مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر سیلی‌مارین بر قند خون و بیان ژن *pax4* و بررسی هیستوپاتولوژی بافت پانکراس در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

سجاد نیک‌خواه: کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

حسین سازگار: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (*نویسنده مسئول) h.seazgar@iaushk.com

نوشا ضیاء جهرمی: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به آمار بالای دیابت در ایران و جهان و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی در این مطالعه به بررسی اثر ماده مؤثر گیاه خار مریم (سیلی‌مارین) بر بیان ژن *pax4* برای تکوین و بازسازی سلول‌های بتای پانکراس است پرداخته شد.

روش کار: مطالعه حاضر از نوع بنیادی و روش آن تجربی است و ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی انتخاب و به ۷ گروه شش‌تایی تقسیم شدند. رت‌های دیابتی با ماده استرپتوزوتوزسین دیابتی شدند و هر ده روز یک بار میزان قند خون ناشتای آن‌ها سنجیده شد و پس از پایان دوره رت‌ها با داروی بی‌هوشی، بی‌هوش و تشریح شدند. مقداری از بافت پانکراس جدا سازی و برای بررسی بیان ژن *pax4* به روش Real Time RT PCR استفاده شد.

یافته‌ها: ماده مؤثره سیلی‌مارین باعث کاهش معنی‌دار قند خون در همه گروه‌های بیمار دریافت‌کننده این دارو (C، D، E، F) بود. این دارو باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *pax4* در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۱۵۰ mg/kg و ۱۰۰ سیلی‌مارین (D، E) نسبت به گروه شاهد دیابتی (B) و سایر گروه‌های بیمار دریافت‌کننده داروهای سیلی‌مارین و متفورمین شد ($p<0/05$). این افزایش بیان ژن وابسته به دوز نبوده و در گروه دریافت‌کننده‌ی دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (E) نسبت به گروه ۱۰۰ mg/kg (D) میزان بیان کمتر است.

نتیجه‌گیری: ماده مؤثره سیلی‌مارین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *pax4* شد که این ژن یکی از ژن های ترمیم و بازسازی سلول‌های بتا است و باعث بهبود و بازسازی سلول‌های بتا و جزایر لانگرهانس پانکراس می‌شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد

کلیدواژه‌ها

pax4،

سیلی‌مارین،

هیستوپاتولوژی،

رت،

استرپتوزوتوسین

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۲۳

شیوه استناد به این مقاله:

Nikkhah S, Sazgar H, Zia Jahromi N. Effect of silymarin on blood glucose concentration and *pax4* gene expression and histopathology of pancreatic tissue in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. Razi J Med Sci. 2019;26(5):67-78.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(5):67-78. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Effect of silymarin on blood glucose concentration and *pax4* gene expression and histopathology of pancreatic tissue in streptozotocin-induced diabetic wistar rats

Sajad Nikkhah, MA, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Hosein Sazgar, Assistant Professor, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (*Corresponding author) h.seazgar@iaushk.com
Noosha Zia Jahromi, Assistant Professor, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Background: Considering the high rates of diabetes in Iran and the world and also due to the lower side effects of medicinal plants compared to industrial and chemical arbitrators, this study examined the effect of the active ingredient of tall moss (silymarin) on the expression of *pax4* gene, one of the key genes for development and reconstruction of pancreatic beta cells.
Methods: The present study was of a fundamental type and its experimental method. 42 male Wistar rats were randomly selected and divided into 7 groups of sixths. Diabetic rats with diabetes mellitus straptozotocin have been diagnosed with fasting blood glucose every 10 days and then anesthetized and described after the end of the rats with anesthetics. A portion of the pancreatic tissue was isolated and the *pax4* gene expression was analyzed using Real Time RT PCR.
Results: The active ingredient of silymarin caused a significant decrease in blood glucose levels in all of the patient groups receiving the drug (C, D, E, F). This drug significantly increased the expression of *pax4* gene in the doses of mg/kg 150 and 100 silymarin (D, E) compared to diabetic controls (B) and other groups receiving silymarin and metformin ($p<0.05$). This increase in the gene expression is not dose-dependent and in the group treated by 150 mg/kg (D) dose of silymarin, the gene expression is lower than the group treated by 100 mg/kg (D) dose of silymarin.
Conclusion: The active ingredient of silymarin significantly increased the expression of the *pax4* gene, and this gene, one of the beta cells repair and upkeep genes, improves and restores beta cells and pancreatic islets.

Conflicts of interest: None
Funding: Islamic Azad University Shahrekord Branch

Keywords
pax4,
Silymarin,
Histopathology,
Rat,
Streptozotocin

Received: 14/04/2019
Accepted: 14/07/2019

Cite this article as:
Nikkhah S, Sazgar H, Zia Jahromi N. Effect of silymarin on blood glucose concentration and *pax4* gene expression and histopathology of pancreatic tissue in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. Razi J Med Sci. 2019;26(5):67-78.

This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

دیابت یکی از رایج‌ترین بیماری‌های متابولیک است که با هایپرگلیسمی مزمن و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین همراه است و شایع‌ترین علائم آن عدم تحمل گلوکز یا ازدیاد قند خون است، به همین دلیل فرد به عوارض کوتاه‌مدت و بلندمدت دیابت دچار می‌شود (۱). این بیماری اغلب همراه با بیماری‌های میکروواسکولار (Microvascular) (رتینوپاتی، نورپاتی، نفروپاتی) و بیماری‌های ماکروواسکولار (حمله قلبی، سکته مغزی، بیماری‌های عروق محیطی) است که باعث تعداد مرگ‌ومیر قابل‌توجهی شده است (۲).

