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

غلامرضا شهسواری[1و2]، عبدالوهاب احسانی زنوز[3]، مسعود هوشمند[4]، قاسم آهنگری[4]، محسن فیروزرای[5]

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 ساتورجا خوزستانیکا جمزاد(**SKEO**) نوع بومی بر فعالیت و بیان ژن برخی آنزیم‌های تنظیم‌کننده 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 100**mg/kg** در روز از طریق دهان به رتهای دیابتی و نرمال بمدت سه هفته خورانده شد. 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 افزایش‌یافته **mRNA** و فعالیت **PEPCK** رتهای دیابتی دریافت کننده **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: آنتی هایپرگلایسمی، رتهای دیابتی، بیان ژن، گلوکوکیناز، گلیکوژن فسفوریلاز کبدی، فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز، ساتورجا 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[1] 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)[2] گزارش شده است شامل: اثر ضدالتهابی و ضد درد (2)، ضدمیکروبی (3)، کاهش دهنده سطوح پلاسمائی تری‌گلیسرید و قند (5-4). 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 گلیکوژنز و رهاسازی آن از طریق گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز بعمل می‌آورد(6). گلوکوکیناز کبدی(GK)[3] 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)[4] 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)[5] یکی از واکنش‌های تنظیمی مهم را در راه متابولیکی گلوکلوئوژنز کاتالیز می‌کند. مطالعات در حیوانات دیابتی نشان داده که گلوکونئوژنز 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[6] بر فعالیت و بیان ژن برخی از آنزیم‌های تنظیمی قند شامل GK، GP و PEPCK در کبدرتهای 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 کول‌کنی 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 آب‌گیری از اسانس بعمل آمده و در $4^{0}C$ نگهداری شد(10).

رتهای نر نژاد ویستار، با وزن تقریبی 230-180 گرم با تزریق تک دوز (وزن بدن 45mg/kg) استروپتوزوتوسین 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

دوره تیمار بمدت 3 هفته بوده است. پس از پایان دوره تیمار، در حالت سیری، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (50mg/kg) و زایلوزین (10mg/kg) بیهوش گردیده و بلافاصله نمونه خون از قلب رتها جمع‌آوری شد. کبد حیوان را سریعاً برداشته، به قطعات بسیار کوچک برش داده، با محلول سالین خنک چندین بار شستشو داده و در نیتروژن مایع منجمد شد سپس در فریزر $-80^{\circ}c$ تا هنگام آزمایشات نگهداری گردید.

غلظت گلوکز با استفاده از روش گلوکز اکسیداز توسط کیت تهیه شده از شرکت پارس آزمون و انسولین با استفاده از کیت انسولین رت با روش الایزا ساخت شرکت مرکودیا کشور سوئد اندازه‌گیری شد.

برای تمام آنالیزها، قسمت‌هائی از بافت کبدی در 4 حجم از بافر سرد 20mM Tris-HCl، pH=7/4 هموژنیزه گردید. در ضمن بافر مذکور محتوی 1mM EDTA برای PEPCK، حاوی 4mM EDTA و دیتیوتریتول 5mM/. برای GP و هم‌چنین شامل 100mM KCl، 2mM MgCl2، 2mM 1EDTA و دیتیوتریتول 1 mM برای GK بوده است. هموژنیزاسیون با استفاده از هموژنایزر polytron بصورت پالسی بمدت 45 ثانیه انجام شد. مخلوط همگن بدست آمده یک ساعت در 105000×g در $4^{\circ}C$ با استفاده از اولتراسانتریفوژ Beckman سانتریفوژ گردید. سوپرنانت حاصل برای سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت‌های GK و هگزوکیناز با یک تغییراتی در روش توصیف شده قبلی انجام پذیرفت (11). سنجش‌ها در بافر 10mM Tris-HCl (pH=7/5) حاوی KCl 100mM و MgCl2 8mM، ATP 5mM، NADP 0/5mM، دیتیوتریتول 1mM، سرم آلبومین گاوی 0/1g/l، گلوکز 6-فسفات دهیدروژناز 0/5U/ml، گلوکز 100mM یا 0/5 و 50 میکرولیتر از سوپرنانت در حجم نهائی 1ml انجام گرفت. فعالیت هگزوکیناز در غلظت 0/5mM گلوکز و فعالیت GK با اختلاف بین فعالیت‌های آن در غلظت 100 mM و 0/5 گلوکز بدست آمد. فعالیت GP بصورت اسپکتروفتومتری با تغییری در روش توصیف شده قبلی اندازه‌گیری شد (12). غلظت 5mM از AMP بجای کافئین به مخلوط واکنش اضافه گردید. فعالیت PEPCK مطابق روش توصیف شده پیشین تعیین گردید(13). توتال پروتئین با روش لوری اندازه‌گیری شد (14). فعالیت‌های آنزیم بصورت نانومول از سوبسترا که توسط یک میلی‌گرم پروتئین سوپرنانت کبدی در دقیقه تبدیل می‌شود محاسبه گردید.

