مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تیمول بر بیان ژن Pax4 در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

مریم سلیمی بنی: کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

حسین سازگار: استادیار و متخصص فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (*نویسنده مسئول)
hoseinsazgar@yahoo.com

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

چکیده

زمینه و هدف: ژن PAX4 فاکتورهای رونویسی حیاتی را برای تکوین و تمایز سلولی رمزگذاری می‌کنند. PAX4 برای تولید اجداد سلولی جزایر پانکراس و تمایز آن‌ها به سلول‌های بتا ضروری است. عملکرد صحیح این ژن نه تنها در تکوین بلکه در بقا و ترمیم سلول‌های بتا نیز ضروری است و جهش‌های موجود در آن با دیابت نوع یک و دو همراه است. در همین راستا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر تیمول بر بیان ژن PAX4 در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین طراحی و اجرا شد.

روش کار: در این مطالعه مورد–شاهدی ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به طور تصادفی در ۷ گروه شش تایی توزیع شدند. گروه A: گروه شاهد سالم، گروه B: هر سه روز یک بار طی یک ماه در هر نوبت ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمول به صورت گاواژ دریافت می‌کنند، گروه C: دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است و گروه کنترل منفی (شاهد دیابتی)، گروه D: داروی کاهنده ی قند خون (متفورمین) به مقدار ۸۰ میلی گرم برکیلو گرم به صورت گاواژ دریافت می‌کنند، گروه E و G و F گروه تیمار هستند که به ترتیب ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلو گرم تیمول به صورت گاواژ دریافت می‌کنند. جهت بررسی تغییر بیان ژن PAX4 از تکنیک Real Time – PCR استفاده شد. آنالیز اطلاعات مربوطه با استفاده از نرم‌افزار SPSS V.22 صورت گرفت و از آزمون آنالیز واریانس جهت مقایسه آماری نمونه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن PAX4 در موش‌های دیابتی تیمار شده با دوزهای مختلف تیمول دارای تفاوت معنی داری نسبت به گروه دیابتی شاهد می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$). بنابراین استفاده از ماده مؤثره تیمول سبب افزایش بیان ژن PAX4 در سلول‌های بتای پانکراس در رت‌های دیابتی شده که این افزایش بیان به صورت وابسته به دوز بود.

نتیجه‌گیری: تیمول می‌تواند با افزایش بیان PAX4 و کاهش غلظت گلوکز خون به بهبود بیماری در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس در نظر گرفته شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

تیمول،
بیان ژن،
PAX4،
دیابت،
استرپتوزوتوسین

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۶

شیوه استناد به این مقاله:

Salimi Beni M, Sazegar H, Zia Jahromi N. Evaluation of the effect of thymol on Pax4 gene expression in Streptozotocin-induced diabetic rats. Razi J Med Sci. 2020;27(3):27-37.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

Razi Journal of Medical Sciences.2020;27(3):27-37. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of the effect of thymol on Pax4 gene expression in Streptozotocin-induced diabetic rats

Maryam Salimi Beni, MSc, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Hosein Sazegar, PhD, Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (*Corresponding author) hoseinsazgar@yahoo.com
Noosha Zia Jahromi, PhD, Assistant Professor of biochemistry, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Background: The PAX4 gene encodes crucial transcription factors for cellular differentiation and development. PAX4 is essential for the production of pancreatic islet cell ancestors and their differentiation into beta cells. Proper function of this gene is essential not only in development but also in the survival and repair of beta cells, and mutations in it are associated with type 1 and type 2 diabetes. The present study was designed to investigate the effect of thymol on PAX4 gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice.
Methods: In this study, 42 adult Wistar rats were randomly divided into 7 groups of six. Group A: healthy control group, group B: receive 160 mg/kg thymol by gavage every three days once a month, group C: streptozotocin-diabetic, and negative control group (diabetic control), Group D: Glycemic drug (metformin) 80 mg/kg gavage, group E, G and F are treatment group that gavage 40, 80 and 160 mg/kg, respectively they receive. Real time - PCR technique was used to evaluate the expression of PAX4 gene. Data analysis was performed using SPSS V.22 software and ANOVA was used for statistical comparison of samples.
Results: The present study showed that the expression of PAX4 gene in diabetic rats treated with different Thymol doses had a significant difference compared to the diabetic control group (P-value < 0.001). In this case, the use of Thymol has led to an increase in the expression of PAX4 gene in pancreatic beta cells in diabetic rats, which was a dose-dependent increase of expression.
Conclusion: Thymol can be considered to improve disease in patients with diabetes mellitus by increasing PAX4 expression and decreasing blood glucose concentration.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Thymol,
Gene expression,
PAX4,
Diabetese,
Streptozotocin

Received: 04/01/2020
Accepted: 25/04/2020

Cite this article as:
Salimi Beni M, Sazegar H, Zia Jahromi N. Evaluation of the effect of thymol on Pax4 gene expression in Streptozotocin-induced diabetic rats. Razi J Med Sci. 2020;27(3):27-37.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