شیوع دیابت طی دو دهه گذشته افزایش چشم‌گیری داشته است و تخمین زده‌اند که تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۴۳۸ میلیون نفر افزایش یابد (۳). به‌طورکلی دیابت به دو نوع دیابت نوع یک و دیابت نوع دو تقسیم می‌شود. در دیابت نوع یک، تخریب سلول‌های بتا در پانکراس منجر به نقص در تولید انسولین می‌شود و در دیابت نوع دو تخریب گیرنده‌های انسولین در سلول‌های بافت‌ها از بین می‌روند و مقاومت پیش‌رونده‌ی بدن به انسولین وجود دارد و درنهایت ممکن است منجر به تخریب سلول‌های بتا پانکراس و هایپرگلیسمی و نقص کامل در تولید انسولین منجر شود (۴). دیابت نوع یک و نوع دو، یک سبب‌شناسی (Etiology) ژنتیکی مشترک دارند (۵). علت ایجاد این بیماری مشخص نیست اما فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارند (۶).

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 (۷). پانکراس به میزان زیادی در تنظیم متابولیسم مواد مغذی درگیر است. اهمیت پانکراس در موازنه مواد مغذی در کل بدن به‌وسیله این حقیقت مشخص شده است که در شرایط پاتولوژیک مختلف مثل دیابت نوع یک و دو که درگیر در متابولیسم مواد مغذی‌اند، به عدم تنظیم سلول‌های پانکراس مربوط هستند؛ بنابراین مطالعه روی روش‌هایی که پلاستیسیتی (Plasticity) سلول‌های بتا را می‌تواند تنظیم کند یک گام مهم در توسعه استراتژی‌های مؤثر در درمان دیابت است (۸).

فاکتورهای مختلفی بر تمایز سلول‌ها به سلول‌های بتا در پانکراس اثر می‌گذارند ازجمله این فاکتورها عبارت‌اند از: Pax4، Pax6، MafA، Pdx-1، Neuro-D1، Hnf-1α و Hnf-3β هستند (۹).

Pax4 یک ژن زوج دومین هموباکس است که بیان آن در سلول‌های بتای پانکراس در دوران جنینی آغاز و تا بزرگسالی ادامه دارد (۱۰). این ژن در ترشح گلوکاگون، انسولین و سوماتواستاتین نقش دارد (۱۱) و برای تمایز، بقا و گسترش سلول‌های بتا پانکراس لازم است (۱۲). همچنین پروتئین‌های هومئودمین Pax4 را کد می‌کند که حضور آن‌ها برای تمایز سلول‌های بتا پانکراس ضروری است نقش اصلی این ژن کنترل تکوین سلول‌های بتا و دلتا است، تحقیقات نشان داده که موش‌هایی که فاقد Pax4 هستند سه روز بعد از تولد به دلیل نبود سلول‌های بتا و دلتا می‌میرند (۱۳). جهش در این ژن با دیابت نوع یک و نوع دو در ارتباط است و این نشان‌دهنده‌ی نقش کلیدی این ژن در ارتباط با سلول‌های بتا جزایر پانکراس است (۱۴). این ژن در موقعیت 4q22 در رت‌های نروژی نژاد ویستار قرار دارد که دارای ۱۷۸۲۲bp و ۱۲ اگزون است (۱۵).

از زمان‌های بسیار دور استفاده از گیاهان دارویی از اولین درمان‌های دیابت بوده است (۱۶). داورهای گیاهی نسبت به داورهای شیمیایی دارای سمیت کمتر و اثرات جانبی کمتر می‌باشند و اقبال عمومی برای مصرف آن‌ها بیشتر است (۱۷).

تاکنون بیش از ۲۱۰۰ گیاه دارویی در کاهش میزان قند خون و یا کاهش عوارض ناشی از آن شناخته شده است (۱۸). از جمله این گیاهان: خار مریم (Silybum marianum Gaertn)، خیار تلخ (Mamordica charantia L)، شنبلیله (Trigonella foenum graecum L)، سیاه‌گیله (Vaccinium Arctostaphylos L) و هندوانه ابوجهل (Citrullus colocynthis (L) Schrad) هستند (۱۹).

گیاه خار مریم یک گیاه یک یا دو ساله از خانواده کاسنیان است که در درمان اختلالات و بیماری‌های کبد استفاده می‌شود (۳۰). این گیاه بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران خصوصاً البرز مرکزی، خوزستان و آذربایجان رویش دارد (۲۱). عصاره بذر گیاه خار مریم حاوی یک ترکیبات فلاونوئیدی به نام سیلی‌مارین است (۲۲). فلاونوئیدها از ترکیبات بسیار مهم اکثر گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه‌ها می‌باشند، فلاونوئیدها از قبیل کوئرستین موجب ترشح انسولین و مهارکننده قوی تجمع سوربیتول در بافت‌های بدن می‌باشد (۲۳). سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان گلوتاتیون سلولی و ثبات غشای سلولی در طب سنتی جهت بهبود اختلالات کبد تجویز می‌شود (۲۲). تجویز این دارو برای افراد مبتلا به بیماری‌های کبدی موجب افزایش حساسیت سلولی به انسولین و در نتیجه کاهش میزان قند خون شده است (۲۴). سیلی‌مارین خواص مختلفی ازجمله: محافظت از کبد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطان و همچنین ضد دیابت دارد (۲۵).

دیابت باعث کاهش سلول‌های بتا و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شود سیلی‌مارین این اختلال و کاهش را بهبود می‌بخشد و همچنین به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش بیان انسولین می شود (۲۶). سیلی‌مارین شامل مخلوطی از چند ترکیب فنولی است که ایزومراز هم هستند که این ترکیبات سلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین نامیده می‌شوند (۲۷).

روش کار

تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰-۱۸۰ از شرکت دانته شهرکرد خریداری گردید و به اتاق حیوانات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. حیوانات در قفسه‌ای مخصوص خود نگهداری شدند و آب و غذا به اندازه کافی در اختیارشان قرار داده شد. برای تغذیه حیوانات از غذای مخصوص موش از شرکت خوراک دام کابیله اصفهان تهیه شده بود استفاده گردید و آب لوله‌کشی توسط شیشه‌های آبخوری در اختیارشان قرار می‌گرفت.

