

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

غلامرضا شھسواری^{1,2}، عبدالوھاب احسانی زنوز³، مسعود ھوشمند⁴، قاسم آھنگری⁴، محسن فیروززای⁵

1- مربی، مرکز تحقیقات داروھای 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 جمزاد (SKEO) نوع بومی بر فعالیت و بیان ژن برخی آنزیم‌های تنظیمی-کننده قند در کبد رتھای 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 رتھای دیابتی و نرمال بمدت سه هفته خوراند شد. سطوح mRNA با استفاده از تکنیک Real time-PCR اندازه‌گیری شد.

Ø یافته‌ها: غلظت قند خون رتھای دیابتی دریافت‌کننده SKEO در قیاس با رتھای کنترل دیابتی بطور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.001$). فعالیت و سطوح mRNA آنزیم‌های GK و GP در رتھای 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 رتھای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). سطوح افزایش‌یافته mRNA و فعالیت PEPCK رتھای 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 رتھای 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، رتھای 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 جمزاد¹ 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)، 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 نگهداری سطوح قند خون از طریق تعادل بین جذب و ذخیره گلوکز از طریق گلیکوژن و رهاسازی آن از طریق گلیکوژنولیز و گلوکونئوزن 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 گلوکولئوزن کاتالیز می‌کند. مطالعات در حیوانات دیابتی نشان داده که گلوکونئوزن 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 بومی⁶ بر فعالیت و بیان ژن برخی از آنزیم-

های تنظیمی قند شامل GK، GP 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 ستریات 0/1mol/l خنک بصورت داخل صفاقی دیابتی گردید. پس از 72 ساعت از تزریق استرپتوزوتوسین، رت‌هایی 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 100mg/kg SKEO 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°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، قسمت‌هایی 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 PEPCCK، حاوی 4mM EDTA و دیتیوتریتول 5mM، برای GP و همچنین شامل 100mM KCl، 2mM MgCl₂، 1mM EDTA و دیتیوتریتول 1mM برای GK بوده است. هموژنیزاسیون با استفاده از هموژنایزر polytron بصورت پالسی بمدت 45 ثانیه انجام شد. مخلوط همگن بدست آمده یک ساعت در 4°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 8mM MgCl₂، 5mM ATP، 0/5NADP، 1mM سرم آلبومین گاوی 0/1g/l، گلوکز 6-فسفات دهیدروژناژ 0/5U/ml، گلوکز 100mM یا 0/5 و 50 میکرولیتر از سوپرنانت در حجم نهایی 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 PEPCCK مطابق روش توصیف شده پیشین تعیین گردید (13). توتال پروتئین با روش لوری اندازه‌گیری شد (14). فعالیت‌های آنزیم بصورت نانومول از سوپسترا 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 1/8-2 بود و اینتگریتی RNA توسط الکتروفورز با استفاده از آگارز - 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 cDNA از 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 PEPCCK و همچنین β actin بعنوان استاندارد درونی در جدول 1 آمده است. نمونه‌های حاوی مخلوط نهایی واکنش در دستگاه Lightcycler در 95°C بمدت 10 دقیقه به منظور Predenaturation انکوبه گردید. سپس 45 چرخه PCR جهت ازدیاد تعداد کپی هر ژن انجام گردید. هر

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

چرخه Amplification شامل 95°C بمدت 10 ثانیه، T_m پرایمر بمدت 15 ثانیه (مطابق جدول 1) و 72°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% ریت 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، فسفو انول پیرووات کربکسی و اتیلین b

Gene name	Genbank accession	Primer sequences	Amplicon size	T_m
GP	NM_022268	Forward: 5'-CCCCGAGCACCCAATGACTTTAACC -3' Reverse: 5'- GCGAGTGC GGGGATGTGTGTCA -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 پلازما در رتھای 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 رتھای 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 رتھای 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 رتھای نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال تفاوت معنی-

داری نداشت ($p > 0/05$). بنابراین کاهش قند خون فقط در رتھای دیابتی بعنوان مدل هایپرگلاسمی مشاهده می شود (جدول 2). مقادیر ($\text{means} \pm \text{S. E. M}$) 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 روغانی 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 ($\text{means} \pm \text{S. E. M}$) 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 ترتیب در قیاس با گروه کنترل دیابتی و کنترل نرمال بطور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p < 0/05$ (شکل 1-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.

