

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

Abolfazl Nasirzadeh Vanhari¹, Hossein Sazgar²

¹MSc in Biology and Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

²Assistant 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

تاثیر چارانتین بر بیان ژن Ngn3 در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

ابوالفضل نصیرزاده ونهری^۱، حسین سازگار^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی-بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
^۲ استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، 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 موثر چارانتین 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 چارانتین ۱۵۰ و سه گروه دریافت کننده ماده موثر چارانتین با دوزهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. همه گروه ها 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 موثر چارانتین را دریافت کردند.

یافته ها: کمترین میزان بیان مربوط به گروه دیابتی (C) بود. بیشترین میزان بیان بین گروه های 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.

نتیجه گیری: می توان نتیجه گرفت افزایش بیان ژن Ngn3 وابسته به دوز نیست. بیان ژن پس از ایجاد دیابت در گروه های 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 کربوهیدرات، پروتئین و چربی توصیف می شود شایع ترین علائم دیابت عدم تحمل گلوکز یا افزایش قند خون است، به همین دلیل افراد به عوارض کوتاه مدت و بلند مدت دیابت دچار می شوند. دیابت اغلب همراه با بیماری های میکروواسکولار (رتینوپاتی، نورپاتی، نفرپاتی) و بیماری های ماکروواسکولار (حمله قلبی، سکته مغزی، بیماری های عروق محیطی) است که با تعداد مرگ و میر قابل توجهی همراه است (۱، ۲). دیابت را می توان 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 می دهد. در این دیابت سلول های بتا پانکراس که مسئول ساخت هورمون انسولین در بدن هستند، به طور کلی از بین رفته یا غیر فعال می شوند (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 در کشورهای در حال توسعه افزایش ۶۰٪ 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 می توان به سولفونیل اوره ها، بیگوانیدها (این دسته از داروها شامل: متفورمین، بوفورمین و فن فورمین است)، مهارکننده آلفا گلوکوزیداز و تیزاوالیدین دیون ها اشاره کرد (۵، ۶). به طور سنتی، در طول تاریخ از گیاهان متفاوتی برای

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، حسین سازگار

(email: hoseinsazgar@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0001-9769-8932

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۲/۳۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۶/۱۲

کاهش قند خون و بهبود اثرات دیابت، استفاده شده و درطسب سنتی ایران و سایر کشورهای جهان، اطلاعات مفصلی در این باره به چشم می‌خورد. داروهای گیاهی به خاطر کم بودن اثرات جانبی، در دسترس بودن، هزینه نسبتاً 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 (*Momordica charantia*) یک گیاه دارویی متعلق به خانواده (*Cucurbitaceae*) است. مورموردیکا چارانتیا بومی مناطق غربی هندوستان، چین و آسیا است. این گیاه دارای مورموردیوم چارانتین، آسکوربیک اسید، گلیکوزید و آکالوئید است. میوه و برگ گیاه کارلا در طب سنتی هندوستان برای درمان یرقان و بیماری دیابت کاربرد داشته است (۱۰). در پژوهش‌های پیشین ثابت شده است که برگ و میوه این گیاه ترشح انسولین را افزایش داده و ورود گلوکز را به سلول‌های کبدی تسهیل می‌کنند (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 بر تمایز سلول‌های بتا درلوزالمعده اثر می‌گذارند؛ از فاکتورهای رونویسی دخیل در تکامل پانکراس می‌توان به Neurogenin3، Pax1، Neuron/Beta2، Notch signaling، Pax6، Hlx9، Mist1، MafB، MafA، Nkx6.1، Nkx2.2، Hes و Isi1 اشاره کرد (۱۵). در میان این فاکتورها می‌توان به اهمیت فاکتور (نوروزنین-۳) Ngn3 در پانکراس اشاره کرد که

نقش آن طی تحقیقات متعدد اثبات شده است. Ngn3 یک پروتئین از خانواده bHLH (helix-loop-helix) است. نوروزنین-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 تأثیر 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 تأخیر 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 پیش‌ساز سلول‌های جزایر لانگرهانس طی تکامل پانکراس است (۱۷، ۱۸). 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 از جمله ژن Ngn3 که یک ژن مهم در رونویسی و تکامل پانکراس است، همچنین تأثیر 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 هر سه روز یک بار، طی سی روز هر نوبت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم چارانتین به صورت گاواژ دریافت می‌کردند.