موش‌ها در ۷ گروه ۶ تایی دسته‌بندی و در قفس‌های مجزا نگهداری شدند آب و غذا برای همه یکسان بود و همچنین شرایط اتاق حیوانات در تمام طول دوره مطالعه در دمای ۲۲-۲۵ و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت در شبانه روز حفظ شد (۲۸).

گروه‌های مورد آزمایش که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، هر گروه شامل شش سر رت نژاد ویستار بود که همه گروه‌ها به‌جز گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی (B)، هر سه روز یک‌بار طی یک ماه (۱۰ نوبت در ماه) دوزهای مختلف داروهای سیلی‌مارین و متفورمین حل شده در آب مقطر را به‌صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند.

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

برای ایجاد دیابت از داوری استرپتوزتوزسین (STZ) (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت (۵۰ mg/kg) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۴/۵ با یک‌بار تزریق درون صفاقی دیابتی شدند. اثبات دیابتی بودن قند خون رت‌ها ۷۲ ساعت از زمان تزریق (STZ) در محدوده بالاتر از ۲۴۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود (۲۹،۳۰). سنجش قند خون همه گروه‌ها هر ده روز یک‌مرتبه با رعایت ۸ ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت گردید.

پس از پایان دوره آزمایش در روز سی‌ام حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شدند و سپس با استفاده از کلروفرم بی‌هوش شده پس از تشریح، مقداری از بافت پانکراس به نسب ۱ به ۴ در مایع حاوی RNAlater جهت اندازه‌گیری بیان ژن Pax4 ذخیره شد و مقداری هم‌جهت هیستوپاتولوژی بافت پانکراس در مایع فرمالین ۱۰ درصد (حجمی حجمی) (Sigma-aldrich) تثبیت شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن مورد بر بررسی در پژوهش حاضر از روش Real Time RT PCR (RT –qPCR) استفاده شد.

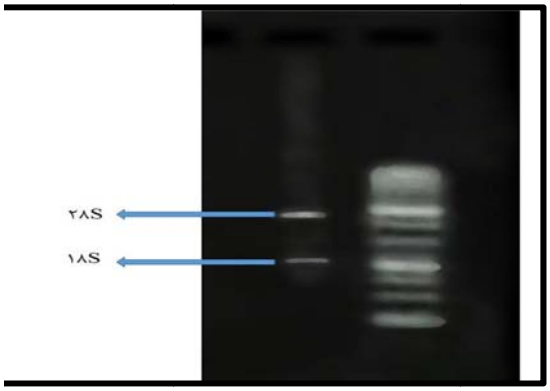
مراحل انجام تکنیک Real Time RT-PCR: استخراج RNA به‌وسیله هاون و ازت مایع و ترایزول ساخت شرکت کیان مطابق پروتکل استاندارد شرکت‌های سازنده انجام شد و Total RNA استخراج

جدول ۱- گروه‌های مورد آزمایش

گروه	نوع گروه	نوع داروی دریافتی	دوز داروی دریافتی	تعداد دفعات دریافت دارو
A	سالم شاهد	–	–	–
B	بیمار دیابتی (شاهد دیابتی)	–	–	–
C	بیمار دیابتی	سیلی‌مارین	۵۰ mg/kg	۱۰
D	بیمار دیابتی	سیلی‌مارین	۱۰۰ mg/kg	۱۰
E	بیمار دیابتی	سیلی‌مارین	۱۵۰ mg/kg	۱۰
F	بیمار دیابتی	متفورمین	۱۵۰ mg/kg	۱۰
G	سالم	سیلی‌مارین	۱۵۰ mg/kg	۱۰

شد و سپس برای حذف آلودگی ژنومی از کیت آنزیم DNase (شرکت Thermo) مطابق دستورالعمل این شرکت استفاده شد. پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن آن و همچنین میزان خلوص و عدم آلودگی ژنومی آن، از نظر کیفی به‌واسطه لود کردن روی ژل آگارز ۲ درصد (شکل ۱) و هم از نظر کمی به‌وسیله دستگاه نانودراپ میزان خلوص (OD) آن اندازه‌گیری شد که غلظت همه غلظت RNA ها بیشتر از ۹۰۰۰ ng/µl بود.

سپس مقداری از RNA برای ساخت cDNA استفاده شد. به این منظور از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا طبق دستورالعمل شرکت سازنده این کیت استفاده شد.



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

جدول ۲- پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن Pax4 و GAPDH

Gene	Primer
Pax4 Forward	5′-AGATGTTCCA GTGACACCACA-3
Pax4 Reverse	5′-CACAGGAAG GAGGGAGTGG-3′
GAPDH Forward	5′-TGGTGAAGGTCG GTGTGAACGGAT-3′
GAPDH Reverse	5′-TCCATGGTGGTG AAGACGCCAGTA-3′

برای تعیین میزان بیان ژن *Pax4* از ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای انتخابی این ژن‌ها ساخت شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی بودند. (الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول شماره ۲ آمده است).

در مرحله بعد به‌وسیله سیستم روتورژن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت سایبر مستر ریل‌تایم ساخت شرکت تاکارا کشور ژاپن مطابق دستورالعمل آن استفاده شد پروتکل دمایی مورداستفاده در دستگاه روتورژن در روش Real Time RT-PCR در جدول ۳ آورده شده است.

در انتها CTهای مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار سیستم Real Time RT- PCR استخراج و ثبت گردید. بعد از اتمام واکنش Real Time RT- PCR سیکل آستانه‌ی هر نمونه به‌صورت جداگانه به دست آمد؛ که با مقایسه‌ی سیکل آستانه ژن Pax4 با ژن مرجع (GAPDH)، می‌توان میزان بیان ژن موردنظر را به‌صورت کمی از فرمول Fold change $=2^{-\Delta\Delta ct}$ به دست آورد و میزان بیان ژن Pax4 در هفت گروه مختلف اندازه‌گیری شد.

