

## بررسی بیان ژن‌های فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین-۶ در دیابت نوع دو در مدل موش‌های صحرایی تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه گالگا (*Galega officinalis*)

الهه ساعی<sup>۱</sup>، فریبا محمودی<sup>۱\*</sup>، عزت نوری‌زاده<sup>۱</sup>، فرزانه محمودی<sup>۲</sup>

### چکیده

**مقدمه:** اثرات هیپوگلیسمی گالگا (*Galega officinalis*) و نانوذرات نقره ثابت شده است. در تحقیق حاضر، اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاهی آبی گالگا بر بیان ژن‌های *TNF-α*، *IL-6* و غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی در دیابت نوع دو بررسی شد. **روش‌ها:** در تحقیق حاضر، ۲۰ موش صحرایی نر در ۴ گروه ۵ تایی از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی کنترل یا دیابتی نوع دو القا می‌شود با نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین به ترتیب تزریق داخل صفاقی سالین یا ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه گالگا یا روش شیمیایی را دو هفته دریافت کردند. یک روز بعد از آخرین تزریق، نمونه‌های سرمی و بافت چربی جمع‌آوری شدند. غلظت سرمی گلوکز، اوره، کراتینین، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) با اسپکتروفتومتر تعیین شدند. میانگین بیان نسبی ژن‌های *TNF-α* و *IL-6* با ریل تایم-PCR تعیین شد.

**یافته‌ها:** میانگین غلظت سرمی آنزیم‌های ALT، AST، گلوکز و اوره در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش یافت. میانگین بیان نسبی ژن‌های *TNF-α* و *IL-6* در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده نانو ذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی‌داری کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** هر دو نانو ذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز ممکن است از آسیب هیپاتوسیت‌های کبدی جلوگیری کرده و با کاهش بیان فاکتورهای پیش التهابی در بهبود مقاومت به انسولین دیابت نوع دو مؤثر باشند.

**واژگان کلیدی:** گالگا، نانوذرات نقره، آنزیم‌های کبدی، *TNF-α* و *IL-6*

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- گروه شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

\* **نشانی:** اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، تلفن: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۸۷، صندوق پستی ۱۷۹، پست الکترونیک: f.mahmoudi@uma.ac.ir

## مقدمه

دیابت یک نوع اختلال متابولیکی پیچیده است، که ناشی از فقدان یا کمبود ترشح انسولین، نقص در عملکرد انسولین یا عدم حساسیت سلول‌ها به انسولین ایجاد می‌شود. در واقع در دیابت، در انتقال گلوکز به سلول اختلال ایجاد شده، سطح گلوکز خون افزایش یافته و هیپرگلیسمی ایجاد می‌شود که به نوبه‌ی خود باعث گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های بدن شده و منجر به عوارض ثانویه‌ای در چشم (رتینوپاتی)، کلیه‌ها (نفروپاتی)، اعصاب (نوروپاتی) و شریان‌های بدن می‌شود [۱]. دیابت نوع دو، اختلال هتروژنتیکی است که از تعامل عوامل ژنتیکی و محیطی و در اثر کمبود انسولین و مقاومت به انسولین ناشی می‌شود. کبد نقش مهمی در حفظ سطوح طبیعی گلوکز خون دارد. در واقع تخریب کبدی ناشی از مقاومت به انسولین ممکن است به توسعه‌ی دیابت نوع دو کمک شایانی کند. به این ترتیب دیابت نوع دو و اختلال در متابولیسم چربی کبدی می‌تواند منجر به مقاومت به انسولین شود، که باعث تشدید دیابت، افزایش رسوب چربی کبد و در نهایت منجر به آسیب کبدی و افزایش آنزیم‌های کبدی می‌شود [۱]. آنزیم‌های کبدی شامل آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) است که از نظر کلینیکی برای ارزیابی عملکرد صحیح هپاتوسیت‌های کبدی و دستگاه صفراوی استفاده می‌شوند [۲]. فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF $\alpha$ ) و اینترلوکین ۶ (IL6) از مهم‌ترین آدیپوکین‌های پیش‌التهابی هستند که بیان آنها در بافت چربی و همچنین سطوح خونی آنها در بیماری‌های متابولیکی مختلف از جمله چاقی، دیابت و مقاومت به انسولین و سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و غیره در انسان و جوندگان افزایش می‌یابد [۶، ۷]. تیمار سلول‌ها با TNF $\alpha$  منجر به ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود درحالی‌که کاهش سنتز یا ایجاد جهش در ژن آن ارتباط مستقیمی با ایجاد حساسیت به انسولین دارد [۷]. تزریق محیطی IL6 مسیر پیام‌رسانی انسولین را مختل کرده و افزایش آن ارتباط مستقیمی با چاقی و مقاومت به انسولین دارد [۸]. گالگا (*Galega officinalis*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در درمان

بیماری دیابت است. تحقیقات پیشین نشان داده است که مصرف عصاره‌ی گالگا، گلوکز خون را در حیوانات کاهش داده و دارای خاصیت ضد هیپرگلیسمی است [۶، ۷]. اثر هیپوگلیسمی گالگا، به گالگین و گوانیدین موجود در آن مربوط است [۷]. گالگین جذب گلوکز توسط آدیپوسیت را بالا می‌برد که به‌عمل هیپوگلیسمی آن کمک کند [۷]. همچنین، عصاره‌ی گالگا سبب تحریک ترشح انسولین شده [۸] و آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است و از آسیب کبدی ایجاد شده در دیابت جلوگیری می‌نماید و از واکنش‌ها و اکسیداسیون هپاتوسیت‌ها و تخریب سلول‌های بتا جلوگیری کرده و از دگرانوله شدن آنها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند [۹]. براساس یافته‌های متعدد پیشین خاصیت ضد هیپرگلیسمی گیاه گالگا به ترکیبات متعدد موجود در آن به‌ویژه ساپونین و گالگین مربوط است و داروی متفورمین، در واقع فرم مصنوعی گالگین است که در دیابت نوع دو مورد استفاده قرار می‌گیرد و سبب بهبود مقاومت به انسولین می‌شود [۱۰]. گالگا با توجه به ترکیب بیگوانید می‌تواند سبب محافظت از سلول‌های بتا در برابر استرس اکسیداتیو گردد [۱۰]. Azimi و همکاران طی تحقیقی در موش‌های صحرایی سالم نشان دادند که تزریق نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره‌ی گیاه گالگا دارای اثرات آسیب‌زا بر فاکتورهای همتولوژیکی نبوده و موجب کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع یک القایی با آلوکسان می‌شود [۱۱]. فناوری نانو، یک حوزه‌ی جذاب برای تحقیقات در زمینه‌ی تولید نانوذرات با اندازه‌های متنوع، شکل و ترکیبات شیمیایی کنترل شده است، این ویژگی‌ها مزایای احتمالی مفید در پزشکی بالینی به‌شمار می‌آیند. نانوذرات به‌دلیل اندازه‌ی بسیار کوچک، می‌توانند به‌طور مستقیم با نفوذ در غشای سلولی باعث دخالت در عملکرد سلول‌ها شوند [۱۲]. تولید نانوذرات به روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی انجام می‌شود. نانوذراتی که به روش شیمیایی سنتز می‌شوند به‌دلیل استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و سمی بودن و آسیب‌های محیط زیستی نگرانی‌های زیادی را به همراه دارد. به همین دلیل سنتز نانوذرات با روش‌های بیولوژیکی با استفاده از عصاره‌ی گیاهی به‌عنوان گزینه‌ی زیست محیطی سازگار به جای روش‌های فیزیکی و شیمیایی