مقدمه

پانکراس مهره داران یک اندام اندودرمی خاص است. پانکراس کاربردهای ضروری در گوارش، هضم غذا و همئوستازی گلوکز دارد. پانکراس بالغ از دو بخش تشکیل می‌شود. بخش برون ریز شامل سلول‌های آسینار و مجرا است که تولید و انتقال آنزیم‌های گوارشی را به روده انجام می‌دهند. بخش درون ریز شامل جزایرلانگرهانس است. این جزایر دارای چهار نوع سلول می‌باشند به نام آلفا، بتا، دلتا و سلول‌های تولید کننده پلی پپتید که به ترتیب گلوکاگون، انسولین، سوماتواستاتین و سلول های پلی‌پپتیدهای پانکراس را ترشح می‌کنند (۱). سلول‌های آلفا و بتا در هماهنگی برای حفظ قند خون عمل می‌کنند، سلول‌های آلفا گلوکاگون را در پاسخ به گلوکز پایین برای تحریک گلیکوژنولیز در کبد آزاد می‌کنند. در مقابل سلول‌های بتا انسولین را در پاسخ به گلوکز بالا برای تحریک دفع گلوکز محیطی آزاد می‌کنند و نقش مخالف در همئوستازی گلوکز ایفا می‌کنند (۲). همه اشکال دیابت (دیابت شیرین) به صورت مشترک ناشی از فقدان عملکرد مناسب توده سلول‌های بتا هستند (۳). دیابت ملیتوس یک بیماری شایع است که با هایپرگلایسمی ناشی از تولید ناکافی انسولین و یا مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود. دیابت ملیتوس به دو گروه اصلی تقسیم می‌شود. دیابت نوع یک، نوعی بیماری خود ایمنی است که در آن سلول‌های بتا ترشح کننده انسولین در جزایر پانکراس به طور دائم توسط حملات خودایمنی آسیب می‌بینند و در نتیجه انسولین تولید نمی‌شود یا به طور ناقص تولید می‌گردد. در دیابت نوع یک میزان تخریب سلول‌های بتا کاملاً متغییر است. در برخی افراد سریع (به طور عمده نوزادان و کودکان) و در دیگران آهسته (عمدتاً بزرگسالان) است و تنها ۵ درصد افراد دیابتی مبتلا به دیابت نوع یک هستند. دیابت نوع دو هنگامی رخ می‌دهد که پانکراس به مقدار کافی انسولین تولید نمی‌کند و یا بافت‌های بدن به سطح نرمال یا حتی بالا انسولین مقاوم می‌شوند، این افراد ۹۵ درصد افراد دیابتی را شامل می‌شوند (۴و۵). عواملی مانند محیط زیست و استعداد ژنتیکی از عوامل اصلی هستند که بر پیشرفت این بیماری تأثیر می‌گذارند (۶). بروز جهانی دیابت ملیتوس به طور نگران کننده در ده سال گذشته افزایش یافته است، تخمین زده می‌شود این اختلال ۵۵۲ میلیون نفر را تا سال ۲۰۳۰ تحت تأثیر قرار دهد. در ایران بررسی ها حاکی از آن است که بیشترین شیوع دیابت در تهران و کمترین شیوع در کرمانشاه مشاهده شد و شیوع دیابت در شهرها بیشتر از روستاها است. همچنین به نظر می رسید که در بیشتر استان ها ابتلای زنان بیش از مردان باشد. تغییر شیوه زندگی که منجر به کاهش فعالیت بدنی می‌شود و افزایش چاقی به عنوان عوامل اصلی برای افزایش احتمال بروز دیابت می‌باشند. درمان‌های موجود برای دیابت نوع یک و بیماران طولانی مدت دیابت نوع دو بر روی منابع خارجی انسولین متمرکز شده است. با این حال با وجود اثرات مفید درمان با انسولین بر روی همئوستازی گلوکز، مدیریت ضعیف بیمار اغلب منجر به عوارض دیابت مانند بیماری‌های رتینوپاتی، نفروپاتی، قلبی عروقی و همچنین بیماری‌های عروق مغز می‌شود (۴و۷). عوارض جانبی ناشی از این مدیریت ضعیف که زندگی را تهدید می‌کند نشان دهنده یک نیاز استراتژی درمانی جدید برای حفظ و افزایش سلول‌های بتا عملکردی و در نتیجه همئوستازی گلوکز بدون عوارض جانبی مشتق شده از درمان است (۸). در حال حاضر مخلوطی از عوامل رشد و فاکتورهای رونویسی، توانایی حفظ و افزایش توده سلولی بتا را نشان می‌دهند. ناپولیتانو و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی پژوهشی بیان کردند که PAX4 نقش کلیدی در تکوین و پلاستیسیتی یا شکل پذیری پانکراس ایفا می‌کند. در واقع موش‌هایی که فاقد PAX4 بودند در اثر هایپرگلایسمی ناشی از فقدان سلول‌های بالغ پانکراس چند روز پس از زایمان می‌میرند (۹) و همچنین زانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ در طی پژوهشی بررسی کردند که آیا انتقال ژن PAX4 به سلول‌های آلفا می‌تواند آن‌ها را به سلول‌های بتا عملکردی تبدیل کند؛ نتایج این آزمایش نشان داد که دستکاری ژن PAX4 یک

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

راهبرد درمانی مناسب برای درمـان دیابـت وابسـته بـه انسولین است (۱۰).

خانواده ژن PAX شامل ۹ عضو است کـه بـه صـورت PAX1 تا PAX9 نام‌گذاری مـی‌شـوند . در ایـن میـان ژن‌های PAX4 فاکتورهـای رونویسـی حیـاتی را بـرای تکوین و تمایز سلولی رمزگذاری مـی‌کننـد. PAX4 بـه طور معمول تنها در زیر مجموعـه‌ای از غـدد درون ریـز بیان می‌شود که به سلول‌های بتا و دلتا تبدیل خواهنـد شد. PAX4 برای تولید اجداد سلولی جزایر پـانکراس و تمایز آن‌ها به سـلول‌های بتـا ضـروری اسـت. عملکـرد صحیح این ژن نه تنها در تکوین بلکـه در بقـا و تـرمیم سلول‌های بتا نیز ضروری است و جهش‌های موجـود در آن با دیابت نوع یک و دو همراه است (۷و۱۱).

