

## اثر اسانس روغنی ساتوریا خوزستانی‌کا بر فعالیت و بیان ژن برخی از آنزیم‌های تنظیمی قند در کبد رتهای دیابتی و نرمال

غلامرضا شهسواری<sup>2,1</sup>، عبدالوهاب احسانی زنوز<sup>3</sup>، مسعود هوشمند<sup>4</sup>، قاسم آهنگری<sup>4</sup>، محسن فیروززای<sup>5</sup>

1- مربی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

2- دانشجوی دکترای بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

3- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

4- دانشیار، گروه ژنتیک بالینی، انستیتو ملی مهندس ژنتیک و زیست فن‌آوری

5- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

یافته / دوره دهم / شماره 4 / زمستان 87 / مسلسل 38

### چکیده

دریافت مقاله: 87/8/28، پذیرش مقاله: 87/10/11

Ø مقدمه: اثر اسانس روغنی ساتوریا خوزستانی‌کا (SKEO) نوع بومی بر فعالیت و بیان ژن برخی آنزیم‌های تنظیمی-کننده قند در کبد رتهای نرمال و دیابتی شامل گلوکوکیناز (GK)، گلیکوژن فسفریلاز (GP) و فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز (PEPCK) مورد ارزیابی قرار گرفت.

Ø مواد و روش‌ها: اسانس SKEO بومی در دوز 100mg/kg در روز از طریق دهان به رتهای دیابتی و نرمال بمدت سه هفته خوراندند. سطوح mRNA با استفاده از تکنیک Real time-PCR اندازه‌گیری شد.

Ø یافته‌ها: غلظت قند خون رتهای دیابتی دریافت‌کننده SKEO در قیاس با رتهای کنترل دیابتی بطور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.001$ ). فعالیت و سطوح mRNA آنزیم‌های GK و GP در رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با کنترل دیابتی بطور متوسط افزایش نشان داد گرچه این تغییرات معنی‌دار نیست. فعالیت PEPCK کبدی و سطوح mRNA آن در رتهای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). سطوح افزایش یافته mRNA و فعالیت PEPCK رتهای دیابتی دریافت‌کننده SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $p < 0.05$ ).

Ø بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌ها اشاره دارند که گونه بومی SKEO به واسطه یک افزایش متوسط در مقادیر GK و GP بعلاوه یک کاهش قابل توجه در PEPCK در کبد رتهای دیابتی تحت تیمار ممکن است در عمل پائین آوردن گلوکز پلاسما سهیم باشد به نظر می‌رسد که این عمل در ارتباط با خواص آنتی‌اکسیدان SKEO باشد.

Ø کلید واژه‌ها: آنتی‌هایپرگلیسمی، رتهای دیابتی، بیان ژن، گلوکوکیناز، گلیکوژن فسفریلاز کبدی، فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز، ساتوریا خوزستانی‌کا جمزاد

آدرس مکاتبه: تهران - بزرگراه همت جنب بیمارستان میلاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه بیوشیمی

پست الکترونیک: rezash@iums.ac.ir

## مقدمه

ساتوریا خوزستانیکا جمزاد<sup>1</sup> از گیاهان بومی ایران بوده که در نواحی جنوبی استان لرستان و شمالی استان خوزستان رویش دارد (1). طیف وسیعی از اثرات اسانس روغنی ساتوریا خوزستانیکا (SKEO)<sup>2</sup> گزارش شده است شامل: اثر ضدالتهابی و ضد درد (2)، ضد میکروبی (3)، کاهش دهنده سطوح پلاسمائی تری‌گلیسرید و قند (4-5). SKEO دارای خواص آنتی‌اکسیدان و هم‌چنین اثرات مفیدی بر باروری رت نر و تحریک تولیدمثل در رت ماده دارد (4).