کردن رت ها با استفاده از کلروفرم رت ها بیهوش شدند. با استفاده از ست جراحی برداشت بافت پانکراس انجام گرفت. قطعه های کوچک به ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتی متر از پانکراس جدا شد و در داخل میکروتیوب ۱/۵ حاوی یک میلی لیتر RNA later قرار داده شد، به صورتی که بافت کاملاً در RNA later غرق شد و سپس میکروتیوب و محتویاتش ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند و در نهایت به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد (۲۱).

استخراج RNA

برای استخراج RNA، کیت ستونی ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما ساخت ایران مورد استفاده قرار گرفت و تمامی مراحل طبق پرتوکل کیت و با استفاده از محلول های 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 محلول های 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 جدول های 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

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

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 گاوژ) هر نوبت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین (داروی کاهنده قند خون) به صورت گاوژ (خوراکی) دریافت می کردند.

گروه E: گروه تیمار اول 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 گاوژ) هر نوبت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم چارانتین به صورت گاوژ (خوراکی) دریافت می کردند.

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 گاوژ) هر نوبت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم چانتین به صورت گاوژ (خوراکی) دریافت می کردند.

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 بار گاوژ) هر نوبت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم چارانتین به صورت گاوژ (خوراکی) دریافت می کردند (۱۹،۲۰). برای ایجاد دیابت از داور استرپتوزوتوسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی گرم 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 موش ها، به جز گروه شاهد و کنترل چارانتین، این مقدار استرپتوزوتوسین را با تزریق درون صفاقی دریافت کردند (۲۱).

نمونه گیری از رت ها

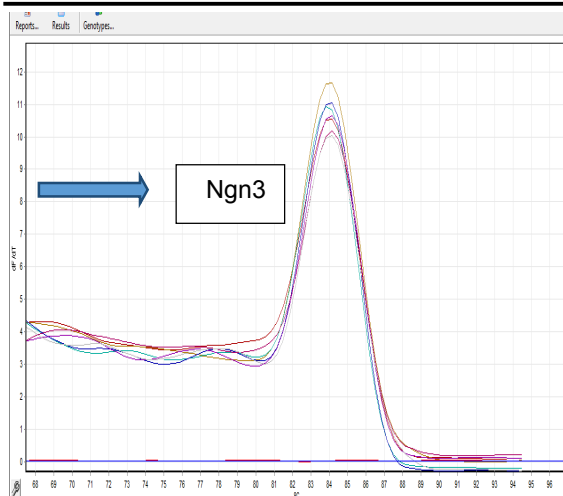
پس از سی روز نگه داری و انجام دادن تزریق ها و گاوژ

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

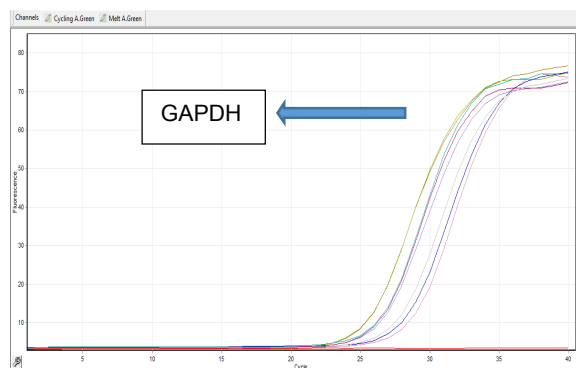
GAPDH F	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC-3'	Tm:62
GAPDH R	5'-TTG AAC TTG CCG TGG GTA GAG-3'	Tm:62



شکل ۲. مربوط به نمودار ذوب Ngn3 در نمونه کنترل و نمونه دیابتی

منحنی تکثیر Real 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 و Ngn3 به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.



شکل ۳. 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 دوز ۲۰۰ 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 نرم‌افزار SPSS V.22 انجام شد و از آنجایی که داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه‌های

ذکر شده در پروتوکل کیت در دستگاه Real Time قرار گرفت. تمامی واکنش‌ها ۳ مرتبه تکرار شد و به منظور تأیید 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.

