



بررسی میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در بافت کبد رت‌های نرمال، دیابتی نوع ۱ و ۲ قبل و بعد از درمان با عصاره آبی سیر

محمد ناصر کریمی^۱، رقیه عباسعلی پورکبیره^۲، زهرا عرب صادق آبادی^۳، نسرين ضیا مجیدی^{۴*}

چکیده

مقدمه: یکی از عوارض دیابت ملیتوس القای آپوپتوز در بافت کبد است. آپوپتوز از طریق فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ در سلول‌ها ایجاد می‌شود. سیر به عنوان یک ترکیب گیاهی پرمصرف در رژیم غذایی است که تاکنون اثر آن در آپوپتوز بررسی نشده است. در این مطالعه اثرات عصاره آبی این گیاه در میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و فعالیت کاسپاز ۳ در رت‌های دیابتی نوع ۱ و ۲ مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی، رت‌های نژاد ویستار به شش گروه کنترل سالم، دیابتی نوع ۱، دیابتی نوع ۱ درمان شده با عصاره سیر، دیابتی نوع ۲، دیابتی نوع ۲ درمان شده با عصاره سیر و کنترل سیر تقسیم شدند. در پایان زمان تیمار، بافت کبد رت‌ها سریعاً خارج شد و بلافاصله در -70°C ذخیره شد. جهت بررسی بیان ژن استخراج RNA، سنتز cDNA و Real time PCR انجام شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ به روش فلوریمتری انجام شد.

نتایج: میزان بیان ژن‌های مورد نظر در گروه‌های مختلف تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳، افزایش معنی‌داری را در گروه دیابتی نوع ۱ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p=0/003$). فعالیت این آنزیم در رت‌های دیابتی نوع ۱ درمان شده با سیر، نسبت به رت‌های کنترل همچنان بالا بود ($p=0/021$). در رت‌های دیابتی نوع ۲ درمان شده با سیر و درمان نشده و رت‌های کنترل سیر تغییرات فعالیت آنزیم، نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: دیابت نوع ۱ سبب القای آپوپتوز شده است ولی عصاره سیر سبب بهبود این آسیب نشده است.

واژه‌های کلیدی: دیابت ملیتوس نوع ۱ و ۲، عصاره آبی سیر، Bax، Bcl-2، کاسپاز ۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۳- دانشجوی PhD، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۴- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۰۵۷۴، پست الکترونیکی: n.ziamajidi@umsha.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۱

مقدمه

دیابت ملیتوس شایع‌ترین اختلال آندوکراین است که مشخصه اصلی آن هایپرگلیسمی و عدم تحمل گلوکز است. این بیماری در نتیجه کاهش ترشح انسولین، نقص در عملکرد انسولین و یا هر دو به وقوع می‌پیوندد. بر اساس مطالعات آماری، با افزایش زندگی مدرن و افزایش شیوع چاقی، تعداد افراد مبتلا به دیابت روز به روز رو به افزایش است (۱).

برای بررسی عوارض و مشکلات ناشی از دیابت از مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی برای القا دیابت در مدل‌های آزمایشگاهی، استرپتوزوتوسین (STZ) است. این ترکیب به علت دارا بودن اثر تخریبی بر روی سلول‌های β پانکراس سبب القا دیابت نوع ۱ می‌شود. استفاده از نیاسین آمید، همراه STZ از اثرات مخرب STZ می‌کاهد و فرم خفیف‌تری از دیابت را ایجاد می‌کنند که به عنوان نوع ۲ در نظر گرفته می‌شود (۲).