همه RNA کبد هر رت با استفاده از کیت High Pure RNA tissue و مطابق دستورالعمل موجود در کیت استخراج گردید. نسبت جذبی 260/280 نانومتر برای تمام استخراج‌ها بین 2-1/8 بود و اینتگریتی RNA توسط الکتروفورز با استفاده از آگارز ـ ایتدبوم برماید مورد سنجش قرار گرفت. توتال RNA با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis مطابق با دستورالعمل کیت مورد رونوشت برداری معکوس قرار گرفت. کیت استخراج RNA و ساخت cDNAاز شرکت Roche Diagnostics ساخت کشور آلمان مورد استفاده قرار گرفته است.

Real time- PCR با سیستم Lightcycler 2 با استفاده از کیت Lightcycler Fast Start DNA SYBR Green I انجام شد. توالی پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژنهای کبدی GP و PEPCK و هم‌چنین β actin بعنوان استاندارد درونی در جدول 1 آمده است. نمونه‌های حاوی مخلوط نهائی واکنش در دستگاه Lightcycler در $95^{\circ}C$بمدت 10 دقیقه به منظور Predenaturation انکوبه گردید. سپس 45 چرخه PCR جهت ازدیاد تعداد کپی هر ژن انجام گردید. هر

چرخه Amplification شامل $95^{\circ}C$ بمدت 10 ثانیه، Tm پرایمر بمدت 15 ثانیه (مطابق جدول 1) و $72^{\circ}C$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 استاندارد بدست آمد. میزان نسبی سطوح mRNA هر ژن بصورت نرمالیزه در برابر β 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

جدول شماره 1- توالی پرایمرها برای بیان ژنهای گلوکوکیناز، فسفو انول پیروات کربکسی و اتیلن b

Gene name	Genbank accession	Primer sequences	Amplicon size	Tm
GP	NM_022268	Forward: 5'-CCCGAGCACCCAATGACTTTAACC -3' Reverse:5'- GCGAGTGCGGGATGTGTGTCA -3'	298 bp	66°C
PEPCK	NM_198780	Forward:5'-GTCACCATCACTTCCTGGAAGA -3' Reverse:5'-GGTGCAGAATCGCGAGTTG-3'	84 bp	55°C
β actin	NM_031144	Forward:5'-ATGGATGACGATATCGCTGC-3' Reverse:5'-CTTCTGACCCATACCCACCA-3'	150 bp	57°C

یافته ها

اثر ساتوریا خوزستانیکا بر سطوح پلاسمائی گلوکز و انسولین

غلظت گلوکز پلاسما 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 پلاسما 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-داری نداشت ($p>0/05$). بنابراین کاهش قند خون فقط در رتهای دیابتی بعنوان مدل هایپرگلایسمی مشاهده می شود (جدول 2). مقادیر(means± 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.