مطرح شده است. نانوذرات نقره به دلیل داشتن توانایی ضد هیپرگلیسمی و مهار فاکتورهای التهابی به عنوان یک عامل ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ترمیم کننده معرفی شده است [۱۴]. در تحقیق حاضر اثرات نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گالگا (*Galega officinalis*) بر بیان ژن فاکتورهای التهابی نظیر فاکتور نکروز توموری آلفا ( $TNF-\alpha$ ) و اینترلوکین ۶ ( $IL-6$ )، غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی، گلوکز، اوره و کراتینین در دیابت نوع دو القا‌ی با نیکوتین آمید و استرپتوزوسین در مدل موش صحرائی بررسی می‌شود.

## روش‌ها

**واحدهای آزمایشی:** تحقیق حاضر از نوع تجربی بنیادی است. در این مطالعه از ۲۰ موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی ایران استفاده گردید. حیوانات تحت شرایط آزمایشگاهی با درجه‌ی حرارت  $22 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش‌ها با تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با شماره ی IR.ARUMS.REC.1399.355 انجام گرفت.

**سنتز نانوذرات نقره به روش شیمیایی یا سنتز سبز:** بر طبق پروتکل انجام شده در مطالعه‌ی Azimi و همکاران در سال ۲۰۱۹، سنتز نانوذرات نقره به روش شیمیایی یا با استفاده از عصاره‌ی گیاه گالگا انجام شد [۱۱]. ده گرم از ساقه و برگ‌های (اندام‌های هوایی) پودر شده‌ی گیاه گالگا در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و در دمای ۵۵-۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد. بعد از خنک شدن و صاف کردن با کاغذ صافی واتمن شماره‌ی یک، عصاره‌ی گیاه گالگا به دست آمد. از عصاره‌ی تازه تهیه شده برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد [۱۱].

برای سنتز نانوذرات نقره به روش سبز، ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه گالگا به یک ارلن مایر انتقال داده شد و دمای آن به ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رسید. سپس به محلول فوق، ۲۵ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره با غلظت  $1 \times 10^{-2}$  مولار قطره قطره اضافه

شد. با افزودن قطره قطره نیترات نقره، رنگ محلول به زرد، سپس قهوه‌ای کمرنگ و در پایان به قهوه‌ای پررنگ تغییر می‌کند که گواه تشکیل نانوذرات نقره است. pH محلول واکنش با افزودن قطره قطره‌ی محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار در حدود ۱۱ تنظیم شد و سپس محلول واکنش به مدت دو ساعت در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  هم زده شد. برای جدا کردن نانوذرات نقره از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. نانوذرات نقره جمع‌آوری شده در آن با دمای  $50^{\circ}\text{C}$  خشک شدند [۱۱]. در روش سنتز شیمیایی ۲۵ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده سدیم بور هیدرید با غلظت  $2 \times 10^{-2}$  مولار به یک بشر انتقال داده شد و در حمام یخ قرار داده شد. محلول به مدت ۲۵ دقیقه با ۸۰۰ دور در دقیقه هم زده شد و دمای آن در ۲-۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر نیترات نقره با غلظت  $2 \times 10^{-2}$  مولار و ۱۰ میلی‌لیتر سدیم سیترات با غلظت  $10 \times 10^{-2}$  مولار، قطره قطره به محلول سدیم بور هیدرید اضافه شدند. با افزودن این مواد، رنگ محلول از بی‌رنگ به زرد و سپس به قهوه‌ای تغییر می‌کند که گواه تشکیل نانوذرات نقره است. لازم به ذکر است که بلافاصله بعد از افزودن کل محلول‌های فوق، هم زدن محلول متوقف شد و بشر واکنش از حمام یخ خارج گردید. نانوذرات نقره سنتز شده با سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه از محلول جدا شدند و در آن با دمای  $50^{\circ}\text{C}$  خشک شدند [۱۱].

**القای مدل دیابت نوع دو:** برای القای دیابت، در حالت ناشتا ابتدا حیوانات  $110 \text{ mg/kg}$  نیکوتین آمید را به صورت تک دوز از طریق تزریق داخل صفاقی در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر دریافت کردند. در ۱۵ دقیقه بعد استرپتوزوسین (STZ) با مقدار ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در بافر سیترات با pH برابر با ۴/۵ حل شد و در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به طور داخل صفاقی به موش‌های صحرائی تزریق شد. برای جلوگیری از هیپوگلیسمی شدید و جلوگیری از مرگ حیوانات، محلول گلوکز ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوسین، در اختیار حیوانات قرار گرفت [۱۵]. در ۷۲ ساعت و روز هفتم بعد از تزریق نیکوتین آمید و استرپتوزوسین، در حالت ناشتا (۱۴-۱۲ ساعت گرسنگی شبانه) میزان گلوکز خون با استفاده از دستگاه قندسنج

از این آنزیم‌ها و ترکیبات تعیین گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی از روش فوتومتریک استفاده شد. برای اندازه‌گیری کراتینین آزمایش به روش کالری‌متری بدون حذف پروتئین‌ها، براساس روش JAFFE انجام شد [۱۱]. برای اندازه‌گیری اوره آزمایش به روش Urease - GLDH انجام شد. برای اندازه‌گیری گلوکز از گلوکومتر و همچنین توسط کیت گلوکز با روش فوتومتریک استفاده شد.

**بررسی میزان بیان ژنی با استفاده از روش ریل تایم-PCR:** نمونه‌های بافت چربی با استفاده از pureZol و با به‌کارگیری دستگاه بیدمیل هموژنایزر هوموژن شدند و RNA مطلق نمونه‌ها براساس روش گوانیدین تیوسیانات- فنل- کلروفرم بر طبق دستورالعمل کیت PureZol استخراج شد (Bio Rad, U.S.A.). غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ تعیین شد و یک میکروگرم از RNA برای سنتز cDNA براساس دستورالعمل کیت سنتز (cDNA) مورد استفاده قرار گرفت (Thermo scientific Co, U.S.A). پس از سنتز cDNA قطعات مورد نظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت سایبرگرین ریل تایم پی‌سی‌آر شرکت تاکارا (Takara Bio Inc., Japan) و با استفاده از دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر روتر ژن مدل ۶۰۰۰ (Rotor Gene 6000, Corbette, Korea) تکثیر شدند. برنامه‌ی زمانی برای واکنش پی‌سی‌آر کمی شامل یک چرخه‌ی (۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه) و ۴۰ چرخه (۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه) بود. پرایمرها از شرکت ژن فناوری ایران تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی سنس GAPDH، TNF- $\alpha$  و IL-6 به ترتیب برابر با GAPDH sense: 5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAG-3' and CATACTCAGCACCAGCA-GAPDH antisense: 5'-TCAC-3' [16]; TNF- $\alpha$  sense: 5'-ACTACGATGCTCAGAAACACACG-3' and TNF- $\alpha$  antisense: 5'-AGACATCTTCAGCAGCCTTGTG-3', IL-6 sense: 5'-GACTTCCAGCCAGTT GCCTTCTTG-3' and IL-6 antisense: 5'-TGGTCTGTTGTGGGTGG-3' TATCCTC است. تعیین سطح mRNA گلیسر آلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) توسط روش RT-PCR کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA TNF- $\alpha$  و IL-6 استفاده