شواهد زیادی در مطالعات تجربی و بالینی وجود دارد که نشان می‌دهند ارتباط نزدیکی بین هایپرگلیسمی، القا استرس اکسیداتیو و عوارض ناشی از دیابت وجود دارد (۳). یکی از عوارض ناشی از دیابت، اختلال در عملکرد بافت کبد است. به نظر می‌رسد در این حالت مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) در سلول‌های کبدی افزایش یافته و بافت را دچار آسیب می‌کند (۴). آپوپتوز یک فرایند طبیعی در سلول‌ها است که سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب‌دیده و مضر می‌شود. هر گونه اختلال در این مسیر موجب بیماری خواهد شد. گاهی کاهش این مسیر سبب رشد سلول‌های غیرعادی مانند سلول‌های سرطانی خواهد شد و گاهی افزایش غیرطبیعی آن سبب از بین رفتن سلول‌های نرمال خواهد شد. آپوپتوز از دو طریق داخلی و خارجی سبب فعال شدن گروه خاصی از پروتئازهای وابسته به آسپاراتات به نام کاسپازها، به خصوص کاسپاز ۳ می‌شود. در مسیر خارجی با افزایش میزان فاکتور ایجاد کننده نکروز در تومور ($\text{TNF-}\alpha$) ترشح شده از ماکروفاژها و سلول‌های T و اتصال آن به گیرنده‌های سطح سلولی و تریمریزاسیون آن‌ها کاسپازهای داخل سلولی فعال می‌شوند، در حالی که در مسیر

داخلی که به عنوان مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می‌شود، با تغییر نسبی واسطه‌های پرو آپوپتوتیک (مانند Bax) و آنتی آپوپتوتیک (مانند Bcl-2) نفوذپذیری غشا میتوکندری به سیتوکروم C افزایش یافته و با رهاسازی آن، آپوپتوزوم شکل گرفته و سبب فعال شدن کاسپاز می‌شود (۵،۶).

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن آن‌ها، برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های التهابی، دیابت ملیتوس و غیره کاربرد دارد. یکی از گیاهان پرمصرف در طب سنتی، سیر (garlic) با نام علمی *Allium sativum* از خانواده Amaryllidaceae است. بخش عمده فعالیت‌های زیستی این گیاه به دلیل حضور ترکیب گوگرداری به نام آلیسین یا S-آلیل سیستئین است که دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، آنتی‌آتروژنیک، محافظت از کبد است (۷).

در این مطالعه تأثیر عصاره آبی سیر به عنوان یک ترکیب طبیعی آنتی‌اکسیدان بر میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در سلول‌های کبدی رت‌های دیابتی نوع ۱ و ۲ مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی، از سیر همدان که از بازار خریداری شد و به تأیید متخصص سیستماتیک گیاهی در دانشگاه بوعلی سینا رسید، استفاده شد. برای آماده‌سازی عصاره آبی سیر، ۵۰ گرم سیر پوست گرفته شده را در مخلوط‌کن ریخته تا خرد و آسیاب شوند، سپس ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی آن‌ها ریخته شد تا خوب مخلوط شوند و پس از عبور از صافی محلول یکنواختی به دست آمد. به ازای هر صد گرم وزن رت، یک میلی‌لیتر از این عصاره به صورت گاواژ دهانی روزانه به مدت ۳۰ روز به آن‌ها خوراند شد (۸،۹).

تعداد ۳۶ رت نر سالم نژاد Wistar با میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم (۶-۸ هفته‌ای) از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه شد و به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی مورد آزمایش تقسیم و در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند.

غذائی استاندارد و سیکل نوری ۱۲ ساعته بود. برای تایید ایجاد دیابت ۷ روز بعد از القا دیابت نمونه قند خون به کمک گلوکومتر اندازه‌گیری شد. قند بالاتر از ۲۵۰ mg/dL در گروه ۴ و ۵ به عنوان دیابت نوع ۲ و بالاتر از ۳۰۰ mg/dL در گروه ۲ و ۳ به عنوان دیابت نوع ۱ در نظر گرفته شد. یک هفته بعد از القا دیابت، عصاره آبی سیر به آن‌ها خوراندند. در پایان زمان تیمار، رت‌ها با کتامین (۵۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند و نمونه کبد آن‌ها سریعاً در 70°C - جهت بررسی وضعیت آپتوز ذخیره شد.

