریب شده شوند (۲۶). کاوالی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نیز نشان دادند که موش‌های دیابتی شده با استپتوزوتوسین، در صورت خوردن دانه‌های گزنه باعث درمان آن‌ها می‌شود به طوری که دانه گیاه گزنه قادر است باعث کاهش قند خون در گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شود و تعداد سلول‌های جزایر لانگرهانس در مقایسه با گروه دیابتی افزایش دهد (۲۷). بابوتا و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطالعه‌ای انجام دادند مبنی بر تاثیر گردو، تخم گیشنیز و انار بر قند خون و هیستوپاتولوژی پانکراس موش صحرایی که با آلوکسان دیابتی شده بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درصد سلول‌های بتا و اندازه جزایر درگروه‌های تیمار شده به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه درمان نشده افزایش یافته بود و گروه تحت تیمار با کاهش سطح قند خون روزانه مواجه بودند. نتایج نشان

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

داد احتمالا این ترکیب می‌تواند به کاهش عوارض هیستوپاتولوژی دیابت نوع دو کمک کند (۲۸). کاشیک و همکارانش با مروری بر مطالعات در سال ۲۰۱۵ تحت عنوان "کوکوربیتاسین: نگاهی عمیق به کاربرد مولکول‌های هدایت‌گر استخراج شده از طبیعت در داروسازی" بیان داشتند که کوکوربیتاسین از لحاظ ساختاری از پتانسل دارویی فراوانی برخوردار است (۲۹). حسین فلاح و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با مطالعه‌ای در خصوص اثرات ضد دیابتی عصاره مومومردیکا چارانتیا، خرگوش‌های دیابتی ناشی از آلوکسان با عصاره متانولی و اتانولی مومومردیکا چارانتیا مورد درمان قرار گرفتند و کاهش ۲۸ درصدی هیپرگلیسمی توسط عصاره اتانول مشاهده شد (۳۰). غیبی و همکارانش درسال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای بر موش‌ها دریافتند که رژیم پرچرب - STZ مدل مناسب و ارزانی برای القای دیابت نوع دو است و می‌تواند در بررسی ترکیبات ضد دیابتی مورد بررسی قرار گیرد (۳۱). اُدریسکول و همکارانش درسال ۲۰۱۵ با تحقیق بر روی بیان فاکتورهای انسولین ساز انسانی دریافتند که فاکتور Ngn3 بخش طبیعی بیولوژی پانکراس یک انسان بالغ است و با استفاده از داروهای اختصاصی می‌توان تعداد آنها را افزایش داد و با تبدیل آنها به سلول‌های تمایز یافته غدد درون ریز لوزالعمده، سلول‌های بتای کارآمدی را تولید کرد که برای درمان دیابت به کار گرفته شوند (۱۷). روستالیس و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با تحقیق بر روی نوروژنین به عنوان یک تنظیم کننده اصلی تمایز و باز سازی جزایر پانکراس دریافتند که Ngn3 به عنوان یک تنظیم کننده اصلی توسعه غدد درون ریز پانکراس و توجه به یافتن روش‌های درمانی برای افزایش بیان Ngn3 در دیابت به عنوان وسیله‌ای برای افزایش توده سلولی و عملکرد توده‌های بتا است (۱۶). وصال و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اثر آنتی‌دیابتیک استرپتوزوتوسین بر روی موش‌های صحرایی را بررسی کردند و دریافتند که تجویز داخل صفاقی برخی فلاونوئیدها به موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، موجب کاهش (وابسته به دوز فلاونوئید تزریقی) گلوکز می‌شود، درحالی که اثر محسوسی بر غلظت گلوکز خون در حیوانات سالم ندارد (۳۲). با توجه به مطالعات گذشته و شباهت مطالعه انجام شده می‌توان دریافت که این مطالعه با مطالعه قاسمی، روستالیس، کاشیک، حسین فلاح شباهت دارد. با توجه به مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر، استرپتوزوتوسین باعث القای دیابت در موش‌ها و تخریب پانکراس، افزایش مقدار قند خون و کاهش وزن بدن موش‌ها می‌شود و همان‌گونه گیاهان دارویی در درمان دیابت تاکنون تاثیر به سزایی داشته‌اند و عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی موجود دارند در این مطالعه انتظار می‌رود که چارنتین باعث کاهش قند خون و باز سازی پانکراس تخریب شده توسط استرپتوزوتوسین شود.

طبق شواهد می‌توان نتیجه گرفت که استرپتوزوتوسین باعث تخریب پانکراس، کاهش وزن بدن و افزایش قند خون رت‌ها می‌شود. به علاوه، با بررسی دوزهای مختلف چارانتین به رت‌های دیابتی شده و محاسبات میزان بیان ژن Ngn3 در رت‌ها می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان ژن وابسته به دوز چارانتین نیست. زیرا پس از ایجاد دیابت درگروهای بیمار بیان ژن Ngn3 به شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از چارانتین در گروه‌های مختلف و داروی متفورمین در گروه کنترل تا حدودی این کاهش بیان جبران شده است.

قدردانی و تشکر

این مقاله استخراج شده از پایان نامه کارشناسی ارشد است. بدین وسیله از اساتید محترم و مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به منظور فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق سپاس‌گزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Meusel, L, Kansal, N, Tchistiakova, E, Yuen W, MacIntosh, B, Greenwood, C, et al. A systematic review of type 2 diabetes mellitus and hypertension in imaging studies of cognitive aging: time to establish new norms. Front Aging Neurosci 2014.6: 148.