کبد نقش مهمی در نگاهداری سطوح قند خون از طریق تعادل بین جذب و ذخیره گلوکز از طریق گلیکوژن و رها سازی آن از طریق گلیکوژنولیز و گلوکونئوژن بعمل می‌آورد (6). گلوکوکیناز کبدی (GK)<sup>3</sup> نقش اساسی در ایجاد تعادل قند در کبد از طریق افزایش جذب قند در حالات بعد از تغذیه بعهده دارد (7). گلیکوژن فسفریلاز کبدی (GP)<sup>4</sup> آنزیم تنظیمی است که تجزیه گلیکوژن را کاتالیز می‌نماید و فعالیتش در حالات سیری یک مکانیسم مهمی در کنترل قند خون محسوب می‌شود. فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز (PEPCK)<sup>5</sup> یکی از واکنش‌های تنظیمی مهم را در راه متابولیکی گلوکولونئوژن کاتالیز می‌کند. مطالعات در حیوانات دیابتی نشان داده که گلوکونئوژن یک عامل مهم در افزایش قند خون در حالات ناشتا و سیری بشمار می‌رود (8). در مطالعات پیشین، گزارش شده است که رتهای دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین تحت تیمار با SKEO کاهش معنی‌داری در سطوح پلاسمائی قند نشان می‌دهند (4). هم‌چنین رتهای نرمال تحت تیمار با SKEO کاهش معنی‌داری در فعالیت کبدی PEPCK و یک افزایش معنی‌دار در فعالیت GP کبدی بدون تأثیر معنی‌دار بر سطوح پلاسمائی قند ارائه می‌دهند (9). مطالعه حاضر به ارزیابی اثر SKEO بومی<sup>6</sup> بر فعالیت و بیان ژن برخی از آنزیم-

های تنظیمی قند شامل GP، GK و PEPCK در کبد رتهای دیابتی و نرمال می‌پردازد. در این بررسی سطوح پلاسمائی قند و انسولین نیز مورد سنجش قرار گرفته است

## مواد و روشها

گیاه ساتوریا خوزستانیکا جمزاد در روستای کول کنی واقع در 35 کیلومتری جنوب پل دختر در هنگام گل دادن در شهریور ماه جمع‌آوری گردید. در بخش بعدی پس از شناسائی و تعیین هویت گیاه توسط سازمان جنگل‌ها و مراتع، مطابق روش ذکر شده اسانس‌گیری بعمل آمد. میزان اسانس‌دهی گیاه 2/8 درصد (وزنی/وزنی)، با افزودن سولفات سدیم انیدرو آب-گیری از اسانس بعمل آمده و در 4°C نگهداری شد (10).

رتهای نر نژاد ویستار، با وزن تقریبی 180-230 گرم با تزریق تک دوز (وزن بدن 45mg/kg) استرپتوزوتوسین محلول در بافر ستیرات 0/1mol/l خنک بصورت داخل صفاقی دیابتی گردید. پس از 72 ساعت از تزریق استرپتوزوتوسین، رتهائی که دارای قند خون بالاتر از 18 mM و گلوکوزاوری بودند بعنوان دیابتی محسوب شدند. حیوانات بطور تصادفی به چهار گروه 6 تایی تقسیم شدند:

گروه 1 شامل رتهای کنترل نرمال، گروه 2، رتهای کنترل دیابتی، گروه 3، رتهای نرمال که دوز 100mg/kg ساتوریا خوزستانیکا را از طریق دهان بصورت روزانه دریافت می‌کردند و گروه 4، رتهای دیابتی که دوز SKEO 100mg/kg را از طریق دهان بصورت روزانه دریافت می‌کردند. به رتهای کنترل دیابتی و نرمال به جای SKEO آب از طریق دهان داده می‌شد و طول

1. Satureja khuzestanica Jamzad
2. Satureja khuzestanica essential oil
3. Glucokinase
4. Glycogen phosphorylase
5. Phosphoenolpyruvate carboxykinase
6. Wild type

گرفت. فعاليت هگزوكيناز در غلظت 0/5mM گلوکز و فعاليت GK با اختلاف بين فعاليت‌هاى آن در غلظت 100 mM و 0/5 گلوکز بدست آمد. فعاليت GP بصورت اسپكتروفوتومتري با تغييرى در روش توصيف شده قبلى اندازه‌گيرى شد (12). غلظت 5mM از AMP بجای كافئين به مخلوط واكنش اضافه گرديد. فعاليت PEPCK مطابق روش توصيف شده پيشين تعيين گرديد (13). توتال پروتئين با روش لورى اندازه‌گيرى شد (14). فعاليت‌هاى آنزيم بصورت نانومول از سوپسترا كه توسط يك ميلى‌گرم پروتئين سوپرنانت كبدى در دقيقه تبديل مى‌شود محاسبه گرديد.

همه RNA كبد هر رت با استفاده از كيت High Pure RNA tissue و مطابق دستورالعمل موجود در كيت استخراج گرديد. نسبت جذبى 260/280 نانومتر براى تمام استخراج‌ها بين 1/8-2 بود و اينتگرى RNA توسط الكتروفورز با استفاده از آگارز - ايتدبوم برمايد مورد سنجش قرار گرفت. توتال RNA با استفاده از كيت First Strand cDNA Synthesis مطابق با دستورالعمل كيت مورد رونوشت بردارى معكوس قرار گرفت. كيت استخراج RNA و ساخت cDNA از شركت Roche Diagnostics ساخت كشور آلمان مورد استفاده قرار گرفته است.