برای بررسی میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 ابتدا استخراج RNA توسط محلول RNX-Plus شرکت سینا کلون انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده توسط الکتروفورز و نانودراپ تعیین شد. سنتز cDNA توسط کیت Fermentas انجام شد. سپس یک میکروگرم از cDNA سنتز شده وارد واکنش Real time PCR گردید که با کمک کیت سایبر گرین شرکت Takara انجام گرفت. پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام واکنش توسط نرم‌افزار Primer 3 طراحی گردید. از β -actin به عنوان ژن House keeping استفاده شد (جدول ۱). نتایج آزمایش به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفت.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

		Primer sequence (5'->3')	Primer length	Tm	Product length
Bax	Forward	ACTAAAGTGCCCGAGCTGA	۱۹	۵۸/۶۴	
	Reverse	ACTCCAGCCACAAAGATGGT	۲۰	۵۹/۲۳	۱۶۱
Bcl-2	Forward	GAGCGTCAACAGGGAGA	۱۷	۵۵/۶۹	
	Reverse	GCCAGGAGAAATCAAACA	۱۸	۵۲/۴۰	۱۶۴
β -actin	Forward	ATCAGCAAGCAGGAGTACGAT	۲۱	۵۹/۲۴	
	Reverse	AAAGGGTGTAACACGCAGCTC	۲۱	۵۹/۳۹	۹۴

جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و $p < 0.05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با شناسه IR.UMSHA.REC.1395.415 مورد تصویب قرار گرفته است.

گروه ۱ (C): رت‌هایی کنترل سالم که تک دوز سیترات بافر (۲ ml/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه ۲ (D1): رت‌های دیابتی نوع ۱ که دیابت در آن‌ها با تک دوز STZ (۶۵ mg/kg) در بافر سیترات (۲ ml/kg) با $\text{pH}=4/5$ به صورت تزریق درون صفاقی القا شد.

گروه ۳ (D1G): رت‌هایی که دیابت نوع ۱ مانند گروه ۲ در آن‌ها القاشده و سپس عصاره آبی (۱ ml/۱۰۰ g) به مدت ۳۰ روز به صورت گاوژ دهانی به آن‌ها خوراندند.

گروه ۴ (D2): رت‌های دیابتی نوع ۲ که دیابت در آن‌ها با تک دوز STZ (۶۵ mg/kg) القا شد. ۱۵ دقیقه بعد از تزریق STZ، نیاسین آمید (۱۱۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد.

گروه ۵ (D2G): رت‌های که مانند گروه ۴ دیابت نوع ۲ در آن‌ها القاشده و سپس عصاره آبی سیر (۱ ml/۱۰۰ g) به مدت ۳۰ روز به صورت گاوژ دهانی به آن‌ها خوراندند.

گروه ۶ (G): رت‌های سالمی که عصاره آبی سیر (۱ ml/۱۰۰ g) به مدت ۳۰ روز به صورت گاوژ دهانی به آن‌ها خوراندند. شرایط نگهداری رت‌ها کاملاً یکسان و در شرایط قفس، با رژیم

سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ با استفاده از کیت شرکت Cayman انجام شد. کاسپاز ۳ با تأثیر بر سوسترای موجود در کیت و تجزیه آن، یک محصول با فلورسانس بالا تولید کرده که در طول موج ۴۸۵ نانومتر برانگیخته شده و نوری با طول موج ۵۳۵ از خود ساطع می‌کند که توسط دستگاه فلوریمتر قرائت می‌شود.

نتایج

مقادیر Ct و Δ Ct ژن‌های Bax و Bcl-2 در شش گروه مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. پارامترهای مورد نظر در هیچ یک از گروه‌ها تغییرات معنی‌داری با هم نشان ندادند. در جدول ۳ نتایج حاصل از بررسی بیان ژن به روش Real time PCR نشان داده شده است. تصویر محصولات PCR ژن‌های مورد نظر در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲: مقادیر Ct و Δ Ct ژن‌های Bax و Bcl-2 در گروه‌های مورد مطالعه