روش آماده‌سازی بافت پانکراس جهت هیستوپاتولوژی: پانکراس درون فرمالین ۱۰ درصد قرار

جدول ۳- پروتکل دمایی مورداستفاده برای ژن Pax4 در دستگاه روتورژن

تعداد سیکل	دما	مدت زمان	مرحله
۱ سیکل	۹۴ºC	۴ دقیقه	Initial denaturation step
۴۰ سیکل	۹۴ºC	۲۰ ثانیه	Denaturation
	۶۱ºC	۲۰ ثانیه	Annealing
	۷۲ºC	۲۰ ثانیه	Extension

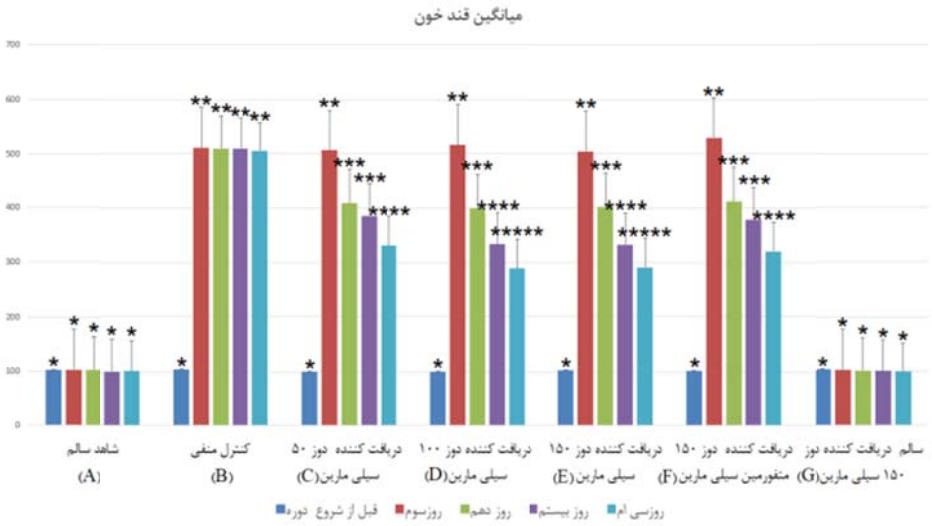
داده شد و پس از ثبوت، قالب‌های پارافینی و برش‌های با ضخامت ۵ میکرون با رنگ‌آمیزی معمول هماتکوکسیلین-ائوزین و رنگ‌آمیزی اختصاصی گوموری تهیه شد و از نظر هیستوپاتولوژی بررسی گردی. در هر گروه مقطع ۵ جزیره لانگرهانس بررسی و درمجموع ۱۰۰ هسته سلول شمارش گردید تعداد سلول‌های نکروز در ۱۰۰ سلول بیانگر درصد سلول نکروزِ بود. بر اساس شاخص‌های زیر ارزیابی گروه‌های مختلف آزمایش انجام گرفت: تخریب جزایر (از هر ۵ جزیره): عدم تخریب «۰»، تخریب ۱ جزیره «۱»، تخریب ۲ جزیره «۲»، تخریب ۳ جزیره «۳»، تخریب ۴ جزیره «۴» تخریب ۵ جزیره «۵». نکروز: عدم نکروز «۰»، نکروز کمتر از ۲۵ درصد سلول‌ها «۱»، نکروز ۵۰-۲۵ درصد «۲»، نکروز ۷۵-۵۰ درصد سلول‌ها «۳»، نکروز ۱۰۰ درصد سلول‌ها «۴». نفوذ سلول‌های التهابی: عدم التهاب «۰»، نفوذ سلول‌های التهابی کمتر از ۲۵٪ «۱»، نفوذ سلول‌های التهابی ۵۰-۲۵ درصد «۲»، نفوذ وسیع کانونی سلول‌های التهابی «۳»، نفوذ گسترده و وسیع سلول‌های التهابی «۴». همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی گوموری و با استفاده از نرم‌افزار Clemex vision شمارش سلول‌های بتا صورت گرفت. داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس از آزمون Tukey و Dunnet بررسی گردید. نتایج به‌صورت Mean± S.E.M ارائه شد. ملاک استنتاج آماری (p< ۰/۰۵) بود.

یافته‌ها

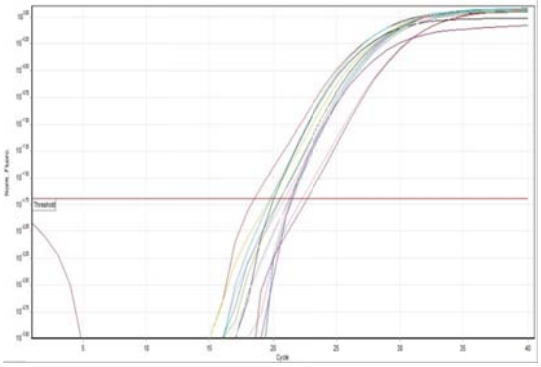
تغییرات قند خون رت‌ها: در ابتدا تغییرات قند خون در گروه‌های موردمطالعه بررسی شد. برای اندازه‌گیری قند خون هر ۱۰ روز یک‌بار قند خون ناشتای رت‌ها (۱۴ ساعت گرسنگی) با خون‌گیری از ناحیه دم و با استفاده از دستگاه گلکومتر اندازه‌گیری شد و نتایج گروه‌های تیمار و شاهد در نمودار ۱ آمده است.