Real time- PCR با سيستم 2 Lightcycler با استفاده از كيت Lightcycler Fast Start DNA SYBR Green I انجام شد. توالى پرايمرهاى اختصاصى براى بيان ژنهاى كبدى GP و PEPCK و هم‌چنين  $\beta$  actin بعنوان استاندارد درونى در جدول 1 آمده است. نمونه‌هاى حاوى مخلوط نهائى واكنش در دستگاه Lightcycler در  $95^{\circ}\text{C}$  بمدت 10 دقيقه به منظور Predenaturation انكوبه گرديد. سپس 45 چرخه PCR جهت ازدياد تعداد كپى هر ژن انجام گرديد. هر

دوره تيمار بمدت 3 هفته بوده است. پس از پايان دوره تيمار، در حالت سبرى، حيوانات با تزريق داخل صفاقى كتامين (50mg/kg) و زايلوزين (10mg/kg) بيهوش گرديده و بلافاصله نمونه خون از قلب رت‌ها جمع‌آورى شد. كبد حيوان را سريعاً برداشته، به قطعات بسيار كوچك برش داده، با محلول سالين خنك چندين بار شستشو داده و در نيتروژن مايع منجمد شد سپس در فريزر  $80^{\circ}\text{C}$  تا هنگام آزمايشات نگهدارى گرديد.

غلظت گلوکز با استفاده از روش گلوکز اكسيداز توسط كيت تهيه شده از شركت پارس آزمون و انسولين با استفاده از كيت انسولين رت با روش الايزا ساخت شركت ماركوديا كشور سوئد اندازه‌گيرى شد.

براى تمام آناليزها، قسمت‌هائى از بافت كبدى در 4 حجم از بافر سرد 20mM Tris-HCl، pH=7/4، هموژنيزه گرديد. در ضمن بافر مذكور محتوى 1mM EDTA براى PEPCK، حاوى 4mM EDTA و ديتيوتريتول 5mM، براى GP و هم‌چنين شامل 100mM KCl، 2mM MgCl<sub>2</sub>، 1mM EDTA و ديتيوتريتول 1mM براى GK بوده است. هموژنيزاسيون با استفاده از هموژنايزر polytron بصورت پالسى بمدت 45 ثانيه انجام شد. مخلوط همگن بدست آمده يك ساعت در  $4^{\circ}\text{C}$  در  $105000\times\text{g}$  از اولتراسانترفوژ Beckman سانترفوژ گرديد. سوپرنانت حاصل براى سنجش آنزيم مورد استفاده قرار گرفت. فعاليت‌هاى GK و هگزوكيناز با يك تغييراتى در روش توصيف شده قبلى انجام پذيرفت (11). سنجش‌ها در بافر 10mM Tris-HCl (pH=7/5) حاوى KCl 100mM و 8mM MgCl<sub>2</sub>، 5mM ATP، 0/5NADP، 1mM سرم آلبومين گاوى 0/1g/1، گلوکز 6-فسفات دهيدروژناژ 0/5U/ml، گلوکز 100mM يا 0/5 و 50 ميكروليتر از سوپرنانت در حجم نهائى 1ml انجام

استاندارد بدست آمد. میزان نسبی سطوح mRNA هر ژن بصورت نرمالیزه در برابر  $\beta$  actin بیان گردید.

برای تعیین تغییرات متغیر بین گروههای کنترل و تحت تیمار، یک ANOVA یکطرفه توسط مقایسه‌های چندتائی Post-hoc با استفاده از آزمون Tukey انجام پذیرفت. ارتباط بین فعالیت و سطوح mRNA یک آنزیم در گروههای مورد آزمایش با استفاده ضریب پیرسون ( $r$ ) بدست آمد. مقادیر  $p \leq 0/05$  از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی محسوب شد

چرخه Amplification شامل  $95^{\circ}\text{C}$  بمدت 10 ثانیه،  $T_m$  پرایمر بمدت 15 ثانیه (مطابق جدول 1) و  $72^{\circ}\text{C}$  بمدت 20 ثانیه می‌باشد. رونوشت‌های اختصاصی ازدیاد یافته توسط پروفایل منحنی melting که در انتهای هر PCR انجام می‌گرفت تصدیق گردید. برای کنترل بیشتر طول محصول و اختصاصی بودن PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 2% رویت با اتیدیوم بروماید صورت پذیرفت. میزان هر ژن در نمونه با رقت-سازی از نمونه cDNA نرمال برای هر ژن و رسم منحنی

جدول شماره 1- توالی پرایمرها برای بیان ژنهای گلوکوکیناز، فسفوانول پیروات کربکسی و اتیلین b