	Ct Bax	Ct Bcl-2	Ct β -actin	Δ Ct Bax	Δ Ct Bcl-2
C	۲۴/۸۶ $\pm$ ۰/۳۵	۳۰/۰۶ $\pm$ ۰/۷۵	۱۸/۹۵ $\pm$ ۰/۶۹	۵/۹۱ $\pm$ ۰/۳۵	۱۱/۱۱ $\pm$ ۰/۲۱
D1	۲۴/۹۳ $\pm$ ۰/۵۸	۲۹/۴۲ $\pm$ ۱/۳۷	۱۹/۰۷ $\pm$ ۰/۲۷	۵/۸۶ $\pm$ ۰/۵۶	۱۰/۳۴ $\pm$ ۱/۳۰
D1G	۲۵/۳۷ $\pm$ ۱/۰۷	۲۹/۳۰ $\pm$ ۰/۹۶	۱۸/۷۴ $\pm$ ۰/۵۴	۶/۶۲ $\pm$ ۰/۹۲	۱۰/۵۶ $\pm$ ۱/۴۰
D2	۲۴/۱۳ $\pm$ ۰/۷۱	۲۹/۱۵ $\pm$ ۱/۲۶	۱۸/۴۰ $\pm$ ۱/۰۲	۵/۷۲ $\pm$ ۰/۴۵	۱۰/۷۵ $\pm$ ۰/۳۸
D2G	۲۴/۸۴ $\pm$ ۰/۶۶	۳۰/۴۷ $\pm$ ۰/۵۱	۱۹/۸۱ $\pm$ ۰/۴۹	۵/۰۲ $\pm$ ۰/۹۲	۱۰/۶۵ $\pm$ ۰/۲۹
G	۲۷/۷۰ $\pm$ ۳/۱۸	۳۲/۱۵ $\pm$ ۳/۰۰	۲۰/۷۲ $\pm$ ۲/۵۸	۶/۹۷ $\pm$ ۱/۱۱	۱۱/۴۲ $\pm$ ۰/۸۴

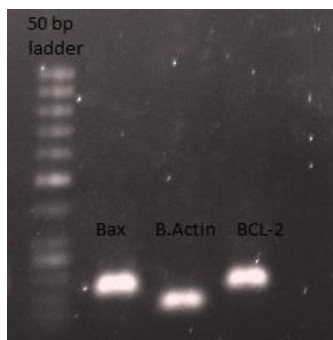
C: کنترل سالم، D1: دیابتی نوع ۱، D1G: دیابتی نوع ۱ درمان شده با عصاره آبی سیر، D2: دیابتی نوع ۲، D2G: دیابتی نوع ۲ درمان شده با عصاره آبی سیر، G: کنترل سالم دریافت‌کننده عصاره آبی سیر

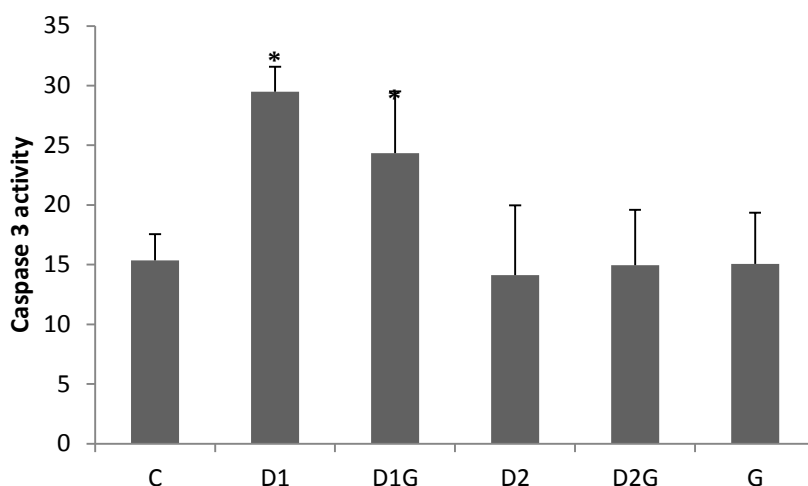
جدول ۳: میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در گروه‌های مورد مطالعه