تیمـول (۲- ایزوپروپیـل - ۵ - متیـل فنـل) فنـل مونوترپن اصلی واقع در روغن استخراج شده از گیاهـان خانواده نعناعیان (مانند جنس آویشن، پونه کوهی، مرزه و ریحـان) و گیاهـان دیگـری ماننـد اعضـای خـانواده شاهپسندیان، گل میمون، آلالگان و چتریـان می‌باشـند. این اسانس در صنایع غذایی بـه عنـوان طعـم دهنـده و نگه‌دارنده استفاده می‌شود. تیمول و منبع طبیعی اصلی آن آویشن، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد التهـاب، ضد درد، بی حسی موضـعی، ضـد عفـونی کننـده، ضـد باکتری، ضد قارچ و ضـد دیابـت می‌باشـند و همچنـین دارای اثرات سودمندی بر روی سیستم قلبـی و عروقـی هســـتنند (۱۱و۱۲). استرپتوزوتوســـین همـــان ۲- دزوکسی-۲- (N متیل،N نیترو اوره)- D-گلوکو پیرانـوز می‌باشـد. ایـن مـاده از استرپتومایسـیت آکرومـوژنز بـه دست می‌آید. بخش متیل نیترو اوره، بخش نیمه سمی آن اسـت و نیمـه دیگـر آن بـه دلیـل داشـتن شـباهت مولکولی با گلوکز، استرپتوزوتوسین را به عنوان آنـالوگ گلوکز مطـرح کـرده اسـت. استرپتوزوتوسـین مـاده ای آبدوست یـا هیـدروفیل اسـت و عـاملی آلکیلـه کننـده می‌باشد. این ماده شیمیایی در pH برابربا ۷/۴ و دمـای ۳۷ درجـــه ســـانتی گـــراد نســـبتاً پایـــدار اســـت. استرپتوزوتوسین برای القای هر دو نوع دیابت (I و II) به کار می‌رود.

در نهایت با توجه به نقش ضد التهابی و ضـد دیـابتی تیمول و همچنـین بـا در نظـر گـرفتن عملکـرد آن در تغییرات بیماری دیابت تصمیم گرفتـه شـد تـا در ایـن مطالعه اثر تیمـار تیمـول بـر روی بیـان ژن PAX4 در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد بررسـی قرار گیرد.

روش کار

جامعه آماری: به منظور انجـام ایـن مطالعـه مـورد-شاهدی از ۴۲ سر موش صحرایی ویستار نر بالغ ۶ هفته ای با وزن ۲۷۰-۲۰۰ گـرم اسـتفاده شـد. مـوش هـا از شرکت پرورش حیوانـات آزمایشـگاهی دانتـه شـهرکرد خریداری و در لانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد شهرکرد با تهویه مناسب و چرخه‌ی ۱۲ ساعت تـاریکی و ۱۲ ساعت نور نگهداری شدند. به منظور سازش موش ها با محیط جدید، حیوانات به مدت یک هفته در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی گـراد و نـور مناسـب نگهـداری و سـپس تحـت تیمـار قـرار گرفتنـد (۱۳). مـوش هـا بـا استفاده از غذای آماده استاندارد که از شـرکت خـوراک دام کابیله تهیه شده بود، تغذیه شدند. حیوانات در طول این دوره از نظر خـوردن و آشـامیدن هـیچ محـدودیتی نداشتند.

گروه بندی و روش تیمار: موش‌ها به طور تصـادفی به ۷ گروه مساوی به ترتیب زیر توزیع شدند.

گروه A: شش سر موش سالم کـه فقـط روزانـه آب و غذای استاندارد دریافت کردنـد و گـروه شـاهد سـالم را تشکیل می‌دهند.

گروه B: شش سر مـوش سـالم اسـت کـه روزانـه آب معمولی، غذای استاندارد و هر سه روز یک بار طی یـک ماه در هر نوبت ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلـوگرم تیمـول بـه صورت گاواژ دریافـت کردنـد ایـن گـروه، گـروه شـاهد دریافت کننده تیمول را شامل می‌شوند. گروه C: شامل شش سر موش دیابتی شده با استرپتوزوتوسـین اسـت که روزانه فقط آب معمولی و غـذای اسـتاندارد دریافـت کردند و گروه کنترل منفی (شـاهد دیـابتی) را تشـکیل می‌دهند. گروه D: که شامل شـش سـر مـوش دیـابتی شده با استرپتوزوتوسین اسـت و ایـن گـروه روزانـه آب معمولی، غذای استاندارد و داروی کاهنده ی قند خـون (متفورمین) هر سه روز یک بار طی یک ماه در هر نوبت به مقدار ۸۰ میلی گرم برکیلـو گـرم بـه صـورت گـاواژ دریافت کردند این گروه، گروه کنترل مثبت را تشـکیل می‌دهند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

گروه E: گروه تیمار یک شامل شش سر موش دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است که روزانه آب معمولی، غذای استاندارد و هر سه روز یک بار طی یک ماه در هر نوبت ۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم تیمول به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه F: گروه تیمار دو شامل شش سر موش دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است که روزانه آب معمولی، غذای استاندارد و هر سه روز یک بار طی یک ماه در هر نوبت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمول به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه G: گروه تیمار سوم شامل شش سر موش دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که روزانه آب معمولی، غذای استاندارد و هر سه روز یک بار طی یک ماه در هر نوبت ۱۶۰ میلی گرم بر کیلو گرم تیمول به صورت گاواژ دریافت کردند. لازم به ذکر است که پیش از آغاز مطالعه، مجو زهای لازم جهت استفاده از این تعداد حیوان آزمایشگاهی از دانشگاه آزاد شهرکرد اخذ شد.

نحوه ایجاد دیابت در رت‌ها: در این مطالعه از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین برای ایجاد مدل دیابتی استفاده شد. در ابتدا وزن و گلوکز خون حیوانات مورد مطالعه بعد از ۱۲ الی ۱۴ ساعت حالت ناشتا اندازه گیری شد. سپس استرپتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات (pH = ۴/۵ و ۰/۱ M) با دوز ۵۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی و تک دوز تزریق گردید. انتخاب این دوز از ماده با توجه به مطالعات انجام شده در این زمینه و همچنین انجام آزمایشات مقدماتی صورت گرفت (۱۶). دو تا سه روز بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، غلظت گلوکز خون با تهیه نمونه خون وریدی ازدم حیوانات و با استفاده از دستگاه گلوکومتر و نوار تست قند خون اندازه گیری گردید. حیواناتی با سطح گلوکز خون ۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر یا بالاتر به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. علائم پر نوشی و تکرر ادرار در تمام حیواناتی که به آن ها استرپتوزوتوسین تزریق شده بود مشاهده گردید.