Gene name	Genbank accession	Primer sequences	Amplicon size	Tm
GP	NM_022268	Forward: 5'-CCCAGCACCCAATGACTTTAACC-3' Reverse: 5'-GCGAGTGCGGGATGTGTGTCA-3'	298 bp	$66^{\circ}\text{C}$
PEPCK	NM_198780	Forward: 5'-GTCACCATCACTTCCTGGAAGA-3' Reverse: 5'-GGTGCAGAATCGCGAGTTG-3'	84 bp	$55^{\circ}\text{C}$
$\beta$ actin	NM_031144	Forward: 5'-ATGGATGACGATATCGCTGC-3' Reverse: 5'-CTTCTGACCCATACCCACCA-3'	150 bp	$57^{\circ}\text{C}$

## یافته‌ها

### اثر ساتوریا خوزستانیکا بر سطوح پلاسمائی گلوکز و انسولین

داری نداشت ( $p > 0/05$ ). بنابراین کاهش قند خون فقط در رتهای دیابتی بعنوان مدل هایپرگلاسمی مشاهده می شود (جدول 2). مقادیر (means  $\pm$  S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد.  $p < 0/001$  در قیاس با گروه کنترل نرمال و  $p < 0/05$  در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است.

غلظت گلوکز پلازما در رتهای کنترل دیابتی در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور معنی‌داری افزایش داشت در حالیکه سطوح انسولین بطور معنی‌داری کاهش نشان می‌داد ( $p < 0/001$ ). غلظت پلاسمائی گلوکز در رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی بطور معنی-داری کاهش می‌یافت ( $p < 0/001$ ). این سطوح بطور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نرمال بالاتر ( $p < 0/001$ ) انسولین پلازما در رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی بطور جزئی افزایش نشان می‌داد ( $p > 0/05$ ). همچنین، سطوح پلاسمائی گلوکز و انسولین رتهای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال تفاوت معنی-

جدول شماره 2- اثر اسانس روغنی ساتوریا خوزستانیکا نوع بومی بر سطوح پلاسمائی گلوکز و انسولین

گروه	انسولین پلازما ( $\mu\text{g/l}$ )	گلوکز پلازما (mM)
کنترل نرمال	0/99 $\pm$ 0/46	8/29 $\pm$ 0/99
نرمال + SKEO	0/63 $\pm$ 0/15	7/18 $\pm$ 0/51
کنترل دیابتی	0/22 $\pm$ 0/47 *	22/31 $\pm$ 2/5 *
دیابتی + SKEO	0/33 $\pm$ 0/075 *	15/59 $\pm$ 3/3 ** *

مقادیر (means  $\pm$  S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد.  $p < 0/001$  در قیاس با گروه کنترل نرمال و  $p < 0/05$  در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است.

به ترتيب در قياس با گروه کنترل ديابتى و کنترل نرمال بطور معنى‌دارى کاهش نشان داد  $p < 0/05$  (شكل 1-ب و 2-ب). وابستگى زيادى بين فعاليت و سطوح mRNA, PEPCK, كبدى در تمام گروههاى رت وجود داشت ( $r = 0/931$ ,  $p < 0/01$ ) (شكل 3-ب)

اثر ساتوريا خوزستانىكا بر فعاليت و بيان ژن GP كبدى

فعاليت GP كبدى و سطوح mRNA آن در رتهائى ديابتى در قياس با رتهائى نرمال بطور معنى‌دارى کاهش نشان داد ( $p < 0/05$ ). رتهائى ديابتى تحت تيمار با SKEO در قياس با گروه کنترل ديابتى به ترتيب يك افزايش 11% و 22% در فعاليت و سطوح mRNA كبدى GP ارائه دادند. در صورتى كه اين افزايش در رتهائى نرمال تحت تيمار با SKEO در قياس با گروه کنترل نرمال بطور متوسط 21% بود.