تعیین شد. موش‌های صحرایی با گلوکز خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان موش‌های صحرایی دیابتی، برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

**گروه‌های تیمار:** گروه اول شامل پنج موش صحرایی سالم به عنوان کنترل سالم سالی‌ن را از طریق تزریق داخل صفاقی به مدت دو هفته دریافت کردند. گروه دوم شامل پنج موش صحرایی دیابتی سالی‌ن را از طریق تزریق داخل صفاقی به مدت دو هفته دریافت کردند. گروه سوم شامل پنج موش صحرایی دیابتی ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات نقره‌ی سنتز شده به روش شیمیایی را از طریق تزریق داخل صفاقی به مدت دو هفته دریافت کردند و گروه چهارم شامل پنج موش صحرایی دیابتی ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با عصاره‌ی گیاه گالگا را از طریق تزریق داخل صفاقی به مدت دو هفته دریافت کردند. داروها در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر از طریق تزریق داخل صفاقی در بازه زمانی ۹-۹/۳۰ صبح به مدت دو هفته تزریق شدند [۱۱].

**جداسازی نمونه‌های سرمی و بافت چربی احشایی:** در یک روز بعد از آخرین تزریق داروها، حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ماده بیهوشی کتامین و زایلازین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن + ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) با استفاده از سرنگ انسولین بیهوش شدند. نمونه‌های خونی در میکروتیوپ‌ها برای تهیه سرم جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های خونی با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه جداسازی گردید. بعد از بیهوشی عمیق با ایجاد برش و کنار زدن پوست و لایه‌های عضلانی شکم، بافت چربی سفید احشایی بلافاصله جدا شد. نمونه‌ها داخل کرایوتیوپ منتقل شده و برای منجمد کردن سریع نمونه‌های بافتی نیتروژن مایع استفاده شد. نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

**سنجش نمونه‌های سرمی:** در همان روز تهیه سرم، میانگین غلظت سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، گلوکز، کراتینین و اوره با استفاده از کیت‌های تشخیص طبی شرکت پارس آزمون ایران، ویژه‌ی هر یک

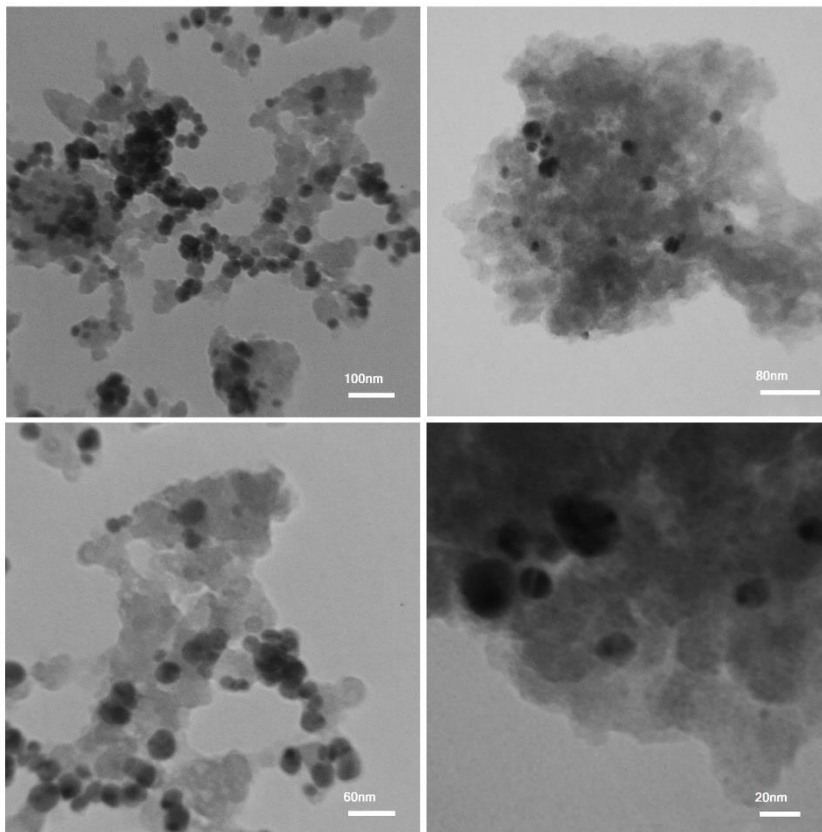
الکترونی عبوری (TEM) تهیه شدند و در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد، نقاط تیره رنگ مربوط به نانوذرات نقره بوده که توزیع خوبی دارند، در اطراف ذرات تیره رنگ، زمینه کم‌رنگ و روشنی مشاهده می‌ردد که به حلال یا عصاره گیاه استفاده شده برای سنتز مربوط می‌شود. به علت اینکه چگالی ذرات حلال در مقابل عبور نور از چگالی نانوذرات نقره کمتر است، به همین علت نانوذرات نقره تیره‌تر از ذرات حلال مشاهده می‌گردند. تصاویر TEM، ذرات کروی شکل با اندازه ۲۵ نانومتر را برای نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با روش سبز مشخص می‌کنند. ذرات توزیع همگنی داشته و اندازه‌ی آنها ۲۵ نانومتر است. تصاویر TEM نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با روش شیمیایی در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد این نانوذرات نقره نیز کروی شکل بوده و توزیع همگنی از ذرات را مشخص می‌کنند. میانگین اندازه ذرات ۷۵ نانومتر است.

شده. محصولات حاصل از تکثیر ژن‌های *GAPDH*، *TNF-α* و *IL-6* به ترتیب ۱۰۸، ۱۱۲ جفت باز و ۱۲۲ جفت باز هستند. داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های *TNF-α* و *IL-6* نسبت به *GAPDH* با فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شدند.

**طرح‌های آماری و آنالیز داده‌ها:** داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS با آزمون واریانس آنوای یک‌طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون تعقیبی توکی بررسی شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین ( $\pm$  SEM) ارائه شدند. در تمام آنالیزهای آماری نتایج با  $P \leq 0/05$  معنی‌دار گزارش شدند.