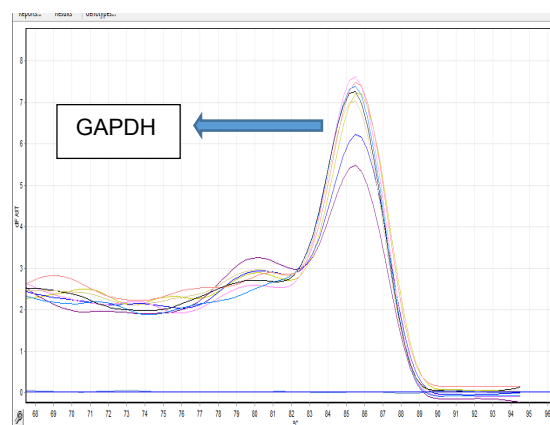
آنالیز آماری

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 $P < 0.05$ Mean±SEM ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

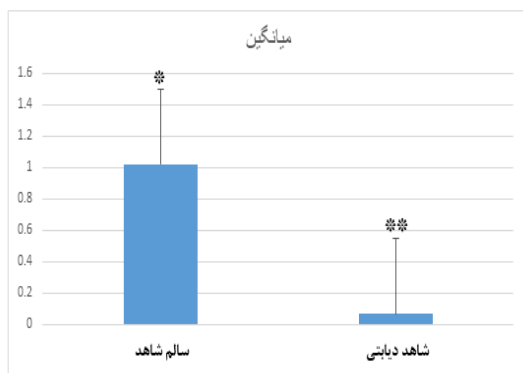
منحنی‌های ذوب Real time RT-PCR

در این منحنی شدت فلورسنت در برابر دمای ذوب DNA دو رشته‌ای ترسیم می‌شود و اتصال اختصاصی پرایمر و وجود یا عدم وجود پرایمر را نیز می‌توان متوجه شد. منحنی ذوب مربوط به GAPDH 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. با توجه 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 ۴. مربوط به نمودار ذوب GAPDH در نمونه کنترل و دیابتی

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



شکل ۵. بررسی میزان بیان ژن Ngn3 در گروه شاهد سالم و گروه شاهد دیابتی. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد ($P=0/045$).

میزان بیان این ژن در گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg چارانتین (B) نسبت به گروه سالم شاهد (A) تا حدودی افزایش بیان داشت، ولی این افزایش بسیار محدود بود و معنی دار نبود ($P=0/917$) (شکل ۶).

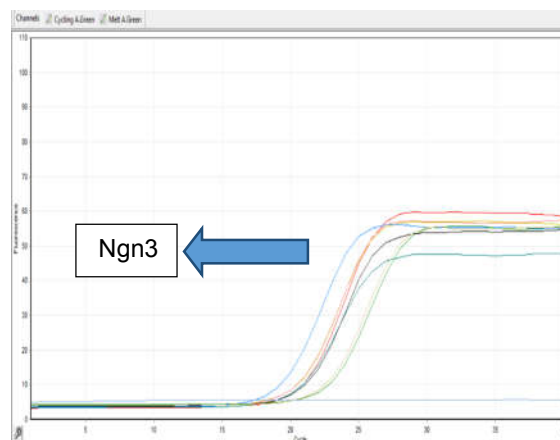
در گروه شاهد دیابتی (C) میزان بیان ژن Ngn3 به شدت پایین بود. در اینجا گروه دیابتی به عنوان رفرنس سایر گروه ها در نظر گرفته شد که در جدول ۵ اختلاف معنی داری سایر گروه های مورد مطالعه با این گروه، نشان داده شده است. میزان بیان ژن به صورت ستونی نیز در شکل ۷ زیر آورده شده است.