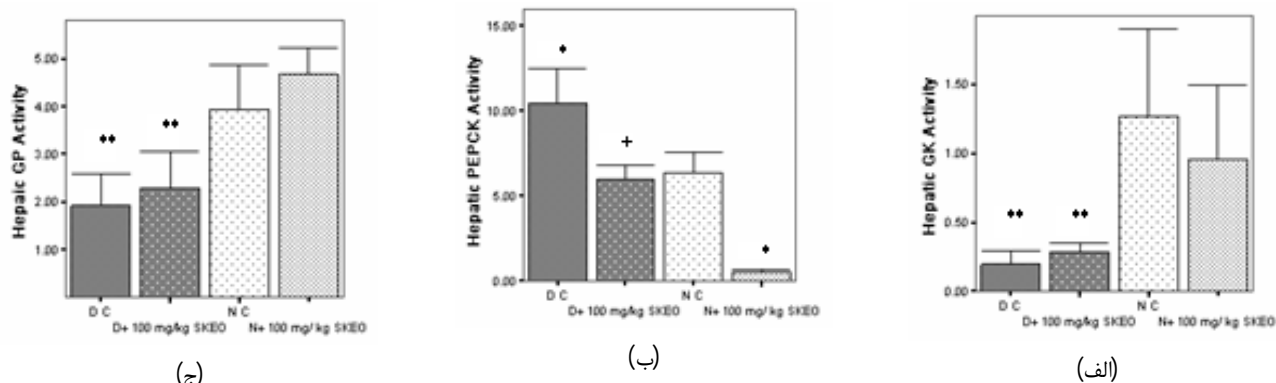
اين تغييرات معنى‌دار نبود ( $p > 0/05$ ) (شكل 1-ج و 2-ج). افزايش سطوح mRNA, GP كبدى در گروههاى نرمال و ديابتى تحت تيمار با SKEO به موازات افزايش فعاليت GP است ( $r = 0/926$  در  $p < 0/01$ ) (شكل 3-ج)

اثر ساتوريا خوزستانىكا بومى بر فعاليت و ميزان GK mRNA كبدى

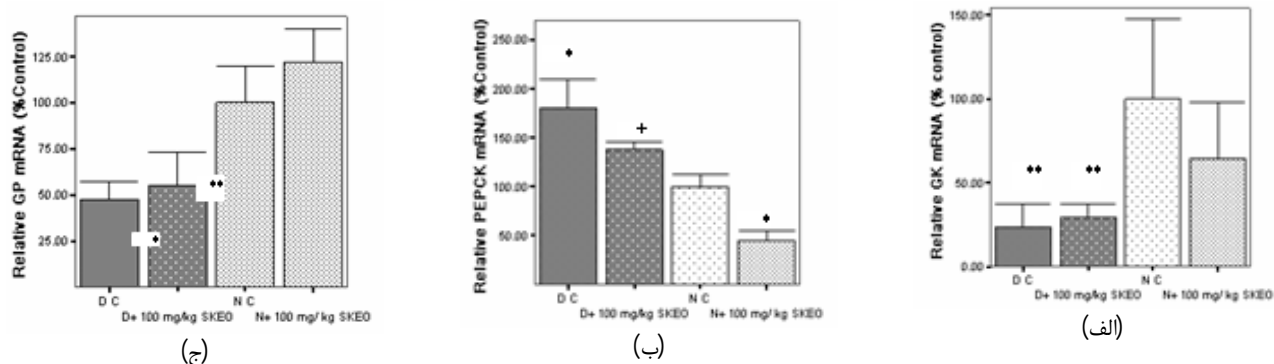
فعاليت و سطوح mRNA آنزيم گليكوژن فسفريلاز كبدى در رتهائى ديابتى در قياس با گروه کنترل نرمال بطور معنى‌دار کاهش داشت ( $p < 0/05$ ). در رتهائى نرمال تحت تيمار با SKEO در قياس با گروه کنترل نرمال تغيير معنى‌دارى در ميزان mRNA و فعاليت GK ديده نشد ( $p > 0/05$ ). در رتهائى ديابتى تحت تيمار با SKEO در قياس با گروه کنترل ديابتى يك افزايش 44% در فعاليت و يك افزايش 25% در سطوح mRNA آنزيم كبدى GK مشاهده شد (شكل 1-الف و 2-الف) ولى اين اختلافات معنى‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). ارتباط معنى‌دارى بين فعاليت و سطوح mRNA آنزيم GK در تمام گروههاى مورد آزمون مشاهده شد ( $r = 0/961$ ,  $p < 0/01$ ) (شكل 3-الف)