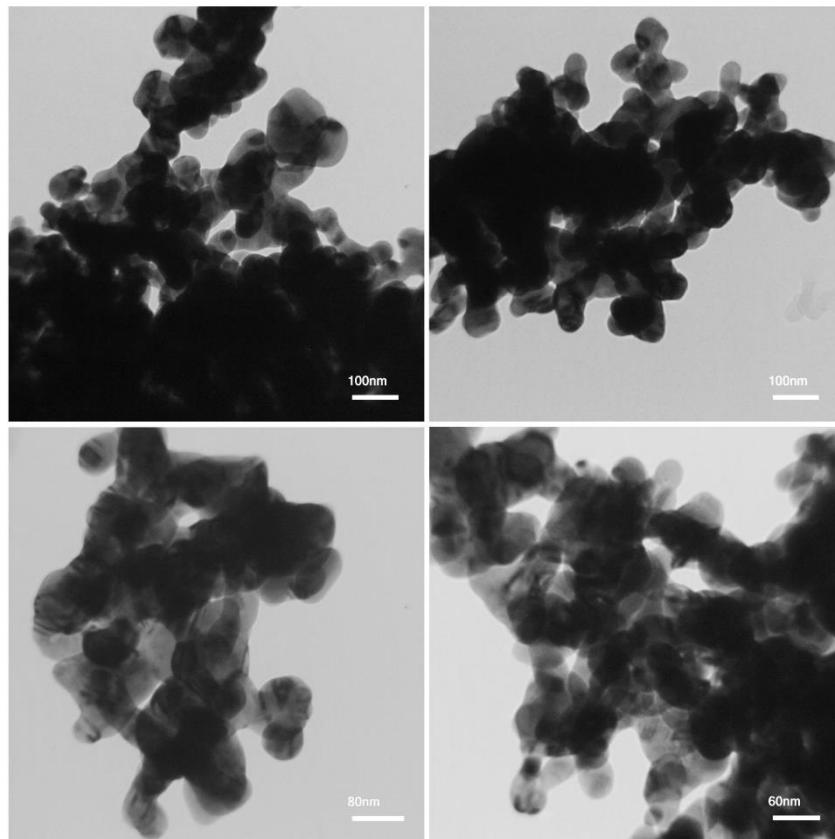
## یافته‌ها

بررسی اندازه‌ی ذرات نمونه‌های سنتز شده با استفاده از تصاویر TEM؛ تصاویر مربوط به اندازه‌ی دقیق نانوذرات نقره سنتز شده با روش‌های سبز و شیمیایی، به وسیله میکروسکوپ



شکل ۱- تصاویر TEM نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی گیاه گالگا

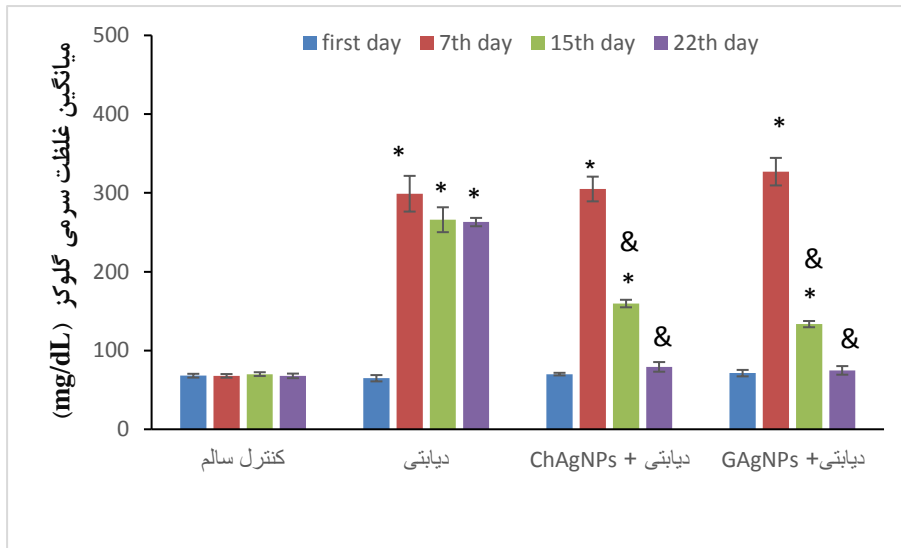
لکه‌های تیره نانوذرات نقره‌ی سنتز شده را نشان می‌دهند



شکل ۲- تصاویر TEM نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با روش شیمیایی

شیمیایی یا با استفاده از عصاره‌ی گالگا در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری کاهش معنی‌داری پیدا کرد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱). همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین غلظت سرمی گلوکز در روز ۲۲ آزمایش (۱۵ روز بعد از تزریق نانوذرات) نشان داد که در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم از نظر آماری افزایش معنی‌داری در میانگین غلظت سرمی گلوکز وجود دارد. ولی در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده هر دو نانوذرات نقره سنتز شده در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری کاهش معنی‌داری ایجاد شد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱). میانگین غلظت سرمی گلوکز در گروه دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گالگا در مقایسه با گروه دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی از نظر آماری تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱).

در روز اول آزمایش، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در میانگین غلظت سرمی گلوکز خون ناشتا در بین ۲۰ سر موش صحرایی (۴ گروه ۵ تایی) مشاهده نشد (نمودار ۱). بعد از تأیید کامل دیابت القایی با استرپتوزوتوسین در روز هفتم، میانگین غلظت سرمی گلوکز در روز هفتم آزمایش در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم از نظر آماری به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱). روز ۷ آزمایش، تزریق سالی‌ن یا نانوذرات نقره‌ی سنتز شده آغاز شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین غلظت سرمی گلوکز در روز ۱۵ آزمایش، (هفت روز بعد از تزریق نانوذرات) نشان داد که در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم، غلظت سرمی گلوکز از نظر آماری افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱). درحالی‌که میانگین غلظت سرمی گلوکز در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده هر دو نانوذرات نقره‌ی سنتز شده به روش

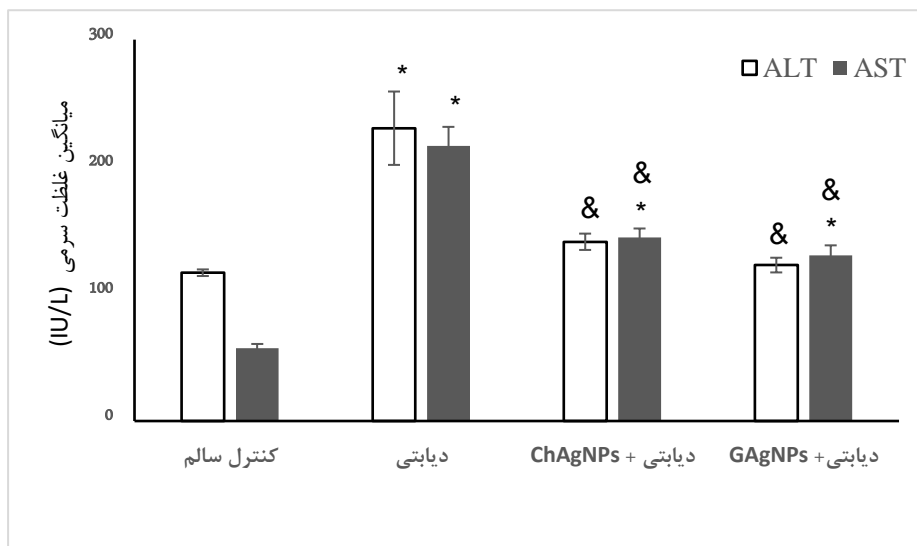


نمودار ۱- میانگین غلظت سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی (ChAgNPs) یا نانوذرات نقره تهیه شده با عصاره‌ی گیاه کالگا (GAgNPs)