نتایج Real Time RT-PCR: شکل‌های ۲و ۳ به ترتیب منحنی میزان تکثیر در ژن‌های GAPDH و Pax4 را نشان می‌دهد. که در شکل ۲ بیان ژن رفرنس (GAPDH) در همه نمونه‌ها یکسان بوده است و در شکل ۳ بیشترین بیان ژن Pax4 مربوط به گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (G) و بعد از آن به گروه‌های سالم شاهد(A)، دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی‌مارین (D)، دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (E)، دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین (F)، دریافت‌کننده دوز mg/kg ۵۰ سیلی‌مارین (C) و شاهد دیابتی (B) است.

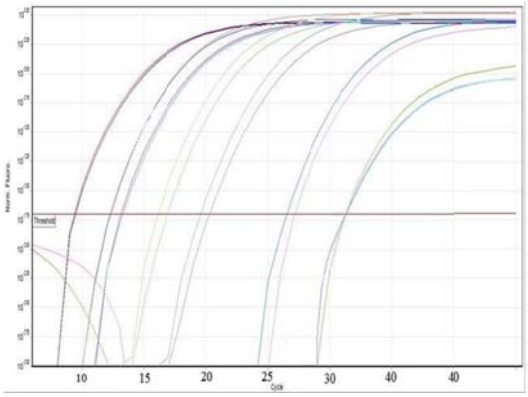
بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های A و B: بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی به‌عنوان کنترل منفی (B) نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن Pax4 در



نمودار ۱- تغییرات قند خون رت‌ها



شکل ۲- منحنی میزان بیان ژن GAPDH

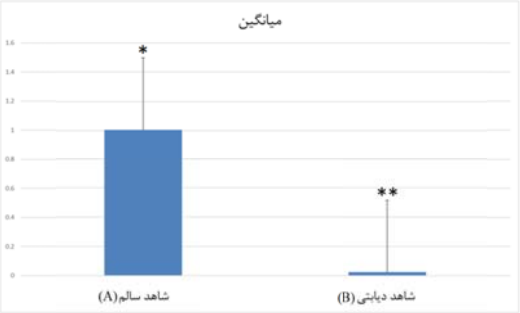


شکل ۳- منحنی میزان بیان ژن Pax4

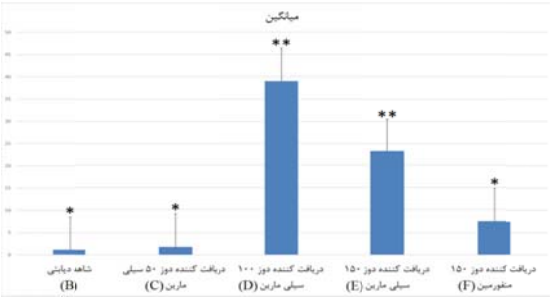
رت‌های دیابتی و سالم دارای اختلاف معناداری است (p= ۰/۰۰۰). در جدول و نمودار زیر بیان ژن Pax4 در دو گروه موش‌های شاهد سالم (A) و شاهد دیابتی (B) نشان داده شده است

بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های A-F: در گروه شاهد دیابتی (B) میزان بیان ژن به شدت پایین بوده است .در اینجا گروه دیابتی به عنوان رفرنس سایر گروه‌ها می‌باشد و برحسب این گروه P-Value سایر گروه‌ها بدست آورده شد. طبق تعریف اگر P-Value کمتر از ۰/۰۵ باشد یعنی بین گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد اما اگر eP-Valu بیشتر از ۰/۰۵ باشد یعنی اختلاف معناداری بین آن‌ها وجود ندارد. میزان بیان این ژن به صورت ستونی نیز در نمودار ۳ آورده شده است. بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های (A-F) نمودار ۳ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده بیان ژن Pax4 قبل از ایجاد دیابت در همه گروه‌ها بیان داشته و پس از ایجاد دیابت در گروهای بیمار به‌شدت افت پیدا کرده و بعد از استفاده از داروهای سیلی‌مارین و متفورمین تا حدودی



نمودار ۲- بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های A و B



نمودار ۳- بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های(A-F)

این کاهش بیان جبران شده است همچنین میزان بیان این ژن در گروه شاهد دیابتی (B) که دارویی دریافت نکرده است بسیار کم بود. میزان بیان این ژن به ترتیب گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (C)، گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین (F)، گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (E)، دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg (D)، بیشترین بیان را داشته‌اند؛ اما میزان بیان گروه‌های D و E نسبت به گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (C) و گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین (F) معنی‌دار بود. (p< ۰/۰۵)؛ میزان بیان در گروه‌های شاهد دیابتی (B) و گروه‌های بیمار دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (C) و گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین (F) معنی‌دار نبود (p> ۰/۰۵). دوز mg/kg ۱۰۰ داروی سیلی‌مارین (D) تأثیر بسزایی نسبت به همه دوزهای تیمار سیلی‌مارین و این دوز اثردهی بهتری نسبت به دوز ۱۵۰ mg/kg (E) داشته است که نشان‌دهنده عدم وابسته به دوز بودن اثر دهی سیلی‌مارین است. احتمالاً دوز ۱۵۰ mg/kg (E) به دلیل غلظت بالای آن توسط موش بیشتر دفع شده است علی رقم این یافته‌ها، نیاز به انجام تحقیقات

بیشتری است.

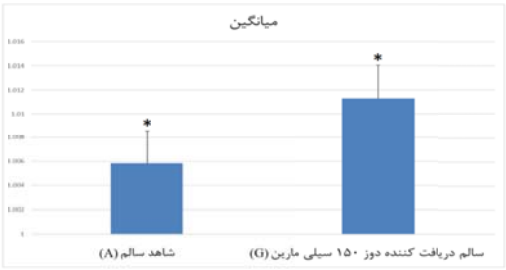
بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های A و G:

بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های شاهد سالم (A) و سالم دریافت‌کننده سیلی‌مارین (G) در نمودار ۴ نشان داده شده است.