اثر ساتوريا خوزستانىكا بر فعاليت و بيان ژن PEPCK كبدى

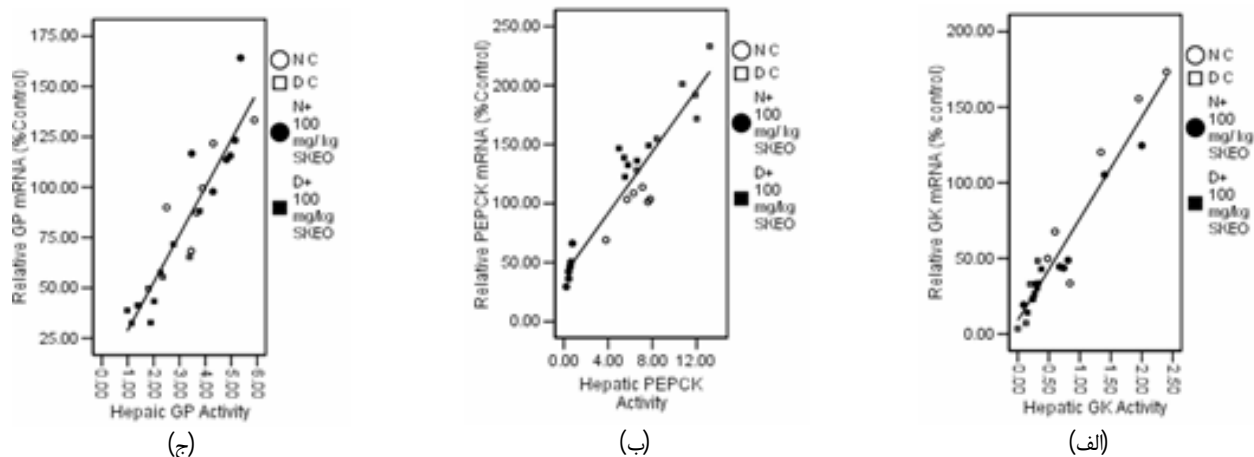
سطوح mRNA و فعاليت PEPCK كبدى رتهائى ديابتى در قياس با گروه کنترل نرمال بطور قابل توجهى افزايش نشان داد ( $p < 0/001$ ). فعاليت PEPCK كبدى و سطوح mRNA آن در رتهائى ديابتى و نرمال تحت تيمار با SKEO



شكل شماره 1- اثر تجویز SKEO نوع بومى بر فعاليت آنزيم‌هاى كبدى: الف- GK - ب- PEPCK و ج- GP. نرمال (N)، کنترل نرمال (NC)، ديابتى (D) و کنترل ديابتى (DC). مقادير (means ± S. E. M) از هر گروه داراى 6 رت بدست آمد.  $p < 0/05$  و  $p < 0/001$  در قياس با گروه کنترل نرمال و  $p < 0/001$  در قياس با گروه کنترل ديابتى بدست آمده است. فعاليت آنزيم بصورت نانومول بر ميلي گرم پروتئين در قيقه محاسبه شده است.



شکل شماره 2- اثر تجویز SKEO نوع بومی بر سطوح نرمالیز شده mRNA آنزیم‌های کبدی با  $\beta$  actin: الف- GK - ب- PEPCK و ج- GP. نرمال (N)، کنترل نرمال (NC)، دیابتی (D) و کنترل دیابتی (CD). مقادیر (means  $\pm$  S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد.  $p < .05$  و  $p < .001$  در قیاس با گروه کنترل نرمال  $p < .05$  در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است.



شکل شماره 3- همبستگی بین سطوح mRNA و فعالیت‌های یک آنزیم خاص. میزان همبستگی‌ها: الف- با  $r=0/961$  برای GK، ب- با  $r=0/931$  برای PEPCK و ج- با  $r=0/926$  برای GP در  $p < 0/01$  معنی دار است. اعداد بکار رفته جهت رسم این نمودار بترتیب با اعداد قبلی فعالیت (شکل 1) و سطوح mRNA (شکل 2) برای یک آنزیم خاص یکسان است.

### بحث و نتیجه‌گیری

پائین‌آوردگی گلوکز پلاسما توسط ساتورجا خوزستانیکا بومی فقط در رتهای دیابتی بعنوان یک حالت هیپرگلاسمی دیده شد. در مطالعه حاضر، یک کاهش در فعالیت و میزان mRNA آنزیم گلوکوکیناز (GK) کبدی رتهای دیابتی مشاهده شد و این سطوح پس از تیمار 21 روزه با ساتورجا خوزستانیکا افزایش متوسط نشان داد. داده‌ها یک همبستگی بالایی را بین افزایش متوسط فعالیت و سطوح GK mRNA در رتهای تحت تیمار با SKEO نشان می‌دهند (شکل 1-ج). از طرف

یافته‌ها نشان می‌دهند که رتهای دیابتی سطوح پلاسمائی بالاتری از گلوکز داشته و سطح انسولین پلاسما آنها در قیاس با رتهای گروه کنترل نرمال کاهش یافته است. اثرات پائین‌آوردگی گلوکز پلاسما بطور قابل توجهی تنها در رتهای دیابتی تحت تیمار با ساتورجا خوزستانیکا مشاهده شد و این در حالیست که سطوح پلاسمائی قند در این رتها نسبت به رتهای نرمال بطور قابل ملاحظه‌ای هم‌چنان بالاست. از اینرو عمل

