



Research Article

The Study of the Effect of Biochanin A on Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interferon Gamma and Malondialdehyde and Glutathione Levels in Pancreatic Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Fatemeh Taheri ¹ , Zahra Salemi ^{2*} 

¹ Master of Clinical Biochemistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Faculty of Clinical Biochemistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

* **Corresponding author:** Fatemeh Taheri, Master of Clinical Biochemistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. E-mail: zsalemi@arakmu.ac.ir

DOI: [10.61186/cmja-13021](https://doi.org/10.61186/cmja-13021)

How to Cite this Article:

Taheri F, Salemi Z. The Study of the Effect of Biochanin A on Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interferon Gamma and Malondialdehyde and Glutathione Levels in Pancreatic Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Complement Med J.* 2023;**13**(2):1-13. DOI: [10.61186/cmja-13021](https://doi.org/10.61186/cmja-13021)

Received: 21 May 2023

Accepted: 20 Jun 2023

Keywords:

T1DM

Biochanin A

TNF-a

IFN-y

Oxidative Stress

© 2022 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: BiochaninA (BCA) is of interest due to its antioxidant and anti-inflammatory effects. Oxidative stress and inflammation are key pathways in the development and progression of T1DM. The aim of this study is to determine the effect of biochaninA on the serum levels of TNF-a, IFN-y, as well as the levels of GSH and MDA in the pancreas of rats infected with T1DM with streptozotocin.

Methods: 28 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 7 each. A healthy control group received DMSO, the solvent of biochaninA. The rest of them were subjected to peritoneal-injection of streptozotocin at the rate of 55mg/kg. One group was selected as a diabetic control (the second group) that only received DMSO, and the other two groups were treated with biochaninA at the rate of 10mg/Kg (the third group) and 15mg/Kg (the fourth group) for 6 weeks. At the end, blood was collected from the heart and the parameters of TNF-a, IFN-y and FBS were measured in the serum. Then GSH and MDA factors were measured in the homogenized pancreatic tissue.

Results: The reduction of blood glucose and MDA was significant in treatment groups. GSH increased significantly with treatment. The reduction of TNF-a was significant only in the fourth group, but the reduction of IFN-y wasn't significant in any treatment group ($P < 0.05$).

Conclusions: BiochaninA treatment is effective in controlling hyperglycemia. By increasing the level of GSH and decreasing MDA, this combination is important in improving the redox conditions in the pancreas, and by reducing the serum level of TNF-a, it improves the inflammatory conditions caused by diabetes and helps to reduce complications. No significant difference was observed between treatment doses.

INTRODUCTION

Diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia caused by defects in insulin secretion, insulin action, or both. Chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage and dysfunction of various organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels. The prevalence of diabetes in 2010 among adults was 285 million and it is expected to reach 438

million in 2030. Type 1 diabetes as the main subtype of diabetes accounts for about 5% of all diabetes cases. Flavonoids are a group of plant phenolic metabolites that are widely found in nature, biochanin A belongs to the flavonoid group and is a natural food isoflavone that is present in several herbal food supplements and is of interest due to its antioxidant and anti-inflammatory effects. Oxidative stress and inflammation are directly related to diabetes and

these two important issues should not be neglected in the studies conducted on diabetes. For this reason, we tried to investigate the inflammatory cytokines interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in the serum and oxidative stress markers including reduced glutathione and malondialdehyde in the pancreatic tissue in rats that were diagnosed with type 1 diabetes with streptozotocin, rats that were treated with a type of bioflavonoid called biocanina A after developing diabetes.

METHODS

About 28 male Wistar rats weighing between 200-250 grams were subjected to temperature controlled conditions ($22 \pm 4^\circ\text{C}$) with free access to food and water and 12 hours of light and 12 hours of darkness to get used to the environment. The rats were divided into 4 groups of 7. After one week, all rats were weighed and after 12 hours of fasting, blood was taken from their tail and their blood sugar was measured with a glucometer. Then we randomly separated a group, which was considered as a healthy group, which received 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO) by gavage. We induced diabetes in the other 3 groups. We divided 1 gram of STZ powder in the microtube in equal proportions (100 mg per microtube), then added 1 ml of 0.01 M sodium citrate buffer with pH=4.5 and kept it on ice until injection (STZ is stable for 15 minutes at room temperature). We injected STZ at a dose of 55 mg/kg intraperitoneally to rats. To confirm the development of diabetes 72 hours later, the blood sugar sample was measured with a glucometer. Diabetic rats are confirmed by blood glucose values higher than 250 mg/dl. Blood samples were collected from the tail of the animal. After confirming that the rats became diabetic, one group of diabetic rats was isolated as a control and the other 2 groups were treated and treated with biocanin A. Biocanin A was purchased from Sigma and was given to rats by gavage at a dose of 10 mg/kg dissolved in 0.5% DMSO for one group (third group) and with a dose of 15 mg/kg dissolved in 0.5% DMSO for another group (fourth group) for 42 days. During this period, the healthy control group and the diabetic control group only received 0.5% DMSO. At the end, all rats were weighed and anesthetized after 12 hours of fasting by inhalation of chloroform, and to measure the serum levels of biochemical parameters, after anesthesia, blood was collected from the left ventricle of the rats' hearts using a syringe. We poured the blood samples into a plastic test tube at room temperature for 15-20 minutes to clot, and the serum was separated by centrifugation at 2500 rpm for 15 minutes. After separating the