2. Patel DK, Kumar R, Prasad SK, Sairam K, Hemalatha S. Antidiabetic and in vitro antioxidant potential of Hybanthus enneaspermus (Linn) F. Muell in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Biomed 2011;1: 316-322.

3. Scherbaum WA. Insulin therapy in Europe-Diabetes. Metab Res Rev 2002; 3: 3:S50-6.

4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2010;87:4-14.

5.Nolte MS, Karam JH, ed. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. Basic and clinical pharmacology. 9th ed. New York: McGraw Hill Companies; 2004. P.708.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]

Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

6. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? Exp Neurol 2005;193:279-90.

7. Venkatesh S, Reddy GD, Reddy BM, Ramesh M, Rao AV. Antihyperglycemic activity of *Caralluma attenuata*. Fitoterapia 2003; 74:274-9.

8. McCune LM, Johns T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. J Ethnopharmacol 2002;82:197-205.

9. Fallah Huseini H, Fakhrzadeh H, Larijani B, Shikh Samani A. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. J Med Plants 2006; 1 :1-8 [In Persian]

10. Hajinejad MR, Salehi Moghadam M, Hajian Shahri S, Vaezi E, Jamshidian A, Sa'atati D. Effect of Carla leaf extract on serum glucose, lipid and malondialdehyde levels in streptozocin-induced diabetic rats. Diabetes Nur 2014;2:8-19. [In Persian]

11. Ahmed I, Adeghate E, Cummings E, Sharma AK, Singh J. Beneficial effects and mechanism of action of Momordica charantia juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat. Mol Cell Biochem 2004;261:63-70.

12. Yibchok-anun S, Adisakwattana S, Yao CY, Sangvanich P, oengsumran S, Hsu WH. Slow acting protein extract from fruit pulp of *Momordica charantia* with insulin secretagogue and insulinomimetic activities. Biol Pharm Bull 2006;29:1126-31.

13. Huang QY, Cheng MR, Ji SL. Linkage and association studies of the susceptibility genes for type 2 diabetes. Yi Chuan Xue Bao 2006; 33:573-89.

14. Patlak M. New weapons to combat at ancient disease: treating diabetes. FASEB J. 2002:16:1853.

15. Qiu Li, Zhi-Chun Lai. Recent progress in studies of factors that elicit pancreatic β-cell expansion. Protein Cell 2015; 6: 81–87.

16. Rukstalis JM, Habener JF. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. Islets 2009;1:177-184.

17. Gomez DL, O'Driscoll M, Sheets TP, Hruban RH, Oberholzer J, McGarrigle JJ, et al. Neurogenin 3 expressing cells in the human exocrine pancreas have the capacity for endocrine cell fate. PLoS One 2015;10:e0133862. doi:10.1371/journal.pone.0133862.

18. Pagliuca FW, Melton DA. Melton. How to make a functional β-cell. Development 2013;140:2472-83.

19. Khaleghi S, Bahrami G, Mahmoodi M, Asgari V, Mostafaie A. Hypoglycemic Effect of Hydroalcoholic Extract and Hexane Fraction of Persian Shallot (Allium Hirtifolium Boiss) Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. JRPS. 2015; 5: 33-40.

20. Kermany H, Shahanipour K, Nakhaee AR. Effect of aqueous and methanolic extracts of *Momordica charantia* fruit on blood glucose and liver enzymes in diabetic rats. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences 2015; 21:105-112. [In Persian]

21. Abdollahi M, Zuki ABZ, Goh YM, Rezaeizadeh A, Noordin MM. The effects of *Momordica charantia* on the liver in streptozotocin-induced diabetes in neonatal rats. Afr J Biotechnol 2011;26:13-21.

22. Ahangaran, A, Mosahebi Mohammadi G, Koohi Habibi M, Khezri S, Shahraeen, N. Use of rapid serological and nucleic acid-based methods for detecting the soybean mosaic virus. J Agric Sci Technol 2009.11: 91-97.

23. Al-said MS, Abdelsattar EA, Khalifa SI, EI- Feraly FS. Isolation and identification of an anti- inflammatory principle from *Capparis spinosa*. Pharmazie 1988; 43: 640-41.

24. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and STZ- induced diabetes. Diabetologia 2008;51:216-226.

25. Rethod NR. Chime HR. Hypoglycemic effect of calotropis gigantean linn.Leaves and flowers in STZ-diabetic rats. J Oman Med 2011; 26:104-108.

26. Ardestani A, Yazdanparast R, Jamshidi Sh. Therapeutic effects of *Teucrium polium* extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. Med Food 2008; 11: 525-32.

27. Kavalali G. Tuncel H. Hatmi HH. Hypoglycemic activity of Urtica pilulifera in pilulifera in STZ-diabetic rats. J Ethnopharmacol 2003;84:241-245.

28. Baboota, S. Kohli, K. Ahmad, S. Ali, J. Silymarin: a review of Pharmalogical aspects and bioavilability enhancement approaches. Indian J Pharamacol 2007; 39:172-179.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Kaushik U, Aeri V, Mir SR. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. Pharmacogn Rev 2015;9:12-8.

30. Hussain F, Tahira S. Antidiabetic evaluation of *Momordica charantia* L fruit extracts. West Indian Med J 2014; 63:294-99.

31. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Ghasemi A. A review of high fat diet-streptozotocin model for induction of type 2 diabetes in rat. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2016; 18:135-148. [In Persian]

[DOI: 10.29252/iau.29.4.303]
Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir at 14:02 +0330 on Tuesday January 21st 2020

www.SID.ir