مرحله گاواژ و جراحی: در این مرحله مقدار تیمول (خریداری شده از شرکت سیگما) مورد نیاز برای گروه‌های دریافت کننده تیمول بر اساس میزان دوز مصرفی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با ترازوی دیجیتال محاسبه گردید و برحسب دوز دریافت کننده تیمول در روغن زیتون حل شده و با آب مقطر به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد و به صورت خوراکی و با سرنگ گاواژ هر سه روز یکبار در طی یک ماه به موش‌ها داده شد در گروه دریافت کننده متفورمین نیز مقدار متفورمین بر اساس دوز مصرفی به ازای هر کیلو گرم وزن بدن با ترازوی دیجیتال محاسبه گردید و در۲ میلی لیتر آب مقطر حل شده و به صورت گاواژ به موش‌های این گروه داده شد. جهت مشاهده تغییرات قند خون در طی انجام آزمایش، در انتهای هر هفته قند خون ناشتای موش‌ها از طریق لانست زدن به نوک دم آن ها، توسط دستگاه گلوکومتر اندازه گیری و ثبت شد. همچنین وزن موش‌ها نیز هر هفته اندازه گیری گردید. پس از پایان تیمارو بعد از گذشت یک ماه حیوانات به وسیله کلروفرم بیهوش شدند. بدین صورت که یک تکه پنبه را آغشته به کلروفرم کرده و درون ظرف در بسته قرار داده به طوری که درون ظرف انتشار یابد سپس موش درون ظرف قرار داده شد تا بیهوش شود. بعد از بیهوش شدن موش، شکم حیوان باز و بافت پانکراس با دقت جدا گردید و جهت بررسی بیان ژن در محلول RNAlater قرارگرفت و در فریزر ۲۰- نگه داری شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمر: جهت استخراج RNA از محلول ترایزول ساخت شرکت سینا کلون استفاده شد. استخراج RNA طبق پروتکل این شرکت انجام شد و بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز انجام شد. در مرحله‌ی بعد جهت سنتز cDNA از کیت prime Script RT Reagent Kit ساخت شرکت تاکارا استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به وسیله نرم افزار الیگو طراحی و توسط شرکت سیناژن بر اساس توالی ژن‌های PAX4 و GAPDH سنتز گردید. در نهایت نتایج حاصل بر روی ژل آگارز مشاهده شد. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های PAX4 و GAPDH آورده شده است.

تکنیک PCR: در این مطالعه جهت تکثیر cDNA از تکنیک PCR استفاده شد. به منظور انجام تکنیک PCR مواد موجود در جدول ۲ تهیه و به اپندورف ۰/۲ میلی لیتر RNase free اضافه گردید. سپس نمونه‌های cDNA در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و فرآیند PCR بر طبق برنامه دمایی ذکر شده در جدول‌های ۳ و ۴ مربوط به ژن‌های PAX4 و GAPDH انجام شد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

جدول ۱- مشخصات پرایمر ژن PAX4 وGAPDH

نام	توالی پرایمر	دما
Forward Primer (PAX4)	5′AGATGTTCCAGTGACACCACA- 3′	۵۹/۴
Revers Primer (PAX4)	5′CACAGGAAGGAGGGAGTCG- 3′	۶۱/۷
Forward Primer (GAPDH)	5′ACCATCTTCCAGGAGCGAGA- 3′	۶۲
Revers Primer (GAPDH)	5′GCAAATGAGCCCCAGCCTTC-3′	۶۴

تکنیک Real Time – PCR: در این مطالعه، تکنیک Real Time – PCR به منظور سنجش کمی سطح بیان ژن PAX4 نسبت به ژن کنترل داخلی GAPDH مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این تکنیک از کیت SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH plus) Bulk ساخت شرکت تاکارا برای واکنش Real Time – PCR و از دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰ استفاده شد. واکنش Real Time – PCR برای ژن هدف PAX4 و ژن کنترل داخلی GAPDH به صورت دو تکرار و به همراه یک واکنش بدون cDNA الگو برای هر ژن صورت گرفت. پس از محاسبه $\Delta\Delta CT$ نسبت بیان ژن هدف در نمونه مورد نظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

جدول ۲- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR

مواد	مقدار
Master mix	۹Lμ
Primer F, R	۱Lμ
cDNA	۲Lμ
DEPC-treated water	۲۰Lμ

جدول ۳- برنامه دستگاه ترموسایکلرمربوط به ژن PAX4

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial Denatuation	۹۴	۵Min	۱
Denaturation	۹۵	۳۰Sec	
Annealing	۶۰	۳۰Sec	۴۰
Extension	۷۲	۳۵Sec	
Final extension	۷۲	۵Min	۱

جدول ۴- برنامه دستگاه ترموسایکلرمربوط به ژن GAPDH

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial Denatuation	۹۴	۵Min	۱
Denaturation	۹۵	۳۰Sec	
Annealing	۵۹	۳۰Sec	۴۰
Extension	۷۲	۴۵Sec	
Final extension	۷۲	۵Min	۱

روش‌های آماری: آنالیز اطلاعات مربوطه با استفاده از نرم افزار SPSS V.22 صورت گرفت و به علت نرمال بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس برای بررسی آماری نتایج به دست آمده استفاده شد.

یافته‌ها

در اولین مرحله، میانگین قند خون برای گروه‌های مختلف مورد مطالعه اندازه گیری و نتایج حاصل در جدول ۵ آورده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) موجب افزایش گلوکز خون در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل سالم شده است. به علاوه گروه تحت تیمار با تیمول ۱۶۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن، دارای بیشترین کاهش قند خون نسبت به سایر گروه‌های دیابتی بود. در نمودار ۱ میانگین قند خون در گروه‌های سالم، سالم تیمار، دیابتی، تحت تیمار با متفورمین و تیمول نشان داده شده است.