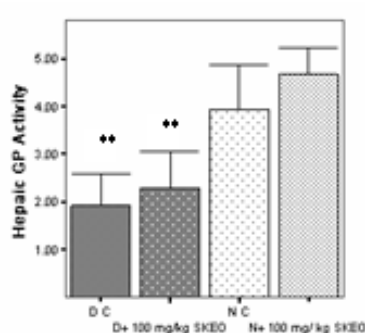
این تغییرات معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) (شکل 1-ج و 2-ج). افزایش سطوح mRNA GP کبدی در گروه‌های نرمال و دیابتی تحت تیمار با SKEO به موازات افزایش فعالیت GP است ($r = 0/926$ در $p < 0/01$) (شکل 3-ج)

اثر ساتوریا خوزستانی‌کا بومی بر فعالیت و میزان GK mRNA کبدی

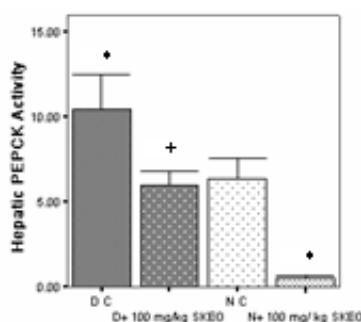
فعالیت و سطوح mRNA آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کبدی در رت‌های دیابتی در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور معنی‌دار کاهش داشت ($p < 0/05$). در رت‌های نرمال تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل نرمال تغییر معنی‌داری در میزان mRNA و فعالیت GK دیده نشد ($p > 0/05$). در رت‌های دیابتی تحت تیمار با SKEO در قیاس با گروه کنترل دیابتی یک افزایش 44% در فعالیت و یک افزایش 25% در سطوح mRNA آنزیم کبدی GK مشاهده شد (شکل 1-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 ($r = 0/961$ ، $p < 0/01$) (شکل 3-الف)

اثر ساتوریا خوزستانی‌کا بر فعالیت و بیان ژن PEPCK کبدی

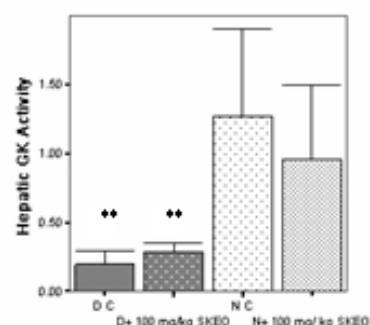
سطوح mRNA و فعالیت PEPCK کبدی رت‌های دیابتی در قیاس با گروه کنترل نرمال بطور قابل توجهی افزایش نشان داد ($p < 0/001$). فعالیت PEPCK کبدی و سطوح mRNA آن در رت‌های دیابتی و نرمال تحت تیمار با SKEO



(ج)

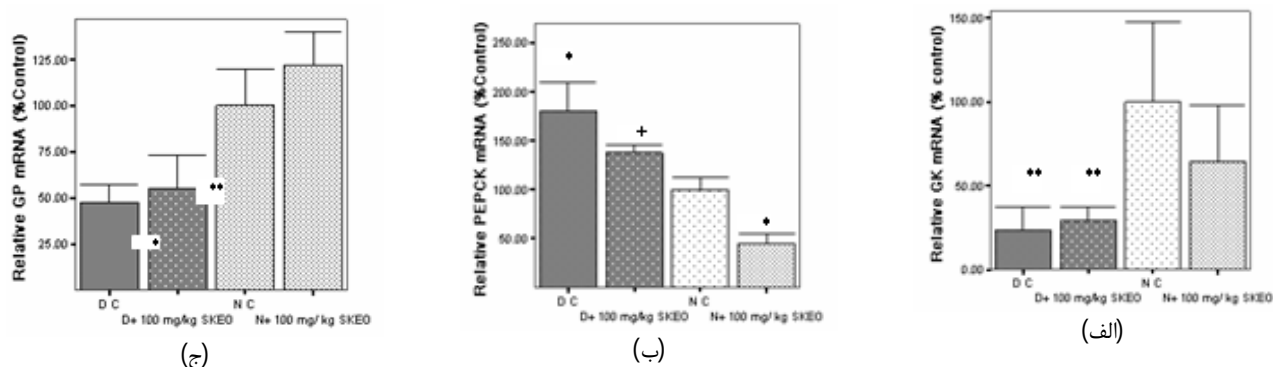


(ب)