serum, we put them in a small microtube and they were kept in the freezer of the biochemistry laboratory at a temperature of 70 degrees below zero until the end of the work. The parameters of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma were measured in serum using a kit purchased from Crystal D Biotech and fasting blood sugar using a kit from Pars Azmoun. Immediately after taking blood from the heart, their pancreatic tissue was isolated and after washing in physiological serum, it was frozen in liquid nitrogen, then the levels of glutathione and malondialdehyde were measured in the homogenized pancreatic tissue by the kits of Kiazist and Teb Razi researchers, respectively.

RESULTS

The comparison of the average glucose showed a significant difference between the groups. ($P=0.03$) The two-by-two analysis of the groups shows the difference in blood glucose levels between the control and treatment groups. The diabetic control group that received only 0.5% DMSO showed a significant increase in blood glucose at the end of the treatment period in Maksiya or the healthy control group. By treating with biocanin A orally with a dose of 10 mg/kg and 15 mg/kg for six weeks, a significant decrease in blood sugar was observed in these two treatment groups compared to the diabetic control group. It should be noted that no significant difference was observed between the two treatment groups at the end of the six-week treatment period. The analysis of glutathione recovery data showed that there was a significant change in the diabetic control group compared to the healthy control group. A significant increase was seen in both treatment groups compared to the diabetic control group. ($P < 0.01$) The level of malondialdehyde also decreased significantly ($P = 0.001$) after treatment. The analysis of tumor necrosis factor alpha data indicates that only the difference between diabetic control group and healthy control and 15-biocanin A dose group and diabetic control is significant ($P = 0.03$) and no significant data was found in other comparisons. The analysis of interferon gamma data also showed that only the difference between diabetic control group and healthy control group is significant and no significant data was found in other comparisons ($P = 0.12$).

CONCLUSIONS

Biocanin A treatment is effective in controlling hyperglycemia. This compound is important in improving the redox conditions in the pancreas by increasing the level of rejuvenating glutathione and reducing malondialdehyde, and

by reducing the serum level of tumor necrosis factor alpha, it improves the inflammatory conditions caused by diabetes and helps to reduce its complications. No significant difference was observed between treatment doses. Previous studies have shown that the use of biochanine A has improved the pathological

damage of the beta cells of the islets of Langerhans. These findings, together with the findings of our study, can show that Biochanina A can exert its hypoglycemic and antioxidant effects by repairing pancreatic beta cells in diabetic rats.



مطالعه اثر بیوکائین A بر سطح سرمی فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا، اینترفرون گاما و سطح مالون دی آلدئید و گلوکاتیون در بافت پانکراس رت های دیابتی نوع یک القا شده با استرپتوزوتوسین

فاطمه طاهری^۱، زهرا سالمی^{۲*}

^۱ کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۲ هیات علمی بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اراک

* نویسنده مسئول: زهرا سالمی، هیات علمی بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اراک. ایمیل: zsalemi@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61186/cmja-13021