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده‌اند و  $P \leq 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار گزارش شده است. \*: در مقایسه با گروه کنترل سالم، &: در مقایسه با گروه دیابتی

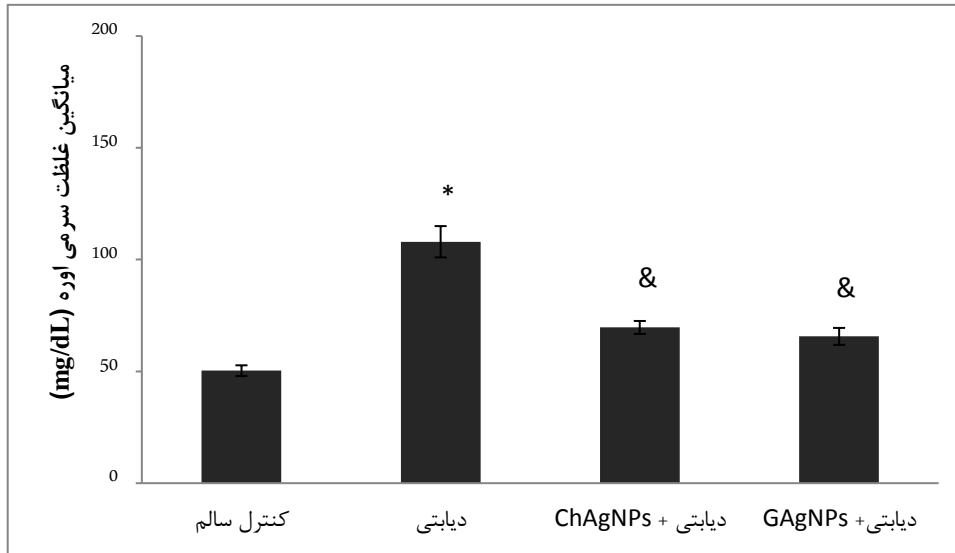
(نمودارهای ۲ و ۳). همچنین نتایج نشان داد که میانگین غلظت سرمی ALT، AST و اوره در گروه دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گیاه کالگا در مقایسه با گروه دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی از نظر آماری تغییر معنی‌داری پیدا نکرد (نمودارهای ۲ و ۳).

میانگین غلظت سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و اوره در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری پیدا کرد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودارهای ۲ و ۳). میانگین غلظت سرمی ALT، AST و اوره در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با عصاره‌ی گیاه کالگا یا تهیه شده به روش شیمیایی در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی‌داری یافت ( $P \leq 0/05$ )



نمودار ۲- میانگین غلظت سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت‌کننده‌ی نانوذرات نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی (ChAgNPs) یا نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گیاه کالگا (GAgNPs)

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده‌اند و  $P \leq 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار گزارش شده است. \*: در مقایسه با گروه کنترل سالم، &: در مقایسه با گروه دیابتی

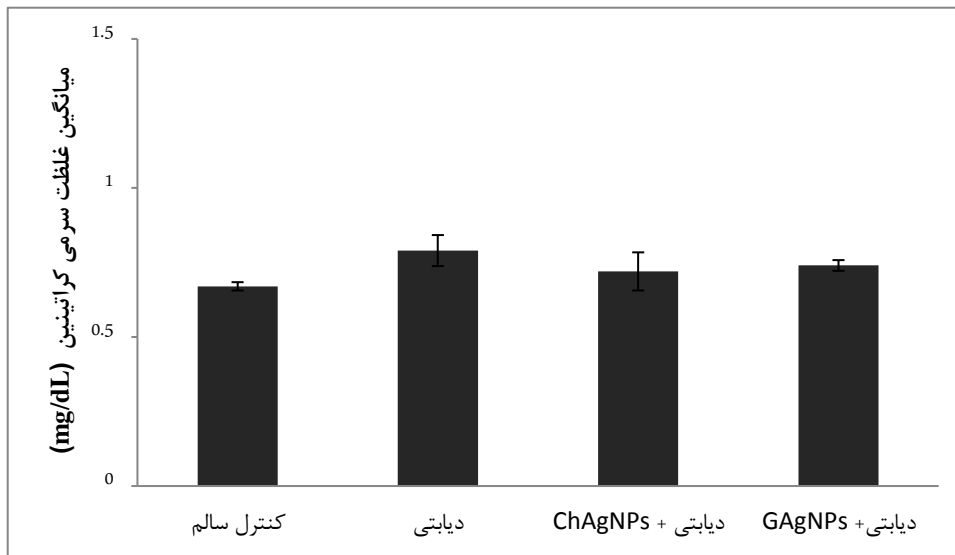


نمودار ۳- میانگین غلظت سرمی اوره در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت کننده نانوذره نقره تهیه شده به روش شیمیایی (ChAgNPs) یا نانوذره نقره تهیه شده با عصاره گیاه گالگا (GAgNPs)

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده‌اند و  $P \leq 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار گزارش شده است. \*: در مقایسه با گروه کنترل سالم، &: در مقایسه با گروه دیابتی

شیمیایی یا با استفاده از عصاره گیاه گالگا در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۴).

میانگین غلظت سرمی کراتینین در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم و در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت کننده هر دو نانوذرات نقره‌ی سنتز شده به روش



نمودار ۴- میانگین غلظت سرمی کراتینین در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت کننده نانوذرات نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی (ChAgNPs) یا نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره گیاه گالگا (GAgNPs)

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده است.

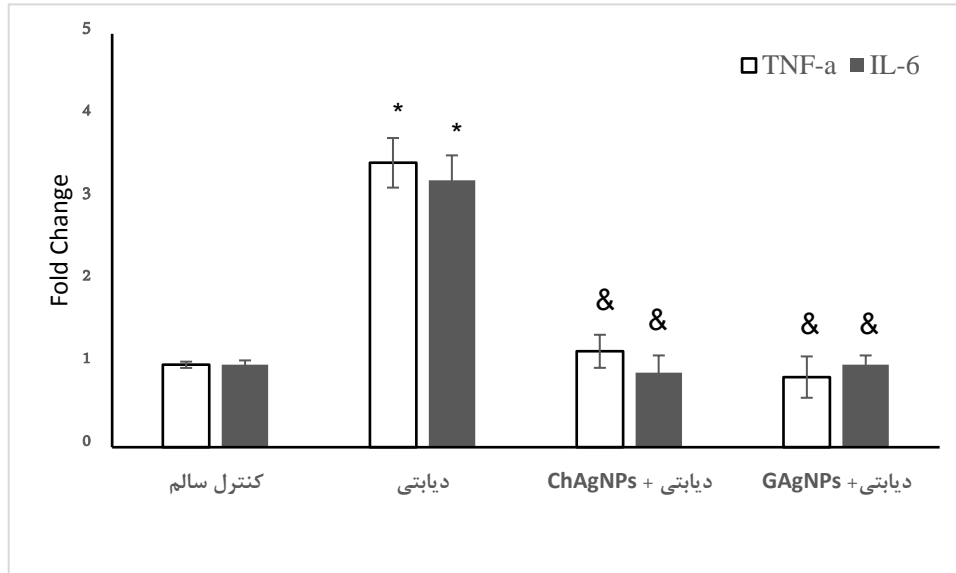
داری پیدا کرد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۵). میانگین بیان نسبی ژنهای  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$  در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت کننده

میانگین بیان نسبی ژنهای  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$  در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی



نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گالگا در مقایسه با گروه دیابتی دریافت کننده نانوذرات نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی از نظر آماری تغییر معنی داری نشان نداد (نمودار ۵).