این نتایج نشان داد که میزان بیان ژن Pax4 در گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (G) نسبت به گروه سالم شاهد (A) کمی افزایش یافته ولی این افزایش بیان معنی‌دار نبود (p= ۰/۹۷۱).

نتایج هیستوپاتولوژی: در شکل ۴ نگاره A-G نشان‌دهنده نتایج هیستوپاتولوژی گروه‌های مورد آزمایش است.

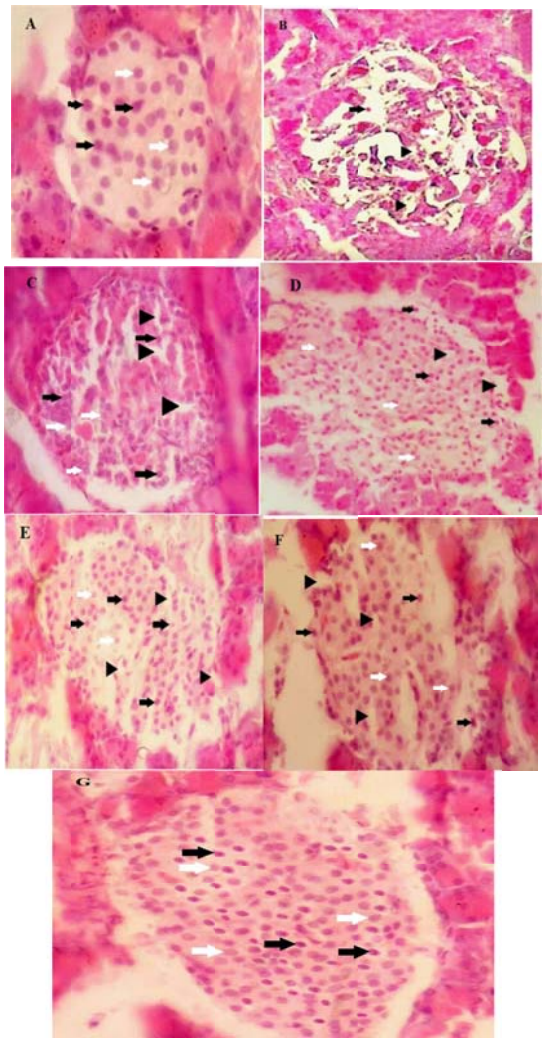
لازم به ذکر است که در همه گروه‌های درمانی نسبت به گروه شاهد دیابتی (B) ساختار بافتی بهبود یافته ولی در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی‌مارین (D) و همچنین گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (E) بهبود ساختار بافتی بهتر از گروه‌های دیگر بوده و این اختلاف معنی‌دار بود. (p< ۰/۰۵). همچنین بین گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ mg/kg سیلی‌مارین (D) و گروه سالم شاهد (A) اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (p> ۰/۰۵). اما بین گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (C) و گروه دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg متفورمین (F) و گروه شاهد دیابتی (B) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. (p> ۰/۰۵). همچنین بین گروه سالم شاهد (A) و گروه سالم دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg سیلی‌مارین (G) اختلاف معنی‌دار نبود. (p> ۰/۰۵).



نمودار ۴- بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه‌های A و G

جدول ۴- درصد فراوانی سلول‌های بتا

درصد فروانی گروه‌ها	A	B	C	D	E	F	G
درصد فروانی سلول‌های بتا	٪۱۷	٪۱۲	٪۲۷	٪۶۲	٪۵۵	٪۳۵	٪۲۷



شکل ۴- رنگ‌آمیزی همه اشکال (H&E)، با بزرگنمایی X40 شکل A- گروه سالم شاهد (A) وجود سلول‌های بتا پیکان سیاه وجود سلول‌های آلفا پیکان سفید. شکل B- پانکراس در گروه شاهد دیابتی (B)؛ نکروز شدید و وجود واکوئل نوک پیکان سیاه، وجود تعداد کمی سلول بتا پیکان سیاه، وجود تعداد کمی سلول آلفا پیکان سفیدرنگ. شکل C- گروه تیمار دریافت‌کننده دوز ۵۰ سیلی‌مارین (C) وجود واکوئل نوک پیکان سیاه وجود سلول‌های بتا یکان سیاه، وجود سلول‌های آلفا پیکان سفیدرنگ. شکل D- گروه تیمار دوز ۱۰۰ سیلی‌مارین (D)؛ نکروز کمتر و وجود واکوئل نوک پیکان سیاه، وجود سلول بتا پیکان سیاه، وجود سلول آلفا پیکان سفیدرنگ. شکل E- گروه تیمار دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ سیلی‌مارین (E)؛ نکروز کم و وجود واکوئل نوک پیکان سیاه، وجود تعدادی سلول بتا پیکان سیاه، وجود تعدادی سلول آلفا پیکان سفیدرنگ. شکل F- گروه تیمار دریافت‌کننده متفورمین شاهد دارو (F)؛ نکروز و وجود واکوئل نوک پیکان سیاه، وجود تعدادی سلول بتا پیکان سیاه، وجود تعدادی سلول آلفا پیکان سفیدرنگ. شکل G- شاهد دریافت‌کننده داروی سیلی‌مارین (G)؛ وجود سلول بتا پیکان سیاه، وجود سلول آلفا پیکان سفیدرنگ.

در جدول شماره ۴ درصد فروانی سلول‌های بتا آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

والنزولا و همکاران در سال ۱۹۹۴ دریافتند که سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که اثرات محافظتی آن بر روی پراکسیداسیون اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۳۱). ستوا و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که سیلی‌مارین مانع از افزایش گلوکز پلاسما و پراکسیداسیون لیپید پانکراس در دیابت ناشی از آلوکسان در موش صحرایی است (۳۲). در سال ۱۹۷۶ استوکینر و همکاران دریافتند که سیلی‌مارین و سیلیبینین به‌عنوان مواد محافظتی سیتوپلاسمی عمل می‌کنند (۳۳). در تحقیق سوتو و همکاران در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۳ نشان دادن سیلی‌مارین باعث افزایش فعالیت پانکراسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود و افزایش گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و سموم حاصل از استرپتوزوتوسین می‌شود (۳۴). شواهد ارائه‌شده در این تحقیق حاکی از آن است که سیلی‌مارین نه‌تنها باعث کاهش دیابت ایجادشده با استرپتوزتوزسین می‌شود بلکه باعث بهبودی پانکراس و بازگرداندن آن به عملکرد طبیعی‌اش نیز می‌شود.