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰	مقدمه: بیوکائین A (BCA) به علت اثرات آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی مورد توجه می‌باشد. استرس اکسیداتیو و التهاب دومسیر کلیدی در بروز و پیشرفت دیابت نوع یک هستند. هدف از این مطالعه، تعیین اثر بیوکائین A بر سطح سرمی اینترفرون گاما، فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا و همینطور سطح گلوکاتیون و مالون دی آلدئید در پانکراس رت هایبست که با استرپتوزوتوسین به دیابت نوع یک مبتلا شده‌اند.
واژگان کلیدی: دیابت نوع یک بیوکائین آ فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا اینترفرون گاما استرس اکسیداتیو	روش کار: ۲۸ سر رت نر ویستار بطور تصادفی به چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند. یک گروه کنترل سالمی است که دی متیل سولفوکسیک، حلال بیوکائین A، دریافت کرد. بقیه رت ها، تحت تزریق صفاقی استرپتوزوسین به میزان ۵۵ mg/kg قرار گرفتند. یک گروه به عنوان کنترل دیابتی (گروه دوم) انتخاب شد که تنها دی متیل سولفوکسیک دریافت کرد و دو گروه دیگر به مدت ۶ هفته تحت درمان با بیوکائین A به میزان ۱۰ mg/Kg (گروه سوم) و ۱۵ mg/Kg (گروه چهارم) قرار گرفتند. در پایان خون از قلب جمع آوری شد و پارامترهای فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا، اینترفرون گاما و قند خون ناشتا در سرم اندازه گیری شد. سپس سطح گلوکاتیون و مالون دی آلدئید در بافت پانکراس هموزن شده اندازه گیری شد.
تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.	یافته‌ها: کاهش گلوکز خون ($P=0.03$) و مالون دی آلدئید ($P=0.001$) در گروه‌های درمانی معنی‌دار بود. گلوکاتیون ($P<0.01$) با درمان افزایش معنی‌داری داشت. کاهش فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا ($P=0.03$) تنها در گروه چهارم معنی‌دار بود اما کاهش اینترفرون گاما ($P=0.12$) در هیچ گروه درمانی معنی‌دار نبود.
	نتیجه گیری: درمان با بیوکائین A در کنترل هایپرگلیسمی مؤثر است. این ترکیب با افزایش سطح گلوکاتیون و کاهش مالون دی آلدئید در بهبود شرایط ردوکس در پانکراس حائز اهمیت بوده و با کاهش سطح سرمی فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا، شرایط التهابی ناشی از دیابت را بهبود بخشیده و به کاهش عوارض کمک می‌کند. تفاوت معنی‌داری بین دوزهای درمانی مشاهده نشد.

مقدمه

انسولین وابسته‌اند. آخرین پیشرفت‌ها در این زمینه نشان می‌دهد که واسطه‌های التهابی از آنچه که در ابتدا تصور می‌شد نقش گسترده‌تری در T1DM دارند: آن‌ها به القا و تقویت واکنش ایمنی در برابر سلول‌های بتا و در مراحل بعدی، به تثبیت و نگهداری انسولیت کمک می‌کنند. التهاب ممکن است به تخریب سلول‌های بتا، سرکوب طولانی مدت عملکرد سلول‌های بتا، مهار یا تحریک بازسازی سلول‌های بتا و مقاومت به انسولین محیطی منجر شود. این نقش‌های مختلف التهاب در طی مراحل مختلف دوره بیماری T1DM اتفاق می‌افتد و ممکن است تحت تأثیر زمینه ژنتیکی بیماران قرار گیرد که به ناهمگنی بیماری کمک می‌کند (۵). در دیابت نوع یک لنفوسیت‌های T به سلول‌های بتای پانکراس حمله می‌کنند و عوامل ژنتیکی و محیطی تشدید کننده این فرایند است و خطر ابتلا به T1DM را افزایش می‌دهند؛ این امر

دیابت گروهی از بیماری‌های متابولیک است که با هایپرگلیسمی ناشی از نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو مشخص می‌شود. هایپرگلیسمی مزمن دیابت با آسیب‌های طولانی مدت و اختلال در عملکرد ارگان‌های مختلف به ویژه چشم، کلیه، اعصاب، قلب و عروق همراه است (۱). شیوع دیابت در سال ۲۰۱۰ در میان بزرگسالان، ۲۸۵ میلیون نفر بوده و انتظار می‌رود در سال ۲۰۳۰ به ۴۳۸ میلیون نفر برسد (۲). دیابت نوع یک (T1DM) به عنوان زیرگروه اصلی دیابت حدود ۵٪ از کل موارد دیابت را شامل می‌شود (۳).

دیابت نوع یک شایع‌ترین بیماری خودایمن محدود به عضو است که طی آن سلول‌های بتای جزایر پانکراس به صورت اختصاصی آسیب می‌بینند (۴) در T1DM التهاب موضعی جزایر پانکراس (اینسولیت) به فقدان تدریجی سلول‌های بتای مولد انسولین کمک می‌کند و در نهایت بیماران که اکثراً کودک یا نوجوان هستند، برای زندگی به

پرکاربردترین شاخص پراکسیداسیون لیپیدها تشکیل مالون دی آلدئید (MDA) است. MDA حاصل تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع پراکسید شده است. MDA مارکری است که در بیماری دیابت بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است و با افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد مرتبط می‌باشد (۲۰).

گلوکاتاتیون از سه اسیدآمینو گلوتامات، گلایسین و سیستئین تشکیل شده است. از نقش‌های بارز گلوکاتاتیون احیا (فرم فعال) در سلول‌های مختلف بدن انسان، می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی، دخالت در تکثیر و بلوغ لنفوسیت‌ها، سم زدایی از متابولیت‌ها و ترکیبات سمی و تنظیم فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مثل ویتامین E و C اشاره نمود (۲۱). طی مطالعه آقای ABDEL و همکارانش بر روی رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (STZ) مشخص گردید که سطح گلوکاتاتیون احیا (GSH) در پانکراس رت‌های دیابتی کاهش می‌یابد (۲۲).