	$-\Delta\Delta$ Ct Bax	$-\Delta\Delta$ Ct Bcl-2	$2^{-\Delta\Delta$ Ct Bax	$2^{-\Delta\Delta$ Ct Bcl-2
D1-C	۰/۰۵ $\pm$ ۰/۰۱	۰/۷۶ $\pm$ ۰/۳۷	۱/۰۳ $\pm$ ۰/۲۹	۱/۶۹ $\pm$ ۰/۸۳
D1G-C	-۰/۷۱ $\pm$ ۰/۱۰	۰/۵۵ $\pm$ ۰/۲۳	۰/۶۰ $\pm$ ۰/۲۴	۱/۴۶ $\pm$ ۰/۶۲
D2-C	۰/۱۸ $\pm$ ۰/۰۷	۰/۳۶ $\pm$ ۰/۱۹	۱/۱۳ $\pm$ ۰/۴۷	۱/۲۸ $\pm$ ۰/۷۰
D2G-C	۰/۸۸ $\pm$ ۰/۲۸	۰/۴۵ $\pm$ ۰/۱۶	۱/۸۴ $\pm$ ۰/۵۹	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۴۸
G-C	-۱/۰۶ $\pm$ ۰/۲۸	-۰/۳۱ $\pm$ ۰/۲۳	۰/۴۷ $\pm$ ۰/۵۶	۰/۸۰ $\pm$ ۰/۹۳
D1G-D1	-۰/۷۶ $\pm$ ۰/۱۰	-۰/۲۱ $\pm$ ۰/۰۷	۰/۵۸ $\pm$ ۰/۲۲	۰/۸۶ $\pm$ ۰/۴۳
D2G-D2	۰/۶۹ $\pm$ ۰/۲۹	۰/۰۹ $\pm$ ۰/۴۶	۱/۶۲ $\pm$ ۰/۶۸	۱/۰۶ $\pm$ ۰/۵۳

C: کنترل سالم، D1: دیابتی نوع ۱، D1G: دیابتی نوع ۱ درمان شده با عصاره آبی سیر، D2: دیابتی نوع ۲، D2G: دیابتی نوع ۲ درمان شده با عصاره آبی سیر، G: کنترل سالم دریافت‌کننده عصاره آبی سیر

میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در گروه دیابتی نوع ۱ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است ($p=۰/۰۰۳$). بعد از درمان با عصاره آبی سیر در گروه دیابتی نوع ۱، میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه درمان نشده دیابتی نوع ۱، کاهش مختصری یافته است، اگرچه معنی‌دار نیست. در این گروه همچنان فعالیت آنزیم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار بالاست ($p=۰/۰۲۱$). در گروه دیابتی نوع ۲ درمان شده با عصاره سیر و درمان نشده و گروه کنترل عصاره سیر در مقایسه با گروه کنترل سالم فعالیت این آنزیم تغییر معنی‌داری نکرده است (شکل ۲).

شکل ۱: محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪. Bcl-2 (164 bp)، β -actin (94 bp)، Bax (161 bp).



نمودار ۲: میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در گروه‌های مورد مطالعه.

C: کنترل سالم، D1: دیابتی نوع ۱، D1G: دیابتی نوع ۱ درمان شده با عصاره آبی سیر، D2: دیابتی نوع ۲، D2G: دیابتی نوع ۲ درمان شده با عصاره آبی سیر، G: کنترل سالم دریافت‌کننده عصاره آبی سیر

* $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل سالم.

بحث

گلوکاتایون احیا می‌شود که این امر نیز در عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و تشدید القا استرس اکسیداتیو مؤثر است (۱۱).

یکی از عوارض ایجاد شده در اثر هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو، القا آپوپتوز در هیپاتوسیت‌های کبدی می‌باشد. عوامل اصلی در ایجاد آپوپتوز، پروتئازهای به نام کاسپازها هستند که با فعال شدن آن‌ها، پروتئین‌های هسته‌ای، پروتئین‌های اسکلت سلولی و همچنین پروتئین‌های دخیل در انتقال پیام مورد هدف قرار گرفته و نهایتاً مرگ سلول رخ می‌دهد. فعال سازی کاسپازها از دو طریق انجام می‌شود: مسیر داخلی (وابسته به میتوکندری) و مسیر خارجی (وابسته به گیرنده‌های مرگ) (۱۲).

در مسیر داخلی با تغییر نسبی واسطه‌های پرو آپوپتوتیک (مانند Bax) و آنتی آپوپتوتیک (مانند Bcl-2) نفوذپذیری غشا میتوکندری به سیتوکروم C افزایش یافته و با رهاسازی آن، آپوپتوزوم شکل گرفته و سبب فعال شدن کاسپاز ۹ و ۳ می‌شود. در مسیر خارجی افزایش میزان $TNF-\alpha$ سرمی و اتصال آن به گیرنده TNFR که یک نوع گیرنده مرگ است،