نانوذرات نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گیاه گالگا یا نانوذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی داری پیدا کرد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۵). میانگین بیان نسبی ژن‌های  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  در گروه دیابتی دریافت کننده نانوذرات



نمودار ۵- مقایسه‌ی بیان نسبی ژن‌های  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  در موش‌های صحرایی دیابتی دریافت کننده نانوذره‌ی نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی (ChAgNPs) یا نانوذره‌ی نقره‌ی تهیه شده با عصاره‌ی گیاه گالگا (GAgNPs) نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده‌اند و  $P \leq 0/05$  از نظر آماری معنی دار گزارش شده است. \*: در مقایسه با گروه کنترل سالم، &: در مقایسه با گروه دیابتی.

نانوذرات نقره‌ی سنتز شده ممکن است تا حدودی از طریق مهار آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در کاهش گلوکز خون موش‌های صحرایی دیابتی میانجیگری شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین غلظت سرمی اوره و آنزیم‌های کبدی در دیابت نوع دو القا‌ی با نیکوتین آمید و استرپتوزوسین در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم افزایش پیدا کرد. درحالی‌که که تزریق دوز ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی یا روش سنتز سبز سبب کاهش معنی دار سطوح آنزیم‌های کبدی و اوره در مقایسه با گروه دیابتی شد. در مورد اثرات نانوذرات نقره ی تهیه شده به روش شیمیایی بر فعالیت کبد و کلیه براساس دوز استفاده شده نتایج متفاوتی وجود دارد. تعدادی از تحقیقات پیشین اثرات مؤثر دوزهای پایین تر نانوذرات نقره بر بهبود عملکرد کبد و کلیه را در مدل‌های حیوانی دیابتی نشان دادند [۱۹]. و برخی از مقالات اثرات مضر دوزهای بالاتر آنها بر آسیب

## بحث

نتایج تحقیق حاضر، اثرات هیپوگلیسمیک نانوذرات نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی یا سنتز شده با عصاره‌ی گیاه گالگا را در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه دیابتی نشان داد. دوز نانوذرات استفاده شده برای تحقیق حاضر براساس تحقیقات پیشین انتخاب شد که توانایی کاهش سطوح گلوکز خون در موش‌های صحرایی دیابتی را به دنبال تزریق به مدت دو هفته نشان دادند [۱۴، ۱۳]. سازوکارهای متعددی احتمال دارد در ایجاد اثرات هیپوگلیسمیک نانوذرات نقره دخالت داشته باشند. گیاه گالگا غنی از ترکیبات پلی فنلی است. گالگا و نانوذرات نقره ی هر دو دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی بوده، سبب تحریک ترشح انسولین شده و توانایی مهار آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی کربوهیدرات‌ها از جمله آلفا آمیلاز بزاقی و پانکراسی، آنزیم‌های متصل به غشای اپیتلیوم روده باریک مثل آلفا گلوکوزیداز و دی ساکاریدازها را دارا هستند [۱۸، ۱۷، ۷]. بنابراین اثرات مهار

با توجه به این که ثابت شده است که هیپرگلیسمی، استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین همواره با افزایش تولید فاکتورهای التهابی همراه است و در تحقیقات زیستی، برای جلوگیری از ایجاد مقاومت به انسولین و کنترل توسعه‌ی دیابت نوع دو، یکی از راهبردهای درمانی مهم یافتن داروهای مؤثر بر کاهش تولید TNF- $\alpha$  و IL-6 و سایر ماکرهای پیش‌التهابی است. در بخش دیگر تحقیق حاضر اثرات نانوذرات شیمیایی یا سنتز شده با عصاره‌ی گیاه گالگا بر بیان نسبی ژنهای فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین ۶ (IL-6) بررسی شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان نسبی ژن فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) در دیابت نوع دو القایی با نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین افزایش یافت. نتایج حاضر منطبق بر تحقیقات پیشین است که افزایش و نقش این فاکتورهای پیش‌التهابی را در پاتوژنز دیابت نشان داده است. در واقع TNF- $\alpha$  یکی از میانجیگرهای مهم در ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و ایجاد مقاومت به انسولین است [۲۷، ۲۶، ۴]. فاکتور TNF- $\alpha$  ممکن است از طریق سازوکارهای متعددی از جمله تحریک لیپولیز و افزایش اسیدهای چرب آزاد، مهار اتوفسفیریلایون گیرنده‌ی انسولین، کاهش ترشح فاکتورهای ضدالتهابی نظیر آدیپونکتین، کاهش سنتز ترانسپورتر نوع ۴ گلوکز (GIUT4) در ایجاد مقاومت به انسولین نقش داشته باشد. نشان داده شده است که TNF- $\alpha$  حساسیت سلول‌ها به انسولین را از طریق تحریک پروتئین کینازهای فعال شونده توسط استرس موسوم به مسیر (JNK1) c-Jun N-terminal kinase 1 مختل کند. در واقع مسیر JNK1 یک مسیر آپوپتوز است که در پاسخ به استرس‌های مختلف مانند استرس اکسیداتیو، عدم تعادل در تولید فاکتورهای پیش‌التهابی و ضدالتهابی بافت چربی، آسیب DNA و سایر استرس‌های سلولی فعال می‌شود. مسیر JNK1 فعال شونده توسط استرس به نوبه‌ی خود مقاومت به انسولین را از طریق فسفریلایون مهاري سوبسترای گیرنده‌ی انسولین میانجیگری کرده و سلول به‌دنبال فعالیت بیش از اندازه مسیر JNK1 دچار آپاپتوز می‌شود [۲۷، ۲۶، ۴].