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

گروه	انسولین پلاسما (µg/l)	گلوکز پلاسما (mM)
کنترل نرمال	0/99±0/46	8/29±0/99
نرمال + SKEO	0/63±0/15	7/18±0/51
کنترل دیابتی	0/22±0/47 *	22/31±2/5 *
دیابتی + SKEO	0/33±0/075 *	15/59±3/3 * و **

مقادیر(means± 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.

اثر ساتوریا خوزستانیکا بومی بر فعالیت و میزان GK mRNA کبدی

فعالیت و سطوح mRNA آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کبدی در رتهای دیابتی در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور معنی‌دار کاهش داشت (p<0/05). در رتهای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال تغییر معنی‌داری درمیزان mRNA و فعالیت GK دیده نشد (p>0/05). در رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی یک افزایش 44% در فعالیت و یک افزایش 25% در سطوح mRNA آنزیم کبدی GK مشاهده شد (شکل1-الف و 2-الف) ولی این اختلافات معنی‌دار نبود (p>0/05). ارتباط معنی‌داری بین فعالیت و سطوح mRNA آنزیم GK در تمام گروههای مورد آزمایش دیده شد (r= ./961 ، p<0/01) (شکل 3-الف)

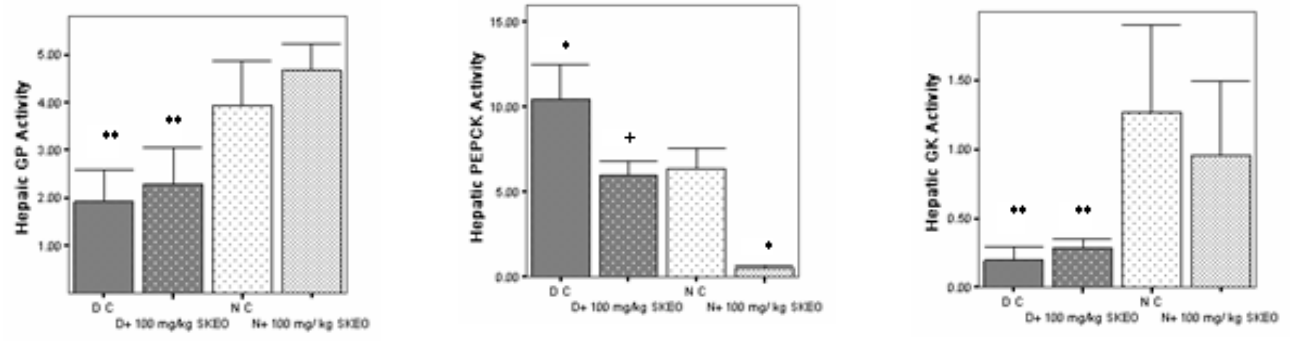
اثر ساتوریا خوزستانیکا بر فعالیت و بیان ژن PEPCK کبدی

سطوح mRNA و فعالیت PEPCK کبدی رتهای دیابتی در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور قابل توجهی افزایش نشان داد (p<0/001). فعالیت PEPCK کبدی و سطوح mRNA آن در رتهای دیابتی و نرمال تحت تیمار با SKEO به ترتیب در قیاس با گروه کنترل دیابتی و کنترل نرمال بطور معنی‌داری کاهش نشان داد p<0/05 (شکل1-ب و 2-ب). وابستگی زیادی بین فعالیت و سطوح mRNA، PEPCK کبدی در تمام گروههای رت وجود داشت (r=0/931، p<0/01) (شکل 3-ب)