دیابت یک اختلال متابولیکی پیچیده است که با هیپرگلیسمی همراه است. هیپرگلیسمی از طرق متفاوتی سبب آسیب به بافت‌های مختلف می‌شود، لذا در بحث عوارض دیابت به رتینوپاتی، نفروپاتی، کاردیوپاتی و هپاتوپاتی اشاره می‌شود (۱۰). یکی از مهم‌ترین مسیرهای مرتبط با ایجاد اختلال در اثر هیپرگلیسمی، القا استرس اکسیداتیو است که در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن به طور دائم در شرایط طبیعی و در نتیجه متابولیسم هوازی تولید می‌شوند و در مسیرهای سیگنالینگ سلول دخیل هستند. در شرایط هیپرگلیسمی با افزایش متابولیسم گلوکز تولید این رادیکال‌ها نیز افزایش می‌یابد که سبب آسیب به ماکرومولکول‌های مختلف مانند DNA، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها می‌شود. رادیکال‌های آزاد نیتروژن دسته دیگری از رادیکال‌های آزاد هستند که از نیتریک اکسید (NO) مشتق می‌شوند. در حالت نرمال سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن با رادیکال‌های آزاد مقابله کرده و از آسیب آن‌ها جلوگیری می‌کند. هیپرگلیسمی علاوه بر تولید رادیکال‌های آزاد، سبب مهار سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن از جمله کاهش

سبب تریمریزه شدن آن و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۸ و ۳ خواهد شد (۱۲).

هایپر گلاسمی با افزایش رادیکال آزاد هیدروکسیل (OH) موجب بیان بالای پروتئین Bax می‌شود و ترانس‌لوکاسیون Bax به میتوکندری منجر به آزاد شدن سیتوکروم C و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۳ می‌شود که به آپوپتوز می‌انجامد. انسولین با کاهش سطح رادیکال هیدروکسیل از آزاد سازی سیتوکروم C به سیتوزول کاسته و موجب کاهش قابل‌ملاحظه فعالیت کاسپاز ۳ می‌شود که از آسیب کبدی می‌کاهد (۱۳).

در مطالعات مختلفی گزارش شده است که هایپر گلیسمی و استرس اکسیداتیو از طریق افزایش میزان التهاب باعث فعال شدن فاکتور هسته‌ای $\text{NF-}\kappa\text{B}$ می‌شود که موجب رونویسی از ژن‌هایی می‌شود که فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌های پیش التهابی و مولکول‌های چسبندگی را کد می‌کنند که همگی مسئول تولید مقادیر زیادی از NO ایجاد شده در بافت کبد می‌باشند (۱۴). گزارش‌های زیادی بر اساس مطالعاتی که در کبد رت و سلول‌های انسان انجام داده‌اند اذعان دارند که NO توانایی شروع آپوپتوز را دارد (۱۵). نیتریک اکسید می‌تواند با سوپراکسید واکنش دهد و موجب تولید اکسیدان قوی پراکسی نیتريت شود که می‌تواند باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، نیتراسیون پروتئین‌ها و اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) شود. شواهد تجربی اخیر از نظریه نقش‌های پیچیده نیتریک اکسید، ROS و پراکسی نیتريت در توسعه آسیب اولیه بافت دیابتی قبل از ایجاد عوارض دیررس، حمایت کرده‌اند (۱۶).

در مطالعه حاضر تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در بافت کبد رت‌های مختلف مشاهده نشد. اگرچه افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در گروه دیابتی نوع ۱ و کاهش نسبی آن در گروه تیمار شده این نوع دیابتی مشاهده شد. با توجه به افزایش فعالیت این آنزیم کلیدی، به نظر می‌رسد آپوپتوز در بافت کبد این رت‌ها القا شده است، اما نه از طریق تغییر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2. در مطالعات دیگر نشان داده شده است که میزان $\text{TNF-}\alpha$ سرمی و میزان بیان ژن

iNOS و تولید NO در بافت کبد رت‌های دیابتی افزایش یافته است (۱۷، ۱۸). به نظر می‌رسد القا آپوپتوز ناشی از هایپر گلیسمی در این رت‌ها، در نتیجه افزایش التهاب و از طریق رسپتورهای مرگ (مسیر خارجی) سبب افزایش میزان نیتریک اکسید و فعال شدن کاسپاز ۳ شده است. با توجه به نتایج حاصل از رت‌های دیابتی نوع ۲، به دلیل تقلیل شدت دیابت، عوارض نیز خفیف‌تر بوده و تغییری در بیان ژن‌های مذکور و همچنین فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ مشاهده نشده است. به نظر می‌رسد، اگر دوره دیابتی بودن رت‌ها طولانی‌تر بود نتایج مرتبط با آسیب کبد واضح‌تر می‌بود.