از طریق فعال نمودن سیگنا نقش دارد (23). رت‌های نرمال تحت تیمار با SKEO با یک کاهش قابل توجه در فعالیت PEPCK کبدی نظیر گزارش قبلی (9) و همچنین سطوح mRNA نشان می‌دادند. سطوح افزایش یافته mRNA و فعالیت PEPCK رت‌های دیابتی دریافت کننده SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی بطور معنی‌داری کاهش داشت. از طرفی همبستگی بالائی بین میزان فعالیت و سطوح mRNA آنزیم PEPCK در تمامی گروه‌های مورد آزمایش وجود داشت (شکل 3-ب). این یافته‌ها نقش اساسی SKEO در پیشبرد غیرفعال شدن سنتز PEPCK از طریق فروکش نمودن فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ وابسته به استرس، بواسطه گونه‌های فعال اکسیژن پیشنهاد می‌کنند. در این زمینه، چندین گیاه آنتی‌دیابتیک با توانائی کاهش فعالیت PEPCK از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی‌شان معرفی شده است (24-25).

در مطالعه حاضر، فعالیت GP کبدی و سطوح mRNA آن در رت‌های دیابتی در قیاس با رت‌های کنترل نرمال بطور قابل توجهی کاهش نشان داد ولی پس از تیمار آنها با SKEO در مقایسه با کنترل دیابتی افزایش متوسط نشان دادند. همچون نتایج بدست آمده از تحقیق سعادت و همکاران (9)، فعالیت GP کبدی رت‌های نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با کنترل نرمال بطور متوسط افزایش نشان داد هر چند تمام این تغییرات معنی‌دار نبودند. این افزایش سطوح GP mRNA در رت‌های نرمال و دیابتی تحت تیمار با SKEO به موازات افزایش فعالیت GP آنها صورت پذیرفت. از طرفی سطوح انسولین پلاسمائی در رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با کنترل دیابتی بطور جزئی افزایش نشان می‌دهد. از اینرو، اثر مزمن انسولین بر فعال شدن فعالیت GP که بواسطه

دیگر سطوح انسولین به طور جزئی در رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی افزایش نشان می‌دهد. تحلیل یافته‌ها، این ایده را تقویت می‌نماید که افزایش متوسط فعالیت GK کبدی در رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO احتمالاً بدلیل افزایش جزئی سطوح پلاسمائی انسولین این گروه بوده است.

استرپتوزوتوسین بعنوان یک ماده دیابتوزن جانوران آزمایشگاهی از طریق افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)<sup>1</sup> در سلول‌های بتا پانکراس عمل می‌نماید (15). گونه‌های فعال اکسیژن سبب آسیب رساندن و تسریع روند تخریب سلول‌های بتا می‌شود (16-17). اجزاء عمده اسانس روغنی ساتورجا خوزستانیکا بومی شامل مواد فنلیک (نظیر کارواکرول، پاراسیمین و تیمول) و مواد فنیل پروپن نظیر ائوژنول می‌باشد که بعنوان مواد آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند (18). گزارش‌های پیشین نشان می‌دهند که اثر محافظتی فلاونوئیدها بر سلول‌های بتا در مدل‌های حیوانی دیابتی است که بصورت سینرژی با آنتی‌اکسیدانها عمل می‌کنند (19).

از اینرو تصور می‌شود که SKEO احتمالاً سبب تحریک در ترشح انسولین از باقیمانده های سلول بتا از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی‌اش می‌شود. در این زمینه، شماری از دیگر گیاهان که یک اثر آنتی‌هایپرگلاسیمی و یک اثر تحریکی بر رها شدن انسولین بر سلول‌های بتا دارند گزارش شده اند (20-21).

سطوح mRNA و فعالیت فسفو انول پیرووات کربوکسی کیناز (PEPCK) کبدی در رت‌های دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین در قیاس با گروه کنترل نرمال افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. پژوهش‌های پیشین اشاره دارند که هایپرگلاسیمی دیابتیک سبب ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال و بدنال آن افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (22). این استرس اکسیداتیو افزایش یافته در افزایش بیان ژن PEPCK

1. Reactive Oxygen Species

در کبد رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO نوع بومی ایجاد می‌شود. عملکرد نهائی SKEO بومی بر رت‌های دیابتی تحت تیمار، افزایش متوسط در مصرف گلوکز کبدی بواسطه بالا بردن ظرفیت جذب گلوکز در کبد بواسطه GK و کاهش نسبتاً شدید برون ده گلوکز کبدی بواسطه مهار گلوکونئوژنز بوده که اثر خالص آن کاهش یافتن سطوح پلاسمائی گلوکز میباشد. به نظر می‌رسد این عمل در ارتباط با خواص آنتی‌اکسیدان SKEO باشد.