اثر ساتوریا خوزستانیکا بر فعالیت و بیان ژن GP کبدی

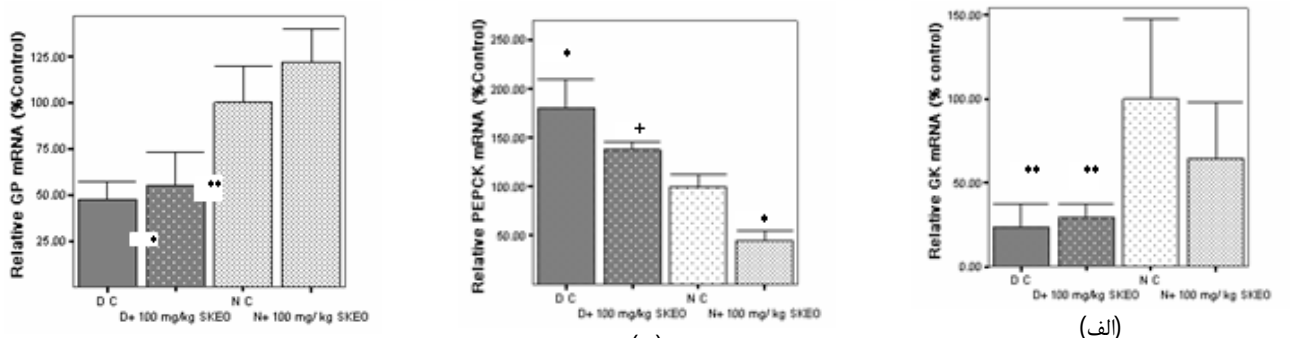
فعالیت GP کبدی و سطوح mRNA آن در رتهای دیابتی در قیاس با رتهای نرمال بطور معنی‌داری کاهش نشان داد (p<0/05). رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی به ترتیب یک افزایش 11% و 22% در فعالیت و سطوح mRNA کبدی GP ارائه دادند. در صورتی که این افزایش در رتهای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور متوسط 21% بود.

این تغییرات معنی‌دار نبود (p>0/05) (شکل 1-ج و 2-ج). افزایش سطوح mRNA، GP کبدی در گروههای نرمال و دیابتی تحت تیمار با SKEO به موازات افزایش فعالیت GP است (r=0/926 در p<0/01) (شکل 3-ج)



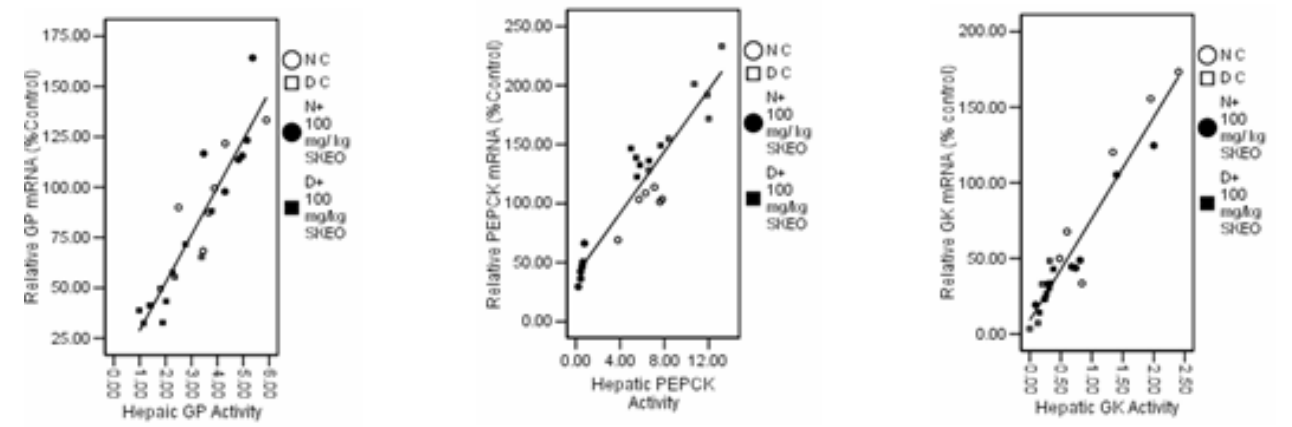
(ج) (ب) (الف)

شکل شماره 1- اثرتجویز SKEO نوع بومی بر فعالیت آنزیم های کبدی :الف - GK ب -PEPCK و ج -GP. نرمال(N)، کنترل نرمال(NC)، دیابتی (D) و کنترل دیابتی(DC). مقادیر(means± S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد. ./1 > p^{*} و ./5 > p^{**} در قیاس با گروه کنترل نرمال و p^{+} <0/001 در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است. فعالیت آنزیم بصورت نانومول بر میلی گرم پروتئین در قیقه محاسبه شده است.