با توجه به افزایش روزافزون مصرف عصاره‌های گیاهی در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف و عوارض ناشی از آن‌ها، در این مطالعه اثرات عصاره آبی سیر بر روی کبد رت‌های دیابتی نوع ۱ و ۲ مورد بررسی قرار گرفته است، اگرچه تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثرات آن بر روی آپوپتوز انجام نشده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 تحت تأثیر عصاره سیر تغییری نکرد ولی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در رت‌های دیابتی نوع ۱ درمان شده با سیر، کاهش خفیفی را نسبت به رت‌های درمان نشده نشان داد. به نظر می‌رسد که دوره درمان با این ترکیب دارویی برای بهبود وضعیت کبد، کافی نبوده است. شاید اگر مدت‌زمان تیمار و یا غلظت مورد استفاده آن افزایش می‌یافت، اثرات بهتری مشاهده می‌شد، چراکه ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی دیگر، این قابلیت را در مطالعات مشابه نشان داده‌اند. برای مثال Kapoor و همکارانش اثرات محافظتی نارینجین (Naringenin) را در آپوپتوز کبد رت‌های دیابتی (۱۹) و Alabdan اثرات سیلیمارین را بر بهبود آپوپتوز کبدی در رت‌های دیابتی نشان داده‌اند (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Giribabu و همکاران انجام شد، اثرات ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی عصاره دانه Vitis Vinifera در رت‌های دیابتی شده نشان داده شده است (۲۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در رت‌های دیابتی نوع ۱، آپوپتوز در این رت‌ها القا شده است. از طرف دیگر، با

که مکانیسم عمل آن مشخص شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی این مطالعه در قالب طرح شماره ۹۵۱۰۰۷۵۶۷۲ تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی همدان در رشته بیوشیمی بالینی است.

توجه به عدم تغییرات معنی‌دار بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به نظر می‌رسد که مسیر داخلی القا آپوپتوز در این رت‌ها فعال نیست. به نظر می‌رسد که آپوپتوز از طریق مسیرهای دیگری القا شده است. عصاره سیر در این غلظت و زمان تیمار بکار رفته، اگرچه تغییر جزئی در فعالیت کاسپاز ایجاد کرده است، ولی نتوانسته آن را به سطح نرمال نزدیک کند؛ بنابراین مطالعات بیشتری در این زمینه با غلظت‌های متفاوت درمانی و زمان تیمار طولانی‌تر مورد نیاز است

References:

- 1-Ghamarian A, Abdollahi M, Su X, Amiri A, Ahadi A, Nowrouzi A. *Effect of chicory seed extract on glucose tolerance test (GTT) and metabolic profile in early and late stage diabetic rats*. Daru 2012; 20(1): 56.[persian]
- 2- Tripathi V, Verma J. *Different models used to induce diabetes: A Comprehensive Review*. Int J Pharm Pharm Sci 2014; 6(6): 29-32.
- 3- Robertson RP. *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem 2004; 279(41): 42351-4.
- 4- Schattenberg JM, Schuchmann M. *Diabetes and apoptosis: liver*. Apoptosis 2009; 14(12): 1459-71.
- 5- Bayir H, Kagan VE. *Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis- there is nothing more practical than a good theory*. Crit Care 2008; 12(1): 206.
- 6- He B, Lu N, Zhou Z. *Cellular and nuclear degradation during apoptosis*. Curr Opin Cell Biol 2009; 21(6): 900-12.
- 7- Ide N, Lau BH. *Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation*. The J nutrition 2001; 131(3): 1020S-6S.
- 8- Masjedi F, Gol A, Dabiri S. *Preventive effect of garlic (Allium sativum L.) on serum biochemical factors and histopathology of pancreas and liver in streptozotocin-induced diabetic rats*. Iran J Pharm Res. 2013; 12(3): 325-38.
- 9- El-Demerdash F, Yousef M, El-Naga NA. *Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats*. Food Chem Toxicol 2005; 43(1): 57-63.
- 10- Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature 2001; 414(6865): 813-20.
- 11- Robertson RP. *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem 2004; 279(41): 42351-4.