جدول ۵. مقایسه گروه های مورد بررسی

گروه	میانگین $\pm$ انحراف معیار
شاهد دیابتی C	$1/0217 \pm 0/2094$ a
دریافت کننده متفورمین D	$8/2048 \pm 0/3694$ bc
دریافت کننده دوز ۵۰ چارانتین E	$6/7467 \pm 0/5134$ b
دریافت کننده دوز ۱۰۰ چارانتین F	$12/9405 \pm 1/7825$ c
دریافت کننده دوز ۲۰۰ چارانتین G	$9/8501 \pm 0/1365$ bc

حروف نامشابه نشان دهنده وجود گروه های معنی دار است. ($P < 0/05$)

کمترین میزان بیان مربوط به گروه دیابتی (C) بود. بیشترین میزان بیان بین گروه های 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. پس طبق شواهد می توان نتیجه گرفت افزایش بیان ژن وابسته به دوز نبوده است. پس از ایجاد دیابت در گروه های بیمار به شدت افت پیدا کرده و بعد از



شکل ۴. مربوط به منحنی تکثیر Ngn3 در نمونه کنترل و نمونه های دیابتی. نمودار آبی 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 دوز ۲۰۰ چارانتین، نمودار خاکستری گروه دیابتی دریافت کننده دوز ۵۰ 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 رت های دیابتی نسبت به رت های سالم به صورت معنی داری کاهش یافته است ($P\text{-Value}=0/045$) 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 گروه های شاهد سالم (A) و شاهد دیابتی (C)

گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین
سالم شاهد A	$1/0217 \pm 0/2962$ a
شاهد دیابتی C	$0/0670 \pm 0/0194$ b

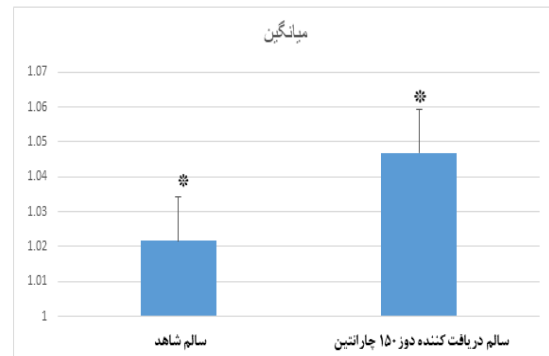
حروف نامشابه نشان دهنده وجود گروه های معنی دار است. ($P = 0/0001$)

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

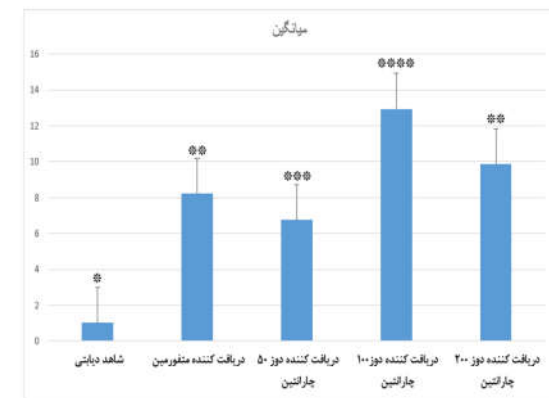
گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین
سالم شاهد A	$1/0219 \pm 0/2962$ a
سالم دریافت کننده چارانتین B	$1/0468 \pm 0/0564$ a

حروف نامشابه نشان دهنده وجود گروه های معنی دار است. ($P < 0/05$)

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



شکل ۶. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه سالم دریافت کننده دوز ۱۵۰ mg/kg چارانتین (B) نسبت به گروه سالم شاهد (A). تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد. ($P < 0.05$)



شکل ۷. میزان بیان ژن Ngn3 در گروه های مختلف. تعداد ستاره متفاوت در هر گروه معنی دار بودن را نشان می دهد ($P < 0.05$)