نمودارهای منحنی ذوب و تکثیر: در این منحنی شدت فلورسنت در برابر دمای ذوب DNA دو رشته ای ترسیم می‌گردد و با توجه به آن می‌توان به اتصال اختصاصی پرایمر و همچنین وجود یا عدم وجود پرایمر دایمر پی برد. در نمودارهای ۲ و ۳ به ترتیب منحنی ذوب مربوط به ژن GAPDH و PAX4 نشان داده شده است. پس از انجام Real Time – PCR، منحنی تکثیر cDNA برای GAPDH و PAX4 رسم شد. در نمودارهای ۴ و ۵ تکثیر به ترتیب برای ژن GAPDH و PAX4 نشان داده شده است.

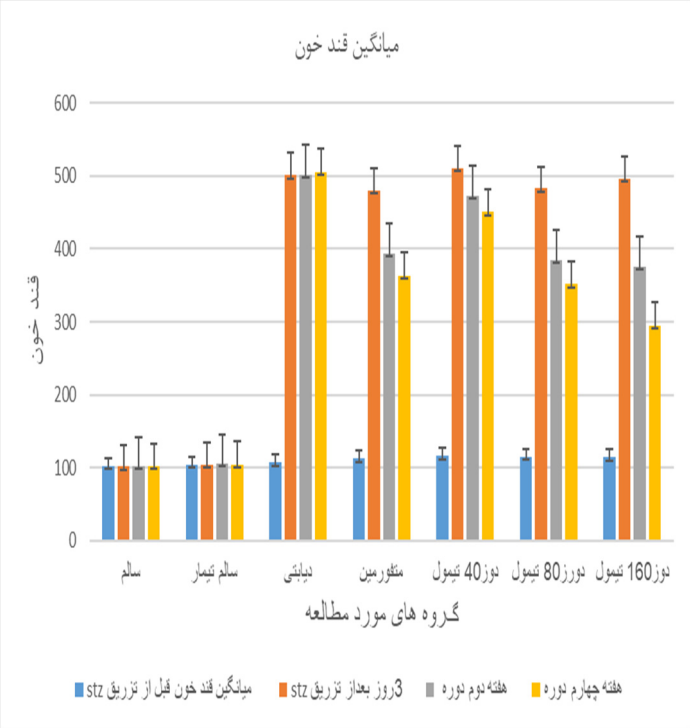
نتایج آنالیز بیان ژنی

میزان بیان ژن Pax4 در موش‌های سالم و دیابتی: بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دیابتی به عنوان کنترل منفی (B) نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن Pax4 در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های سالم به صورت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار قند خون در گروه سالم، سالم تیمار،دیابتی، تحت تیمار با متفورمین و تیمول

گروه‌ها	میانگین قند خون قبل از تزریق STZ	میانگین قند خون بعد از تزریق STZ	میانگین قندخون هفته دوم	میانگین قندخون هفته چهارم	p
شاهد سالم	۴/۴۰±۱۰۲/۱۶	۴/۲۳±۱۰۱/۵	۳/۸۳±۱۰۱/۵	۳/۸۳±۱۰۱/۵	رفرنس
شاهد تیمار	۵/۲۷±۱۰۴/۳۳	۴/۶۳±۱۰۴/۵	۵/۰۳±۱۰۵/۱۶	۴/۷۸±۱۰۴	-
دیابتی	۱۰/۱۵±۱۰۷	۷/۸۹±۵۰۱	۶/۸۵±۵۰۱/۸۳	۶/۸۵±۵۰۴/۸۳	-
متفورمین	۱۱/۰۵±۱۱۲/۵	۳۰/۱۶±۴۷۹/۶۶	۳۵/۳۳±۳۹۴/۳۳	۳۴/۲۳±۳۶۳	۰/۰۰۳
دوز ۴۰ تیمول	۹/۹۸±۱۱۵/۸۳	۱۵/۴۴±۱۱۰/۵	۲۳/۴۸±۴۷۲/۵	۲۲/۹۵±۴۵۰/۱۶	<۰/۰۰۱
دوز ۸۰ تیمول	۸/۴۷±۱۱۴/۶۶	۲۲/۸۰±۴۸۲/۸۳	۴۰/۸۰±۳۸۵	۶/۶۵±۳۵۱/۳۳	<۰/۰۰۱
دوز ۱۶۰ تیمول	۸/۶۱±۱۱۳/۸۳	۶/۴۷±۴۹۶/۵	۲۰/۴۱±۳۷۵/۳۳	۱۱/۵۶±۲۹۴/۱۶	<۰/۰۰۱



نمودار ۱- میانگین قند خون برای گروه‌های مختلف تحت مطالعه که در گروه های تیمار نسبت به گروه سالم ارتباط معنادار بود p<۰/۰۵

معنا داری کاهش یافته است (p = ۰/۰۱۳). در نمودار ۶ بیان ژن Pax4 در دو گروه موش‌های سالم و شاهد دیابتی نشان داده شده است.

بیان ژن Pax4 در موش‌های سالم و گروه شاهد دریافت کننده تیمول: بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه شاهد سالم (A) و گروه شاهد دریافت کننده ی تیمول (c) نشان داد که میزان بیان ژن PAX4 در گروه شاهد دریافت کننده ی تیمول نسبت به گروه شاهد افزایش یافته اما این افزایش در سطح آماری ۹۵ درصد معنادار نمی‌باشد (p = ۰/۱۰۲). در نمودار ۷ بیان ژن Pax4 در دو گروه موش‌های شاهد سالم و شاهد دریافت کننده ی تیمول نشان داده شده است.