پایدارسازی mRNA آن صورت می‌پذیرد مشاهده شد (26). یک مکانیسم دیگر برای توجیه افزایش سطوح GP کبدی (گلیکوژنولیز) در رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO شاید یک واکنش القائی در جهت جبران مهار گلوکونئوژنز باشد زیرا کاهش در برون‌ده کبدی گلوکز بواسطه مهار گلوکونئوژنز معمولاً کارا نبوده و به نظر می‌رسد با تحریک گلیکوژنولیز جبران شود.

در نهایت مجموعه یافته‌ها اشاره دارند که افزایش متوسطی در مقادیر GK و GP و یک کاهش قابل توجه در PEPCK



## References

1. Jamzad Z. A new species of the genus *Satureja* (Labiatae) from Iran. *Iran J Bot*, 1994; 6: 215-218.
2. Amanlou M, Dadkash F, Salehnia A, Farsam H. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzestanica* Jamzad extract. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2005; 8:102-106.
3. Amanlou M, Fazeli MR, Arvin A, Amin HG, Farsam H. Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzestanica*. *Fitoterapia*, 2004; 75: 768-770.
4. Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi SHR, Ebrahimi M, Shafiee A, Fouladian F, Keshavarz K, Sorouri S, Khorasani R, Kazemi A. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja khuzestanica* in rat in vivo: a toxicopharmacological study. *Med Sci Monit*, 2003; 9: 331-335.
5. Nazari A, Delfan B, Shirkhani Y, Kiyaneh A, Mandegary A. Effect of decoction of *Satureja khuzestanica* Jamzad on blood coagulation time, triglyceride and glucose levels in rats. *Pak J Biol Sci*, 2005; 8: 790-792.
6. Cherrington, C. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*, 1999, 48: 1198-1214.
7. Nordli RC, Foster JD, Lane A J. Regulation of glucose production by the liver. *Ann Rev Nutr*, 1999; 19: 379-406.
8. Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Pract. Res. Clin Endocrinol Metab*, 2007; 21: 587-605.
9. Saadat M, Pournourmohammadi S, M. Donyavi M, Khorasani R, Amin G, A Salehnia A, Abdollahi M. Alteration of rat hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities by *Satureja khuzestanica* Jamzad essential oil. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2004; 7: 327-331.
10. Sefidkon F, Ahmadi S. Essential oil of *Satureja khuzestanica* Jamzad. *J Essent oil Res*, 2000; 12: 427-428.
11. Nishio T, Toyoda Y, Hiramatsu M, Chiba T, Miwa I. Decline in glucokinase activity in the arcuate nucleus of streptozotocin induced diabetic rats. *Biol pharm Bull*, 2006; 26: 216-219.
12. Aiston S, Agius L. Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes*, 1999; 48: 15-20.
13. Petrescu I, Bojan, Saied O, Barzu O, Schmidt F, Kohnle F. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5-diphosphate as nucleotide substrate. *Analy Biochem*, 1979; 96: 279-281.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-275.
15. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic

- beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J pharmacobiodyn*, 1990; 13: 259-262.
16. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia*, 2008; 51: 216-226.
17. Gille L, Schotthly P, Friesen N, Walde SS, Udilova N, Nohl H, Gleichmann H. Generation of hydroxyl radicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro. *Pharmacol Toxicol*, 2002; 90: 317-326.
18. Farsam H, Amanlou M, Radpour MR, Salehinia AN, Shafiee A. Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzestanica* Jamzad from Iran. *Flav Fragran J*, 2004; 19: 308-310.
19. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta- cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 1999; 48: 2398-2306.
20. Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue anti-oxidants in streptozotocin induced rats. *Biol pharm Bull*, 2004; 27: 1212-1217.
21. Rajasekaram S, Sivagnanam K, Subramanian S. Modulatory effects of *Aloe vera* leaf gel extract on oxidative stress in rats treated with streptozotocin. *J pharm Pharmacol*, 2005; 57: 241-246.
22. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, 2000; 49: 27-29.
23. Waltner-Law M, Daniel MC, Sutherland C, Granner DK. NF-kappa B inhibits glucocorticoid and cAMP-mediated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*, 2000; 275: 31847-31856.
24. Govorko D, Logendra S, Wang Y, Esposito D, Komarnytsky S, Ribnicky D, Poulev A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I. Polyphenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *Am J Physiol Endocrin Metab*, 2007; 293: E 1503-E 1510.
25. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 2006; 55: 2180-2191.
26. Venkata-Rao P, Pugazhenth S, Khandelwal RL. The effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin supplementation on expression of the glycogen phosphorylase gene in rat liver. *J Biol Chem*, 1995; 270: 24955-24960.