هانت همکاران در سال ۱۹۹۹ دریافتند که در حالت‌های هیپرگلیسمی رادیکال‌های آزاد افزایش قابل‌توجهی می‌یابند علاوه بر این، گلوکز به همراه فلزات اکسید می‌شود و تولید رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و کیت‌آلدئیدهای واکنشی می‌کند (۳۵). آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسید آسکوربیک، ویتامین E گلوتاتیون را در هر دو هر دو نوع دیابت کاهش می‌یابد (۳۶،۳۷). والنزولا و همکاران نیز در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که از این رو سیلی‌مارین که یک آنتی‌اکسیدان قوی است باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود و اثرات دفاعی زیادی برای بدن دارد همچنین گلوتاتیون را کاهش می‌دهد (۳۸). در سال ۱۹۹۶ یوتریلا و همکاران مکانیسم‌های محافظت‌کننده از سیلی‌مارین شامل تعدادی از وقایع مختلف بیوشیمیایی است. نشان داده شده است که سیلی‌مارین از طریق تحریک پلیمراز I و رونویسی rRNA سنتز RNA ریبوزومی (rRNA) را افزایش می‌دهد (۳۹). سوتو (Soto) و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی‌مارین که بر عملکرد لوزالمعده روی موش‌های صحرایی انجام شد دریافتند که سیلی‌مارین باعث بهبود عملکرد لوزالمعده، بیان پروتئین انسولین و گلوکاگون پس از تخریب پانکراس توسط استرپتوزوسین در موش می‌شود (۴۲). نتایج در این تحقیق حاکی از آن است که سیلی‌مارین نه‌تنها باعث کاهش دیابت ایجادشده با استرپتوزتوزسین می‌شود بلکه باعث بهبودی پانکراس و بازگرداندن آن به عملکرد طبیعی‌اش نیز می‌شود.

سلول‌های انسولین ساز با بیان مداوم ژن Pax4 در سلول‌های بنیادی جنینی توسط بلیسزوک و همکارانش تولید شدند. آن‌ها تلاش کردند تا نشان دهند با استفاده از روش ساده‌ی ترانسفکشن ژن Pax4 می‌توان سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های انسولین ساز 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 ترشح‌کننده انسولین تمایز یافتند. در طی این مدتی که اجسام شبه جنینی به‌صورت قطره‌های آویزان هستند که ژن‌های مخصوص آندودرم در آن‌ها بیان می شوند (۱). 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 پیش سازهای آن‌ها می‌شود. کلومبات و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مقاله‌ای تحت عنوان بیان بیش از حد ژن Pax4 در پانکراس موش و تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های آلفا و پس از آن به سلول‌های بتا به این نتیجه رسیدند که بیان نابجا و بیش‌ازحد ژن Pax4 بر پانکراس در حال تکوین موش‌های ترا ریخته منجر به پیدایش جزایر لانگرهانس بزرگ می‌شود که این جزایر به‌طور عمده از سلول‌های بتا تشکیل شده‌اند (۲). این نتایج نشان‌دهنده‌ی این است که بیان این ژن باعث افزایش سلول‌های بتا و آلفا می‌شود که نتایج به‌دست آمده از هیستوپاتولوژی ما هم گویای این نتیجه است. در مطالعه‌ای تحت عنوان اثر سیلی‌مارین در بیان ژن Pdx-1 و گسترش سلول‌های

بتای پانکراس در یک مدل پانکراتومی که توسط سوتو 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 تولیدکننده‌ی انسولین را افزایش دهد (۳). این نتایج با نتایج ما همسو بود.

با توجه به نقش مهم ژن Pax4 در پانکراس که وظیفه تمایز و بقا و گسترش سلول‌های بتا پانکراس و همچنین در ترشح گلوکاگون، انسولین و سوماتواستاتین نقش دارد و طبق به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش و پژوهش‌های پیشین بر مفید بودن داروی سیلی‌مارین این دارو می‌تواند جایگزینی مناسب برای داروهای مورداستفاده برای دیابت نوع یک باشد. البته نیازمند تحقیقات بیشتری بر رو این دارو و دیابت هستیم.

در دنیا میلیون‌ها نفر به دیابت مبتلا هستند و استفاده از داروهایی شیمیایی می‌تواند برایشان ضرر آور باشد و این داروها یا انسولین‌اند و یا داروهای شیمیایی دیگر فقط قند خون را کنترل می‌کنند بنابراین استفاده از دارویی که هم قند خون را کنترل کرده هم باعث بازگشت عملکرد طبیعی پانکراس و بازسازی آن می‌شود خیلی مقرون به‌صرفه‌تر است، علاوه بر یافته‌های ما، گزارش شده است که سیلی‌مارین هیچ عارضه جانبی ایجاد نمی‌کند، اگرچه مطالعات بیشتری برای نشان دادن خواص مفید آن در انواع دیابت ضروری است، در نتیجه شواهد ارائه‌شده در این تحقیق حاکی از آن است که سیلی‌مارین نه‌تنها باعث کاهش دیابت ایجادشده با استرپتوزتوزسین می‌شود بلکه باعث بهبودی پانکراس و بازگرداندن آن به عملکرد طبیعی‌اش نیز می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می باشد 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.

References

Meusel LA, 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. Front Aging Neurosci; 2014.8(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(4):316-322.