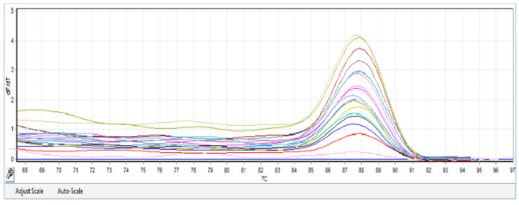
بیان ژن Pax4 در موش‌های شاهد دیابتی و دریافت کننده تیمول: بررسی میزان بیان ژن Pax4 در گروه شاهد دیابتی (b)، موش‌های دیابتی دریافت کننده دوزهای مختلف تیمول (E-G) و موش‌های دیابتی دریافت کننده ی داروی متفورمین (D) در جدول ۶ نشان داده شده است. در نمودار ۸ نمودار بیان نسبی ژن PAX4 در موش‌های شاهد دیابتی و دریافت کننده تیمول نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که بیان ژن مورد نظر در موش های دریافت کننده تیمول نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

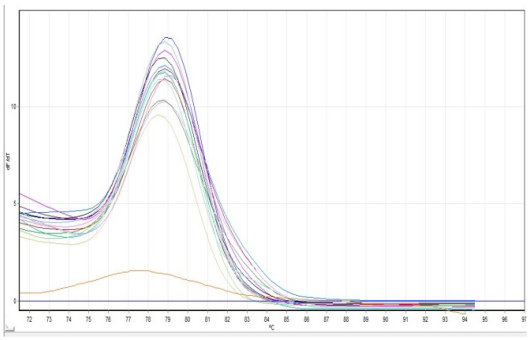
یافته است.

بحث و نتیجه گیری

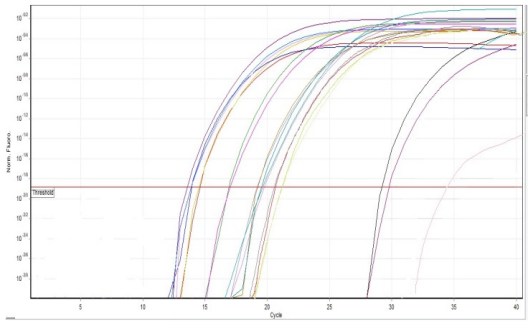
امروزه دیابت ملیتوس به عنوان یکی از شایع ترین



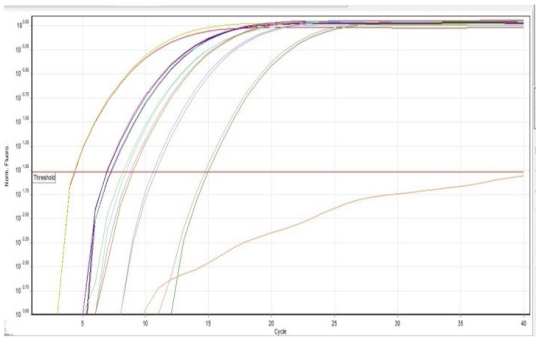
نمودار ۲- منحنی ذوب ژن GAPDH در گروه‌های سالم، سالم تیمار، دیابتی، دریافت کننده متفورمین و تیمول



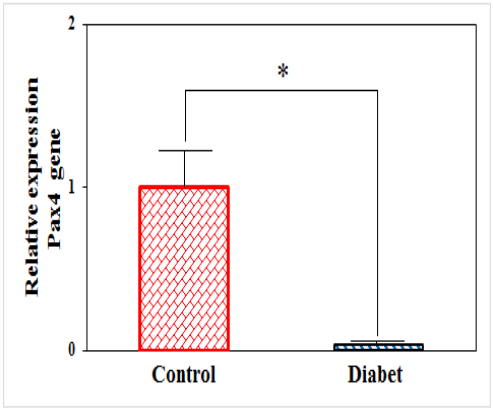
نمودار ۳- منحنی ذوب ژن PAX4 در گروه‌های سالم، سالم تیمار، دیابتی، دریافت کننده متفورمین و تیمول



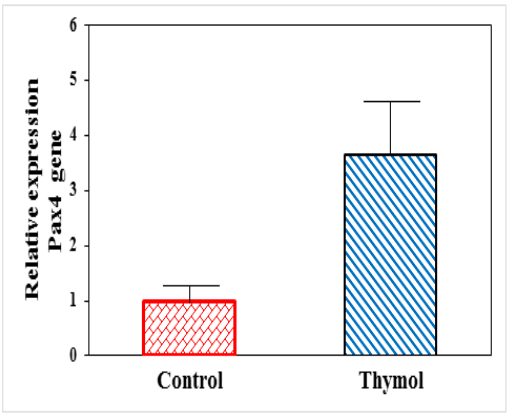
نمودار۴- منحنی تکثیر ژن GAPDH در گروه‌های سالم، سالم تیمار، دیابتی، دریافت کننده متفورمین و تیمول



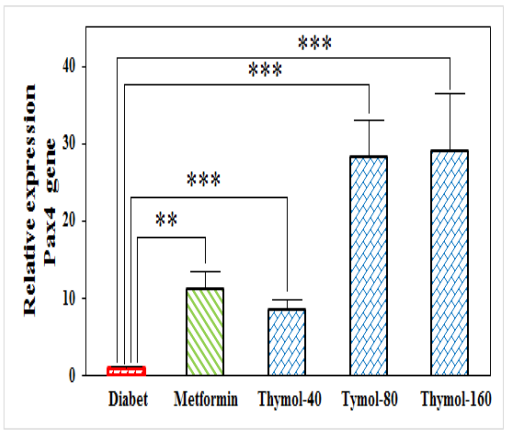
نمودار ۵- منحنی تکثیر ژن PAX4 در گروه‌های سالم، سالم تیمار، دیابتی، دریافت کننده متفورمین و تیمول



نمودار ۶- بیان نسبی ژن PAX4 در موش‌های سالم و دیابتی.



نمودار ۷- بیان نسبی ژن PAX4 در موش‌های سالم و سالم شاهد.



نمودار ۸- بیان نسبی ژن PAX4 در موش‌های شاهد دیابتی و دریافت کننده تیمول که ***،*** نشانه معنادار بودن است.