همچنین TNF- $\alpha$  می‌تواند مقاومت به انسولین را با تحریک مسیر پیام‌رسانی فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده‌ی زنجیره‌ی سبک کاپای

کبدی را گزارش کرده‌اند [۲۰]. نتایج تحقیقات حاضر نشان داد نتایج حاصل منطبق بر یافته‌های پیشین است که نشان دادند مقادیر پایین‌تر نانوذرات نقره‌ی تهیه شده به روش شیمیایی منجر به آسیب عملکرد کلیه و کبد نمی‌شود [۲۲، ۲۱]. و تزریق نانوذرات نقره یا طلای سنتز شده به روش شیمیایی یا سنتز سبز با عصاره‌ی گیاهان دارویی دیگر نظیر بوقناق یا بادرنجبویه در موش‌های دیابتی، موجب کاهش غلظت سرمی گلوکز خون و بهبود آنزیم‌های کبدی می‌شود [۲۴، ۲۳، ۱۴]. یکی از سازوکارهای احتمالی در اثرات حفاظتی نانوذرات نقره بر عملکرد کبد و کلیه ممکن است به‌ویژگی آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مرتبط باشد. مطالعات پیشین نشان داده است که تولید گونه‌ی اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) از عوارض دیابت است که توانایی انسولین در جذب گلوکز و استفاده از گلوکز را مختل می‌سازد و در نتیجه به‌علت افزایش گلوکز، سلول‌های کبدی دچار نقص می‌گردد. همچنین در اثر اختلال در عملکرد طبیعی کلیه، ممکن است در دیابت میزان اوره و کراتینین به‌علت اختلال در فیلتراسیون در خون افزایش یابد. استرس اکسیداتیو که در نتیجه‌ی عدم تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و سیستم آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد، یکی از دلایل مهم بیماری دیابت بوده و استرس اکسیداتیو در ایجاد مقاومت به انسولین و پیشرفت دیابت و عوارض آن نقش دارد. بنابراین، مهار استرس اکسیداتیو در پیشگیری و مدیریت مقاومت به انسولین و جلوگیری از آسیب کبدی در دیابت مهم است [۲۵، ۹]. نتایج به دست آمده از تحقیقات پیشین نقش مؤثر نانوذرات نقره به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی را با مهار تشکیل ROS و افزایش تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند. آنها تأیید‌کننده‌ی این واقعیت هستند که استفاده از دوزهای پایین‌تر نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با روش شیمیایی به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی منجر به حفاظت هپاتوسیت‌ها در برابر آسیب کبدی می‌شوند. در واقع آنها استفاده از مقادیر پایین‌تر این ترکیبات را به‌عنوان راه درمانی امیدوارکننده برای بهبود عوارض بیماری‌هایی نظیر دیابت مطرح می‌کنند که با افزایش آسیب کبدی و استرس اکسیداتیو همراه است [۲۵، ۱۴].

لنفوسیت‌های B فعال شده ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) القا کند.  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  فاکتور نسخه‌برداری است که در فرآیندهای سلولی نظیر پاسخ به التهاب و استرس اکسیداتیو از طریق تنظیم بیان ژن فاکتورهای مختلف دخالت می‌کند. وقتی که پاسخ استرسی وجود نداشته باشد یک مهارکننده به نام I $\kappa$ B فاکتور  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  را در سیتوپلاسم غیرفعال نگه می‌دارد. در پاسخ به افزایش تولید  $\text{TNF-}\alpha$ ، آنزیم  $\beta$ -کیناز I $\kappa$ B، مهارکننده‌ی I $\kappa$ B را فسفریله کرده و منجر به پروتئولیز آن می‌شود. بنابراین جایگاه تشخیص هسته‌ای  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  در معرض قرار گرفته و  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  به هسته منتقل شده و منجر به بیان ژن فاکتورهای مختلف از جمله مارکرهای التهابی از جمله  $\text{TNF-}\alpha$  می‌شود.  $\text{TNF-}\alpha$  تولید شده به نوبه‌ی خود مقاومت به انسولین و اختلالات قلبی-عروقی مرتبط با دیابت را از طریق فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی IKK $\beta$ / $\text{NF-}\kappa\text{B}$  و تشدید استرس اکسیداتیو القا می‌کند [۲۷، ۲۶، ۴].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان نسبی ژن اینترلوکین ۶ ( $\text{IL-6}$ ) در دیابت نوع دو القایی با نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین افزایش یافت. نتایج حاضر منطبق بر نقش مهم  $\text{IL-6}$  در پاتوژنز دیابت است [۲۸، ۴]. افزایش سطوح  $\text{IL-6}$  تولید بیش از اندازه‌ی سرکوبگر پیام‌رسانی سیتوکین ۳ (SOCS3) را تحریک می‌کند که آن هم به نوبه‌ی خود مسیر پیام‌رسانی انسولین در کبد و بافت چربی را مختل کرده و به ایجاد مقاومت به انسولین کمک می‌کند. البته قابل ذکر است بسته به بافت هدف (کبد، بافت چربی و عضله) افزایش حاد یا مزمن  $\text{IL-6}$  اثرات متفاوتی ممکن است بر متابولیسم گلوکز اعمال کند. در حقیقت افزایش مزمن  $\text{IL-6}$  با تحریک فسفوریلاسیون مهاره‌ی زیرواحدهای سرین در سوسترای یک گیرنده انسولین در کبد موجب القای مقاومت به انسولین می‌گردد. درحالی‌که افزایش مزمن آن در عضلات، جذب گلوکز توسط انسولین به داخل سلول‌ها را مختل می‌کند

[۲۸، ۴]. در مطالعات متعدد نشان داده شده است که هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو با افزایش تولید فاکتورهای التهابی همراه است و بلوکه کردن مسیرهای پیام‌رسانی  $\text{TNF-}\alpha$  و  $\text{IL-6}$  منجر به حساسیت به انسولین می‌شود. مطالعات پیشین در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی، نشان داده است که مقادیر پایین‌تر نانوذرات نقره اثرات ضدالتهابی داشته و سبب مهار تولید سیتوکین‌های التهابی مختلف نظیر  $\text{TNF-}\alpha$ ،  $\text{IL-6}$ ، اینترلوکین ۱۲ ( $\text{IL-12}$ )، اینترلوکین ۱ ( $\text{IL-1}$ ) و اینترفرون گاما ( $\text{IFN}\gamma$ ) می‌شوند [۳۰، ۲۹]. بنابراین، اثرات هیپوگلیسمیک نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره‌ی گیاه گالگا ممکن است یک سازوکار احتمالی برای کاهش بیان ژن‌های  $\text{TNF-}\alpha$  و  $\text{IL-6}$  در بافت چربی موش‌های صحرایی دیابتی باشد. در واقع، هر دو نانوذره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز ممکن است به دلیل اثرات کاهشی مؤثر در کاهش گلوکز خون، کاهش بیان ژن فاکتورهای پیش‌التهابی و جلوگیری از آسیب هپاتوسیت‌های کبدی در بهبود مقاومت به انسولین دیابت نوع دو نقش مؤثر داشته باشند. با توجه به نتایج حاصل سنتز سبز نانوذرات نقره با عصاره‌ی گالگا که اقتصادی‌تر و سازگارتر با محیط زیست است می‌تواند جایگزین روش سنتز نانوذرات نقره به روش شیمیایی در انتخاب گزینه‌های مناسب داروهای ضد دیابتی باشد که یک رویکرد سریع، اقتصادی، سازگار با محیط زیست باشد و نانوذره نقره سنتز شده می‌تواند یک گزینه مناسب داروی ضد دیابت در نظر گرفته شود.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل از پایان‌نامه در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد.