بحث

دیابت بیماری شایعی در عصر حاضر است که می تواند حاصل روش های 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 می شود که تاثیرات نامطلوبی در بیماران به جای می گذارد. 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 می کند. 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 بیماری های چشمی، پوستی و قلبی عروقی 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 می شود. بر اساس پیش بینی به عمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت. با توجه به پیشرفت های 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). مطالعه ای 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 سلول های بتای پانکراس شده و در نتیجه کاهش انسولین و افزایش قند خون را به دنبال دارد (۲۴). در مطالعه ای که راتدو همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی القای دیابت در موش های صحرایی انجام دادند دریافتند که القای دیابت با استرپتوزوتوسین در موش های صحرایی با استفاده از استرپتوزوتوسین، باعث کاهش وزن بدن و افزایش آشکار قند خون و تغییرات نامطلوب در سطح لیپیدها و لیپوپروتئین های پلاسما رخ می دهد (۲۵). در این مطالعه با توجه به مطالعات قبلی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین مشاهده شد که استرپتوزوتوسین با تخریب پانکراس ایجاد دیابت می کند و روی وزن و رفتار رت ها تاثیر می گذارد. اثر کاهندگی قند خون توسط عصاره گیاهان، به میزان تخریب سلول های بتای پانکراس وابسته است. برای توضیح این یافته ها، دو دلیل می تواند وجود داشته باشد: ۱- به احتمال زیاد ترکیبات موجود در عصاره گیاه، سبب جلوگیری از مرگ سلول های بتا شده است، ۲- ممکن است این عصاره، سبب بهبود سلول های بتای تخریب شده شوند (۲۶). کاوالی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نیز نشان دادند که موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، در صورت خوردن دانه های گزنه باعث درمان آن ها می شود به طوری که دانه گیاه گزنه قادر است باعث کاهش قند خون در گروه های درمانی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شود و تعداد سلول های جزایر لانگرهانس در مقایسه با گروه دیابتی افزایش دهد (۲۷). با بوتا و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطالعه ای 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 سلول های بتا و اندازه جزایر در گروه های 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

داد احتمالا این ترکیب می تواند 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 مولکول های هدایت گر 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 مطالعه ای در خصوص اثرات ضد دیابتی عصاره موموردیکا چارانتیا، خرگوش های دیابتی ناشی از آلوکسان با عصاره متانولی و اتانولی موموردیکا چارانتیا مورد درمان قرار گرفتند و کاهش ۲۸ درصدی هیپرگلیسمی توسط عصاره اتانول مشاهده شد (۳۰). غیبی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در مطالعه ای بر موش ها دریافتند که رژیم پرچرب - STZ مدل مناسب و ارزانی برای القای دیابت نوع دو است و می تواند در بررسی ترکیبات ضد دیابتی مورد بررسی قرار گیرد (۳۱). آدریسکول و همکارانش در سال 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 می توان تعداد آنها را افزایش داد و با تبدیل آنها به سلول های تمایز یافته غدد درون ریز لوزالعمده، سلول های بتای کارآمدی را تولید کرد که برای درمان دیابت به کار گرفته شوند (۱۷). روستالیس و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با تحقیق بر روی نورونین 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 روش های درمانی برای افزایش بیان Ngn3 در دیابت به عنوان وسیله ای برای افزایش توده سلولی و عملکرد توده های بتا است (۱۶). وصال و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اثر آنتی دیابتیک استرپتوزوتوسین بر روی موش های صحرایی را بررسی کردند و دریافتند که تجویز داخل صفاقی برخی

فلاونوئیدها به موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، موجب کاهش (وابسته به دوز فلاونوئید تزریقی) گلوکز می شود، درحالی که اثر محسوسی بر غلظت گلوکز خون در حیوانات سالم ندارد (۳۲). با توجه به مطالعات گذشته و شباهت مطالعه انجام شده می توان 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 موش ها و تخریب پانکراس، افزایش مقدار قند خون و کاهش وزن بدن موش ها می شود و همان گونه گیاهان دارویی در درمان دیابت تاکنون تاثیر به سزایی داشته اند و عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی موجود دارند در این مطالعه انتظار می رود که چارانتین باعث کاهش قند خون و باز سازی پانکراس تخریب شده توسط استرپتوزوتوسین شود.

طبق شواهد می توان نتیجه گرفت که استرپتوزوتوسین باعث تخریب پانکراس، کاهش وزن بدن و افزایش قند خون رت ها می شود. به علاوه، با بررسی دوزهای مختلف چارانتین به رت های دیابتی شده و محاسبات میزان بیان ژن Ngn3 در رت ها می توان نتیجه گرفت که افزایش بیان ژن وابسته به دوز چارانتین نیست. زیرا پس از ایجاد دیابت در گروه های بیمار بیان ژن Ngn3 به شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از چارانتین در گروه های 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 سپاس گذاری می شود.

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.

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 Pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian J Pharamacol* 2007; 39:172-179.

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]