بیماری‌های غیر واگیر در جهان در نظر گرفته می‌شود و علت اصلی ۵ درصد از تمام مرگ‌ومیرها در جهان است. صرف نظر از علت شناسی آن، نقطه پایان دیابت ملیتوس مرگ سلول‌های بتا است بنابراین بایستی هدف

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

جدول ۶- بررسی بیان ژن pax4 در گروه‌های دیابتی، متفورمین و دریافت کننده تیمول که مقادیت کمتر از ۰/۰۵ نشانه معنادار بودن است

نمونه	بیان نسبی Pax4	انحراف استاندارد	p
شاهد دیابتی	۱/۰۰	۰/۲۲۳	Ref
متفورمین	۱۱/۳۳۲	۲/۱۷۹	۰/۰۰۳
تیمول ۴۰ میلی گرم	۸/۵۰۶	۱/۳۹۸	<۰/۰۰۱
تیمول ۸۰ میلی گرم	۲۸/۲۹۰	۴/۷۳۲	<۰/۰۰۱
تیمول ۱۶۰ میلی گرم	۲۹/۰۴۵	۷/۵۰۷	<۰/۰۰۱

درمان‌های جدید مهار مرگ سلول‌های بتا و ارتقای عملکرد سلوهای بتا در بیماران به منظور بهبود قند خون، بدون عوارض جانبی مشتق شده از درمان باشد. با توجه به اینکه استفاده از گیاهان دارویی برای بیماران مبتلا به قند خون تاریخچه ای طولانی دارد و قبل از کشف انسولین اگزوژن، دیابت توسط این گیاهان کنترل می‌شد، بنابراین در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی این گیاهان انجام شده است. به عنوان مثال ساراوانان و پاری در سال ۲۰۱۶ در طی پژوهشی اثر حفاظتی تیمول روی نفروپاتی دیابتی ناشی از رژیم غذایی پرچرب در موش را بررسی کردند. مطالعات آن‌ها نشان داد که تیمول باعث کاهش محصولات پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین بهبود همئوستازی گلوکز می‌شود (۱۴). از سوی دیگر الخلاف و همکاران در سال ۲۰۱۳ در طی پژوهشی اثر آویشن و تیمول بر آسم القا شده در موش سوری را بررسی کردند. هدف اصلی این مطالعه، بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و نیز اثر آنتی اکسیدانی آویشن و تیمول بود. آن‌ها دو آنزیم آنتی‌اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و پارامترهای دیگر را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد موش‌های درمان شده با آویشن و تیمول بهبود قابل توجهی در سطح تمام پارامترهای مورد مطالعه داشتند، در واقع آویشن و تیمول باعث افزایش میزان آنتی اکسیدان‌ها در بدن و افزایش توانایی آن‌ها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد که در داخل بدن ایجاد می‌شود، می‌گردند (۱۵). در مطالعه‌ای یغمایی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات ترمیمی عصاره آویشن بر سلول‌های بتای پانکراس در موش های دیابتی شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد درمان حیوانات دیابتی با عصاره آویشن علاوه بر کاهش میزان گلوکز سرم، دارای اثرات سودمندی در ترمیم بافت پانکراس است (۱۶). لی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در طی پژوهشی نشان دادند که تیمول مهار کننده تکثیر سلول‌های سرطانی مثانه از طریق القاء چرخه سلول و آپوپتوزیس در سلول های سرطانی است. آن‌ها بیان کردند تیمول قادر به سرکوب مسیر سیگنالینگ P13K /AKT در سلول‌های سرطانی مثانه است (۱۷).

تاکنون مطالعات بسیاری به بررسی نقش تغییرات ژن PAX4 در بروز و پیشرفت بیماری‌های مرتبط با هموستاز گلوکز پرداخته‌اند. این مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات بیان فاکتورهای رونویسی کد شونده توسط ژن PAX4 می‌تواند در حفظ وگسترش سلول‌های بتا پانکراس نقش داشته باشد. گاج و همکاران در سال۲۰۱۴ در طی پژوهشی که بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انسان انجام دادند، دریافتند بیان بیش از حد PAX4 بیان گلوکاگون را در سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می‌دهد و منجر به بهبود تعداد سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شود (۱۸). ناپولیتانو و همکاران اظهار داشتند که PAX4 نقش کلیدی در تکوین و پلاستیسیتی یا شکل پذیری پانکراس ایفا می‌کند. در واقع موش‌هایی که فاقد PAX4 بودند در اثر هایپرگلایسمی ناشی از فقدان سلول‌های بالغ پانکراس چند روز پس از زایمان می‌میرند (۹). پژوهش‌های لی و همکاران اشاره کرد. این محققان در طی پژوهشی نشان دادند که بیان بالای PAX4 در سلول‌های بتا بالغ جزایر لانگرهانس از هایپرگلایسمی جلوگیری می‌کند (۱۷). به علاوه پژوهش ناپولیتانو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که PAX4 نقش کلیدی در تکوین و پلاستیسیتی یا شکل پذیری پانکراس ایفا می‌کند. در واقع موش‌هایی که فاقد PAX4 بودند در اثر هایپرگلایسمی ناشی از فقدان سلول‌های بالغ پانکراس چند روز پس از زایمان می‌میرند (۱۹). از سوی دیگر بران و همکاران در سال ۲۰۰۴ در طی پژوهشی نشان دادند که فاکتور رونویسی PAX4 مرتبط با دیابت باعث ارتقای تکثیر و بقا سلول‌های بتا در جزایر موش و انسان می‌شود (۲۰). به علاوه گاج و همکاران در سال ۲۰۱۴

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

در طی پژوهشی که بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انسان انجام دادند، دریافتند بیان بیش از حد PAX4 بیان گلوکاگون را در سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می‌دهد و منجر به افزایش تعداد سلول‌های تولید کننده انسولین می‌شود (۱۸). در نهایت زانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ در طی پژوهشی نشان دادند که انتقال ژن PAX4 به سلول‌های آلفا می‌تواند آن‌ها را به سلول‌های بتا عملکردی تبدیل کند. نتایج این آزمایش نشان داد که دستکاری ژن PAX4 یک راهبرد درمانی مناسب برای درمان دیابت وابسته به انسولین است (۱۰). در راستای مطالعات ذکر شده در این پژوهش افزایش سطح گلوکز خون در گروه کنترل دیابتی نسبت به موش‌های سالم نشان دهنده هایپرگلایسمی مداوم ناشی از تخریب سلول‌های بتا پانکراس در اثر تزریق استرپتوزوتوسین می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که دوز مؤثر تیمول (۱۶۰میلی گرم بر کیلوگرم) بیش ترین اثر را بر کاهش گلوکز خون در موش‌های دیابتی تحت درمان با تیمول داشته است که با مطالعات دیگر در این زمینه همخوانی داشت.