- 12- Frances DE, Ronco MT, Monti JA, Ingaramo PI, Pisani GB, Parody JP, et al. *Hyperglycemia induces apoptosis in rat liver through the increase of hydroxyl radical: new insights into the insulin effect*. J Endocrinol 2010; 205(2): 187-200.
- 13- Reed JC. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J Cell Biol 1994; 124(1-2): 1-6.
- 14- Chang C-C, Chang C-Y, Huang J-P, Hung L-M. *Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats*. Chin J Physiol 2012; 55(3): 192-201.
- 15- Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DE, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, et al. *Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus*. Mol Immunol 2011; 48(12-13): 1397-407.
- 16- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. *Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats*. The J nutrition 2005; 135(10): 2299-304.
- 17- Nasiri A, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Goodarzi MT, Saidijam M, Behrouj H, et al. *Beneficial Effect of Aqueous Garlic Extract on Inflammation and Oxidative Stress Status in the Kidneys of Type 1 Diabetic Rats*. Indian J Clin Biochem 2017; 32(3): 329-336.
- 18- Ziamajidi N, Nasiri A, Abbasalipourkabir R, Sadeghi Moheb S. *Effects of garlic extract on TNF- α expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ+ nicotinamide-induced diabetes*. Pharm Biol 2017; 55(1): 526-31.
- 19- Kapoor R, Kakkar p. *Naringenin accords hepatoprotection from streptozotocin induced diabetes in vivo by modulating mitochondrial dysfunction and apoptotic signaling cascade*. Toxicol Rep 2014; 1: 569-581.
- 20- Alabdan MA. *Silimarin ameliorates liver damage by modulating oxidative stress and apoptosis in liver of STZ-induced diabetic rats*. Int J Adv Res 2016; 4(3): 1935-1942.
- 21- Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Kassim NM, Salleh N. *Anti-Inflammatory, anti-apoptotic and pro-proliferative effects of Vitis Vinifera seed ethanolic extract in the liver of streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in male rats*. Can J Diabetes 2017. Article in press.

The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic

Mohammad Naser Karimi ¹, Roghayeh Abbasalipourkabir ²,
Zahra Arab Sadeghabadi ³, Nasrin Ziamajidi ^{*4}

¹⁻⁴ Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 11 May 2017

Accepted: 1 Jun 2017

Abstract

Introduction: One of the complications of diabetes mellitus is induction of apoptosis in liver tissues. Activation of caspase 3 caused apoptosis in the cells. Garlic is a most common plant in diet that its effect on apoptosis was not determined. In this study the effects of this extract on Bax and Bcl-2 gene expression and the activity of caspase 3, were determined in type 1 and 2 of diabetes in rats.

Methods: Wistar rats divided into six groups included normal control rats, diabetes type 1 (D1), diabetes type 1 treated with garlic extract (D1G), diabetes type 2 (D2), diabetes type 2 treated with garlic extract (D2G) and garlic control (G). At the end of treatment time, liver tissues were removed quickly and stored in -70 °C. For evaluation of gene expression, RNA extraction, cDNA synthesis and Real time PCR were done. The activity of caspase 3 was determined with flourometric method.

Results: The level of gene expression of Bax and Bcl-2, did not change significantly in different groups. The activity of caspase 3 in D1 rats, increased significantly compared to the control rats ($p=0.003$). The activity of this enzyme was high in D1G compared to control rats yet ($p=0.021$). In D2, D2G and G groups, caspase activity was not changed in comparison with the control rats

Conclusion: Diabetes mellitus type1 caused apoptosis in rat livers, but garlic extract cannot ameliorate it.

Keywords: Diabetes mellitus type 1 and 2, Aqueous garlic extract, Bax, Bcl-2, Caspase 3

This paper should be cited as:

Karimi MN, Abbasalipourkabir R, Arab Sadeghabadi Z, Ziamajidi N. **The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(7): 547-55.

***Corresponding author: Tel: 08138380574, email: n.ziamajidi@umsha.ac.ir**