3.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):543-550.

4. Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. Diabetologia; 2001.44(7):914-922.

5. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. Nat Genet; 2006.38(3):320-323.

6. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A sixfold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. Ann Med; 2005.37(1):67-72.

7. Guyton A, Hall JE. Insulin, Glucagon and diabetes medical Physiology. Translation Sepehri H, Rastgar Farajzadeh A, ghassemi K. 4th ed Tehran Andishhe Rafie perssm. 2011:1194-1215.

8. Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardevol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. Compr Rev Food Sci F; 2008.7:299-308.

9. Chakrabarti SK, Mirmira RG. Transcription factors direct the development and function of pancreatic β cells. TRENDS Endocrinol Metabol; 2003;14(2):78-84.

10. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. Genes Develop; 1992.6(12):2620-2634.

11. Tamura T, Izumikawa Y, Kishino T, Soejima H, Jinno Y, Niikawa N. Assignment of the human Pax4 gene to chromosome band 7q32 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet, Cell Genet; 1994.66(2):132-134.

12. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. Nature; 1997.386(6623):399-402.

13. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. Pnas; 2003;100(3):998-1003.

14. Mellado-Gil JM, Jimenez-Moreno C, Martin-Montalvo A, Alvarez-Mercado AI, Fuente-Martin E, Cobo-Vuilleumier N, et al. Pax4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. Diabetologia; 2016.59(4):755-765.

15. Tokuyama Y, Yagui K, Sakurai K, Hashimoto N, Saito Y, Kanatsuka A. Molecular cloning of rat Pax4: identification of four isoforms in rat insulinoma cells. Biochem Biophysic Res Commun; 1998;248(1):153-156.

16. Ashrafi-Hellan C, Yazdan-e Parast, Ismaili M, Norouzi M. Pathological Study of the Effect of Theocyrium Polium Extract on Pancreas, Liver and kidney of diabetic rats caused by streptozotocin injection. J Pharm Sci; 1389:16 (1):11-20.

17. Ranjbar B, Pourbaloli, Merciful M, Javadi A. Effect of methanolic extract of carrot seeds on carbohydrate metabolism and pancreatic morphology in male rats with type 1 diabetes mellitus. J Physiol Pharm; 1389:4 (1):85-93.

18. Shamsi F, Asgari S, Rafiyan M, Kazemi S, Adelnya A. Effect of Cornus mas L on Blood Glucose, Insulin and Histopathology of Pancreas in Alloxan-Induced Diabetic Rats. J Isfahan Med Sch1390; 19 (147): 929-938.

19. Fallah Huseini H, Fakhrzadeh H, Larijani B, Shikh Samani A. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. JMP; 2006:1(S2):1-8

20. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. milk thistle in liver diseases: past, present, future. phytother res; 2010;24(10):1423-1432.

21. Fallah Huseini H, Yazdani D, Amin G, Makkizadeh M. Milk thistle and cancer. JMP; 2005:1(S1):46-53

22. Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. Silybin dihemsuccinate protects against glutathioine depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. Plant Meidca; 1998:55(5):417-419.

23. Sakai I, Izumi SI, Murano T, Okuwaki S, Makino T, Suzuki T. Presence of aldose reductase inhibitors in tea leaves. Jpn J Pharmacol; 2001:85(3):322-326.

24. Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, 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 Hepatol; 1997:26(4):871-879.

25. Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J. Silymarin: A review of Pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. Indian J Pharamacol; 2007:39(4):172-179.

26. Soto C, Raya L, Pereza J, Gonzalez I, Perez S. Silymarin Induces Expression of Pancreatic Nkx6.1 Transcription Factor and β-Cells Neogenesis in a Pancreatectomy Mode. Molecules; 2014:19(4):4654-4668.

27. Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J. Analysis of the active components of Silymarin. J Chromatog; 2003:990(1-2):239-245.

28.Musavi Ezmar SF, Moazeni M, Heidarian A, Alipanahmoghadam R, Rafieian M, Ebrahimi M. The effect of the extract Chevilan (Ferulago angulate) on glucose and lipid in diabetic rats. J Clin Endocr Metab; 2015:3:237-230.

29. Hedayati M, Pouraboli I, Pouraboli B. Effect of Methanolic Extract of Otostegia persica on Serum Levels of Glucose and Lipids in Type I Diabetic Male Rats. J Clin Endocr Metab; 2010: 12 (4):435-442.

30. Moinifard M, Hedayati M. Alloxan and streptozotocin, a diabetes research tool. J Appl Exerc Physiol; 1393:10 (20):13-22.

31. Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol Res; 1994:27(2):105–112.

32. Soto CP, Perez BL, Favari LP, Reyes JL. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol: 1998:119(2):125–129.

33. Stockinger l, Trost w, Uebel h. Quantification électronique des lesions hépatiques experimentales, mises en evidence en histologic. Arch Anat Cytol Pathol; 1976:24: 203-209.

34. Soto C, Recoba R, Barro´n H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes mellitus in the rat pancreas. Comp Biochem Phys; 2003:136(3):205–212.

35. Hunt J, Dean R, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation glucose autoxidation as the cause of oxidative damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochem J; 1998:256(1):205–212.

36. Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E, Tamer S. Oxidant and antioxidant systems in niddm patients: influence of vitamin E supplementation. Endocrin Research; 2001:27(3):377–386.

37. Som S, Basu S, Mukherjee D, Deb S, Choudhury PR, Mukherjee S, Chatterjee SN, Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. Metabolism; 1981:30(6):572-577.

38. valenzuela A, Aspillaga, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin in the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. Planta Medica; 1989:55(5):420–422

39. Utrilla M. Natural products with hepatoprotective action. Methods Find Experimental Clinic Pharmac; 1996:11–12.
40. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. Proc Natl Acad Sci U S A: 2003:100(3):998-1003.
41. 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):449-462.
42. 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):233-239.