(ج) (ب) (الف)

شکل شماره 2- اثر تجویز SKEO نوع بومی بر سطوح نرمالیز شده mRNA آنزیم های کبدی با β actin :الف- GK ب- PEPCK و ج- GP. نرمال(N)، کنترل نرمال(NC)، دیابتی(D) و کنترل دیابتی(CD)). مقادیر (means± S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد. 1. . /. > *p و 5. /. > **p در قیاس با گروه کنترل نرمال 0/05> +p در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است.



(ج) (ب) (الف)

شکل شماره 3- همبستگی بین سطوح mRNA و فعالیت های یک آنزیم خاص. میزان همبستگی ها: الف- با r=0/961 برای GK، ب- با r=0/931 برای PEPCK و ج- با r=0/926 برای GP در 0/01> p معنی دار است. اعداد بکار رفته جهت رسم این نمودار بترتیب با اعداد قبلی فعالیت (شکل1) و سطوح mRNA (شکل2) برای یک آنزیم خاص یکسان است.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می دهند 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 پائین‌آورندگی 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 پائین‌آورندگی گلوکز پلاسما توسط ساتورجا خوزستانیکا بومی فقط در رتهای دیابتی بعنوان یک حالت هیپرگلایسیمی 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 بالائی را بین افزایش متوسط فعالیت و سطوح GK mRNA در رتهای تحت تیمار با SKEO نشان می‌دهند (شکل 1-ج). از طرف

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 دیابتوژن جانوران آزمایشگاهی از طریق افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال(ROS)[1] در سلولهای بتا پانکراس عمل می‌نماید(15). گونه‌های فعال اکسیژن سبب آسیب رساندن و تسریع روند تخریب سلولهای بتا می‌شود(17-16). اجزاء عمده اسانس روغنی ساتورجا خورستانیکا 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 می دهند که اثر محافظتی فلاونوئیدها بر سلولهای بتا در مدلهای حیوانی دیابتی است که بصورت سینرژی با آنتی‌اکسیدانها عمل می کنند (19).

از اینرو تصور می‌شود که SKEO احتمالاً سبب تحریک در ترشح انسولین از باقیمانده های سلول بتا از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی‌اش می‌شود. دراین زمینه، شماری از دیگر گیاهان که یک اثر آنتی‌هایپرگلایسیمی 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 هایپرگلایسیمی دیابتیک سبب ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال و بدنبال آن افزایش استرس اکسیداتیو می شود (22). این استرس اکسیداتیو افزایش یافته در افزایش بیان ژن PEPCK 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 می دادند. 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 می کنند. در این زمینه، چندین گیاه آنتی دیابتیک 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 امده 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

1. Reactive Oxygen Species

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.

درنهایت مجموعه یافته‌ها اشاره دارند که افزایش متوسطی در مقادیر GK و GP و یک کاهش قابل توجه در PEPCK در کبد رتهای دیابتی تحت تیمار با SKEO نوع بومی ایجاد می شود. عملکرد نهائیSKEO بومی بر رتهای دیابتی تحت تیمار، افزایش متوسط در مصرف گلوکز کبدی بواسطه بالا بردن ظرفیت جذب گلوکز در کبد بواسطه GK و کاهش نسبتا 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.

References

1. Jamzad Z. A new species of the genus Satureja (Labiatae) from Iran. Iran J Bot, 1994; 6: 215-218.
2. Amanlou M, Dadkah F, Salehnia A, Farsam H. An anti-inflamatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of Saturega 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 Satueja 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, antihyerlipidemic, reproduction stimulatory properties and safely 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, Kiyanei 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 phosphenolpyruvate 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 arcutate nucleur 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. Protien measurement with the Folin-Phenol reagent. J Biol Chem, 1951; 193: 265-275.
15. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protectes 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, Schottohly 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, Subramanion 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, Pugazhenthi 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.