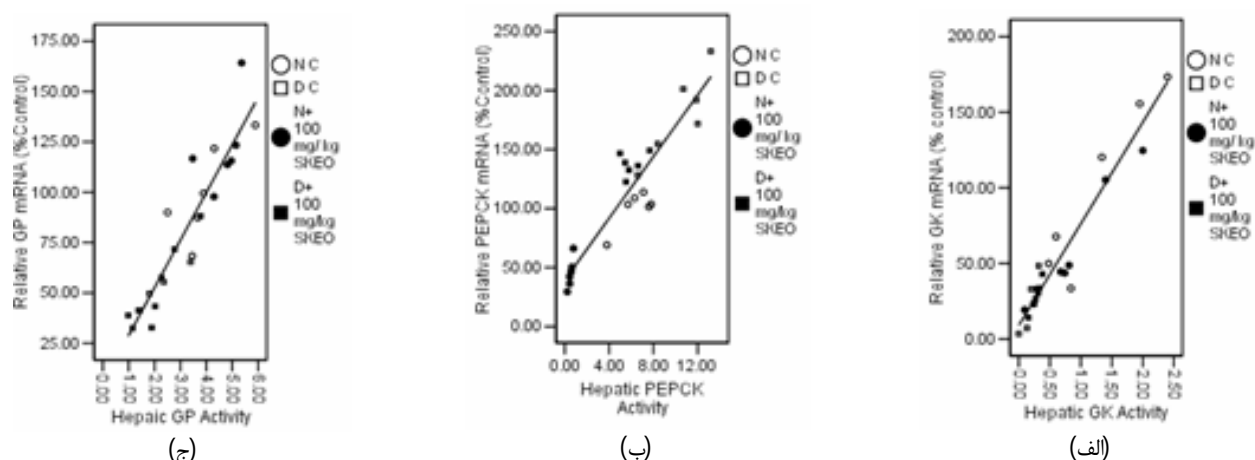


(الف)

شکل شماره 1- اثر تجویز SKEO نوع بومی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی: الف- GK، ب- PEPCK، ج- GP. نرمال (N)، کنترل نرمال (NC)، دیابتی (D) و کنترل دیابتی (DC). مقادیر (means $\pm$ S. E. M) از هر گروه دارای 6 رت بدست آمد. 1. $p < 0/05$ و 2. $p < 0/001$ در قیاس با گروه کنترل نرمال و 3. $p < 0/001$ در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است. فعالیت آنزیم بصورت نانومول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شده است.



شکل شماره 2- اثر تجویز SKEO نوع بومی بر سطوح نرمالیز شده mRNA آنزیم‌های کبدی با β 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. $p < 0.05$ و $p < 0.01$ در قیاس با گروه کنترل دیابتی بدست آمده است.



شکل شماره 3- همبستگی بین سطوح mRNA و فعالیت‌های 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 $p < 0.01$ 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

یافته‌ها نشان می‌دهند که رت‌های دیابتی سطوح پلاسمائی بالاتری از گلوکز داشته و سطح انسولین پلاسمائی آنها در قیاس با رت‌های گروه کنترل نرمال کاهش یافته است. اثرات پائین‌آوردگی گلوکز پلاسمائی 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

پائین‌آوردگی گلوکز پلاسمائی 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 بالائی را بین افزایش متوسط فعالیت و سطوح GK mRNA در رت‌های تحت تیمار با SKEO نشان می‌دهند (شکل 1-ج). از طرف

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 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 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 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 (16-17). 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 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. دراین زمینه، شماری از دیگر گیاهان که یک اثر آنتی‌هایپرگلاسیسمی 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 هایپرگلاسیسمی دیابتیک سبب ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال و بدنبال 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 برون ده 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 antinociceptive 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, 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 Fragan 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, Ribnický 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.