## مآخذ

- Manukumar HM, Kumar JS, Chandrasekhar B, Raghava S, Umesha S. Evidences for diabetes and insulin mimetic activity of medicinal plants: Present status and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017; 57: 2712-2729.
- Ahn HR, Shin MH, Nam HS, Park KS, Lee YH, Jeong SK, Choi JS, Kweon SS. The association between liver enzymes and risk of type 2 diabetes: the namwon study. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2014; 6: 14.
- Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010: 802078.
- Know H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology* 2013; 4:71.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:13740-13746.
- Nagalievska M, Sabadashka M, Hachkova H, Sybirna N. Galega officinalis extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes. *BMC Complementary Alternative Medicine* 2018; 18: 4.
- Funke I, Matthias M. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. *Revista Brasileira de farmacognosia* 2006; 16: 1-5.
- Luka CD, Adoga GI, Istifanus G. Phytochemical studies of different factions of Galega officinalis extract and their effects on some biochemical parameters in alloxan-induced diabetic rats. *European Journal of Medicinal Plants* 2017; 19: 1-10.
- Abtahi-Eivari SH, Shokoohi M, Abbasi A, Rajabzade A, Shoorei H, Kalarestaghi H. Protective Effect of Galega officinalis extract on streptozotocin-induced kidney damage and biochemical factor in diabetic rats. *Journal of Medicinal and Biological Science* 2017; 4: 108-111.
- Beysel S, Unsal IO, Kizilgul M, Caliskan M, Ucan B, Cakal, E.. The effects of metformin in type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocrine Disorders* 2018; 18: 1.
- Azimi F, Mahmoudi F, Mahmoudi F, Amini MM. Synthesis of silver nanoparticles by *Galega officinalis* and its hypoglycemic effects in type 1 diabetic rats. *Nanomedicine Journal* 2021; 8: 255-263.
- Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Bergamaschi A. The Effects of nanomaterials as endocrine disruptors. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 16732-16801.
- Alkaladi A, Abdelazim AM, Afifi M. Antidiabetic activity of zinc oxide and silver nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Science* 2014; 15:2015-2023.
- Virgin-Ortiz A, Limon- Miranda S, Soto-Covarrubias MA, Apolina- Iribe A, Rodriguez- Leon E, Iniguez- Palomares R. Biocompatible silver nanoparticles synthesized using *Rumex hymenosepalus* extract decreases fasting glucose levels in diabetic rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2015; 10: 927-933.
- Wen W, Lin Y, Ti Z. Antidiabetic, antihyperlipidemic, antioxidant, anti-inflammatory Activities of ethanoic seed extract of *Annona reticulata* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 23: 710: 716.
- Haghighat KH, Mahmoudi F, Bayrami A, Zahri S. Influences of L-DOPA and blocking dopamine receptors on aromatase gene expression and serum concentration of LH in polycystic ovary syndrome model rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2020; 1: 2448-2455.
- Rasouli H, Hosseini-Ghazvini SM, Adibi H, Khodarahmi R. Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & Function* 2017; 8:1942-154.
- Saratale RG, Shin HS, Kumar G, Benelli G, Kim DS, Saratale GD. Exploiting antidiabetic activity of silver nanoparticles synthesized using *Punica granatum* leaves and anticancer potential against human liver cancer cells (HepG2). *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 2018; 46: 211-222.
- Yang L, Kuang H, Zhang W, Aguilar ZP, Wei H, Xu H. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Scientific Reports* 2017; 7: 3303.
- De Jong WH, Van Der Ven LTM, Sleijffers A, Park MVDZ, Jansen EHJM, Van Loveren H, Vandebriel R. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials* 2013; 34: 8333-8343.
- Maneewattanapinyo P, Banlunara W, Thammacharoen C, Ekgasit S, Kaewamatawong T. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2011; 73:1417-1423.
- Heidary Shayesteh T, Khajavi F, Ghasemi H, Hossini Zijoud SM, Ranjbar A. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress, liver function in rat: hepatotoxic or hepatoprotective? *Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 2014; 2: 40-44.
- Agarwal H, Kumar SV, Rajeshkumar S. Antidiabetic effect of silver nanoparticles synthesized using lemongrass (*Cymbopogon Citratus*) through

- conventional heating and microwave irradiation approach. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2020; 9: 371-376.
24. Mahmoudi F, Mahmoudi F, Haghghat Gollo Kh, Amini MM. Biosynthesis of novel silver nanoparticles using *Eryngium thyrsoideum* Boiss extract and comparison of their antidiabetic activity with chemical synthesized silver nanoparticles in diabetic rats. *Biological Trace Element Research* 2021; 199: 1967-1978.
25. Alkaladi A, Abdelazim AM, Afifi M. Antidiabetic activity of zinc oxide and silver nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal Of Molecular Science* 2014; 15: 2015–2023.
26. Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H. Blockade of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation* 2012; 125:1122-1111
27. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017; 2:17023.
28. Lima LCF, de Andrade Braga V, de Franca Silva MDS, de Campos Cruz J, Santos SHS, De Oliveira MM, et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in Physiology* 2015; 6: 304.
29. Wang KK, Cheung SOF, Huang L, Niu J, Tao C, Ho CM, Chi CM, Tam PKH. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem* 2009; 4: 1129-1135.
30. Zhang Z, Lui VC, Chen Y, Lok CN, Wong KK. Delayed application of silver nanoparticles reveals the role of early inflammation in burn wound healing. *Scientific Reports* 2020; 10: 6338.

## Evaluation of the Gene Expression of Tumor Necrotic Factor Alpha and Interlukine-6 in Rat Model of Diabetes Type 2 Treated with Silver Nanoparticles Synthetized by Galega Officinalis Extract

Elaheh Saei<sup>1</sup>, Fariba Mahmoudi\*<sup>1</sup>, Ezzat Noorizadeh<sup>1</sup>, Farzaneh Mahmoudi<sup>2</sup>

1. Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Department of Chemistry, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### ABSTRACT

**Background:** Hypoglycaemic effects of *Galega officinalis* and silver nanoparticles are established. In the present study, the effects of silver nanoparticles synthetized by *Galega officinalis* extract were investigated on gene expression of *TNF- $\alpha$* , *IL-6* and serum levels of liver enzymes in diabetes type 2.

**Methods:** In the present study 20 male Wistar rats in 4 group (n= 5 in each group) weighing 180- 200 gr were used. Control or nikotinamid and stroptozotosin induced diabetic rats received intraperitoneal injection of saline or 2/5mg/Kg silver nanoparticles synthetized by *Galega officinalis* extract or chemical method for 14 days respectively. One day after the last injections, serum samples and adipose tissue were collected. Mean serum concentration of glucose, urea, creatinine, alanine amino transferase (ALT), and aspartate amino transferase (AST) were determined by spectrophotometry. Mean relative gene expression of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* were determined by method of real time PCR.

**Results:** Mean serum levels of ALT and AST enzymes, glucose, urea significantly decreased in diabetic rats receiving chemical or green silver nanoparticles compared to diabetic group. Mean relative gene expression of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* significantly decreased in diabetic rats receiving chemical or green silver nanoparticles compared to diabetic ones.

**Conclusion:** Both chemical and green synthetized silver nanoparticles may prevent hepatocytes damages and they may improve insulin resistance in diabetes type 2 partly via decreasing pro-inflammatory factors.

**Keywords:** *Galega officinalis*, silver nanoparticle, liver enzymes, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*

\* Daneshgah Street, University of Mohaghegh Ardabili, Faculty of Sciences, Ardabil, Iran. Tel: +984531505187, P.O. Box: 179, E-mail: f.mahmoudi@uma.ac.ir