از سوی دیگر نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که درگروه شاهد سالم و سالم تحت تیمار با تیمول ۸۰میلی گرم بر کیلوگرم (شاهد تیمار) اختلاف معنی داری در بیان نسبی ژن PAX4 وجود ندارد (p= ۰/۱۰۲). در حالی که بیان نسبی ژنPAX4 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش معنی داری داشته است (p =۰/۰۱۳). بیان نسبی این ژن در گروه دیابتی تحت تیمار با تیمول و گروه تیمار با متفورمین نسبت به گروه دیابتی معنی دار بود که در این میان گروه تیمار با تیمول ۱۶۰میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین بیان و گروه تیمار با تیمول ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم کمترین بیان را نشان داد. در نهایت تفسیر نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ترکیب تیمول می‌تواند با افزایش سطح بیان ژن PAX4 موجب بهبود بیماران دیابتی گردد که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج حاصل از مطالعات ذکرشده کاملا همسو می‌باشد.

استفاده از ماده مؤثره تیمول با سه دوز متفاوت سبب افزایش بیان ژن PAX4 در سلول‌های بتا و کاهش گلوکز خون در موش‌های دیابتی شده گردیده و تیمول می‌تواند به عنوان یک درمان موثر برای کاهش علائم و بهبود بیماری در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس در نظر گرفته شود. همچنین پیشنهاد می شود بررسی مکانیسم مولکولی اثر تیمول بر افزایش بیان ژن PAX4 در موش‌های صحرایی دیابتی شده بررسی شود. از سوی دیگر افزایش طول مدت درمان جهت ایجاد زخم در موش‌های صحرایی دیابتی شده و بررسی اثر تیمول بر بهبود زخم در بیماری دیابت انجام شود. به علاوه بررسی اثر تیمول بر بافت شبکیه و کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده صورت گیرد و در نهایت استفاده از گیاهان حاوی ماده موثر تیمول جهت بررسی اثر درمانی این گیاهان در موش‌های صحرایی دیابتی شده انجام شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در انجام مراحل مختلف این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

1. Wilfinger A, Arkhipova V, Meyer D. Cell type and tissue specific function of islet genes in zebrafish pancreas development. Dev Biol. 2013;378(1):25-37.
2. van der Meulen T, Huising MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. J Mol Endocrinol. 2015;54(2):R103-17.
3. Donath M, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. Diabetologia. 2004;47(3):581-9.
4. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2012;35 Suppl 1: S64-71.
5. Abdelalim EM, Emara MM. Advances and challenges in the differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic β cells. World J Stem Cells. 2015;7(1):174181-.
6. Hu He KH, Lorenzo P, Brun T, Jimenez Moreno C, Aeberhard D, Vallejo Ortega J, et al. In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet beta-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]

cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. Diabetes. 2011;60(6):1705-15.

7. Mellado-Gil JM, Cobo-Vuilleumier N, Gauthier BR. Transplantation. 2012;2012.

8. Keymeulen B, Walter M, Mathieu C, Kaufman L, Gorus F, Hilbrands R, et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. Diabetologia. 2010;53(4):614-23.

9. Napolitano T, Avolio F, Courtney M, Vieira A, Druelle N, Ben-Othman N, et al., editors. Pax4 acts as a key player in pancreas development and plasticity. Semin Cell Dev Biol. 2015:44:107-115.

10. Zhang Y, Fava GE, Wang H, Mauvais-Jarvis F, Fonseca VA, Wu H. PAX4 gene transfer induces α-to-β cell phenotypic conversion and confers therapeutic benefits for diabetes treatment. Mol Ther. 2016;24(2):251-60.

11. Hosseinimehr SJ, Asadian R, Naghshvar F, Azizi S, Jafarinejad M, Noaparast Z, et al. Protective effects of thymol against nephrotoxicity induced by cisplatin with using 99mTc-DMSA in mice. Ren Fail. 2015;37 (2):280-4.

12. Mellado-Gil JM, Jiménez-Moreno CM, 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):755-65.

13. Sugumar M, Doss DVA, Maddisetty PP. Hepato-renal protective effects of hydroethanolic extract of Senna alata on enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in streptozotocin induced diabetic rats. Integr Med. 2016;5 (4):276-83.

14. Saravanan S, Pari L. Protective effect of thymol on high fat diet induced diabetic nephropathy in C57BL/6J mice. Chem Biol Interact. 2015;245:1-11.

15. Al-Khalaf MI. Thyme and thymol effects on induced bronchial asthma in mice. Life Sci. 2013;10:693-9.

16. Yaghmaie P, Heydarian E, Poorbahman N. The regenerative effects of Thymus vulgaris extract on beta cells of pancreas of streptozotocin induced diabetic Wistar rats. Med Sci J Islam Azad Uni Tehran Med Branch. 2011;21(3):162-7.

17. Li Y, Wen JM, Du CJ, Hu SM, Chen JX, Zhang SG, et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2017;491(2):530-6.

18. Gage BK, Baker RK, Kieffer TJ. Overexpression of PAX4 reduces glucagon expression in differentiating hESCs. Islets. 2014;6(2):e29236.

19. Napolitano T, Avolio F, Courtney M, Vieira A, Druelle N, Ben-Othman N, et al. Pax4 acts as a key player in pancreas development and plasticity. Semin Cell Dev Biol. 2015;44:107-14.

20. Brun T, Franklin I, St-Onge L, Biason-Lauber A, Schoenle EJ, Wollheim CB, et al. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β-cell proliferation and survival in rat and human islets. J Cell Biol. 2004;167(6):1123-35.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-11]