در سال‌های اخیر توجه رو به رشدی به درمان‌های متنوع و استفاده از محصولات گیاهی برای درمان دیابت و عوارض آن شده است (۲۳). فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های فنلی گیاهی هستند که به شکل گسترده در طبیعت یافت می‌شوند. بیوکائین آ (۵،۷- $\text{Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone}$) متعلق به گروه فلاونوئیدهاست که بیشتر در حبوبات یافت می‌شوند. بیوکائین را می‌توان در شبدر قرمز، سویا، جوانه یونجه، بادام زمینی و نخود و دیگر حبوبات یافت. خواص ضد سرطانی، ضد التهابی و کاهنده لیپیدی بیوکائین آ مشخص شده است (۲۴). بیوکائین آ با مهار فسفوریلاسیون و تخریب فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده ژن پلی‌پپتیدی نورکاپا آلفا ($\text{Ikb}\alpha$) و در نتیجه مهار NF-kB، که به نوبه خود منجر به کاهش بیان آنزیم نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) گشته، در نتیجه در مهار التهاب و تکثیر سلولی مؤثر است (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Xiaodong Ming و همکارانش صورت گرفت خاصیت ضد التهابی بیوکائین آ در بیماری قلبی و عروقی به اثبات رسیده است (۲۶). در مطالعه خانم صدری و همکاران در آزمایشگاه تحقیقات علوم پزشکی اراک اثر آنتی‌اکسیدانی بیوکائین آ (BCA) در دیابت نوع یک در نمونه سرم به اثبات رسیده است (۲۷). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Minmin Guo و همکارانش در چین صورت گرفت اثر محافظتی بیوکائین آ را بر روی بافت عصبی رت‌هایی که سکتة مغزی در آنها القا شده بود مورد ارزیابی قرار دادند (نتیجه بیانگر این امر بود که بیوکائین آ باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیس موتاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز می‌شود، این یافته‌ها نشان داد که بیوکائین آ به طور مؤثری از آسیب سکتة مغزی ناشی از آسیب اکسیداتیو با واسطه ROS می‌شود (۲۸).

آنچه در این مطالعه مورد نظر ماست، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی بیوکائین آ در بافت پانکراس و اثرات ضد التهابی این ترکیب در سرم رت‌های مبتلا به دیابت نوع یک است.

روش کار

حیوانات: روش کار با حیوانات، مطابق با روش‌های استاندارد و معتبر بوده و به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک رسید. (کد اخلاق: IR.ARAKMU.REC.1399.260)

منجر به توسعه و گسترش لنفوسیت‌های T عملکردی مختص به سلول‌های بتا (Teff) می‌گردد که مسبب ایجاد التهاب در جزایر می‌باشند (۶).

تخریب سلول‌های بتا بیشتر به دلیل عملکرد سایتوکاین‌های پیش التهابی است که توسط سلول‌های ایمنی فعال شده در جزایر ترشح می‌شوند (۷). فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ($\text{TNF-}\alpha$) به عنوان یک تسریع‌کننده با برانگیختن افزایش بیان مولکول‌های سازگار بافتی اصلی (MHC) کلاس یک و نیز افزایش بروز مولکول‌های چسبان بر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی سبب افزایش نفوذ و هجوم سلول‌های ایمنی به داخل پانکراس می‌گردد (۸). در مطالعات *in vitro* نشان داده شده است که $\text{TNF-}\alpha$ همراه با اینترفرون گاما ($\text{IFN-}\gamma$) می‌تواند سبب بیان نایجای مولکول‌های MHC کلاس دو بر روی سلول‌های جزیره‌ای پانکراس گردند (۹). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که سطح سرمی $\text{TNF-}\alpha$ در افرادی که به تازگی به T1DM مبتلا شده‌اند در مقایسه با افرادی که مدت طولانی از بیماری آن‌ها گذشته است و نیز بیماران دیابت نوع ۲ و گروه شاهد (سالم)، به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است (۱۰). $\text{TNF-}\alpha$ با القای تاثیرات آپوپتوزی باعث انهدام سلول‌های جزایر پانکراس شده و سپس سلول‌های دندریتیک با دسترسی داشتن به آنتی ژن‌های داخل سلولی این جزایر، موجب پردازش و ارائه مؤثر این آنتی ژن‌ها در قالب قطعات پروتئینی به سیستم ایمنی شده و سبب تحریک و تکثیر جمعیتی از سلول‌های T که ویژه سلول‌های جزیره‌ای‌اند، می‌گردد (۸، ۱۰). ایجاد وقفه در عملکرد $\text{TNF-}\alpha$ به طور قابل ملاحظه‌ای از ایجاد T1DM ممانعت خواهد کرد (۱۱).

$\text{IFN-}\gamma$ مترشح از سلول‌های Teff جزایر پانکراس سبب افزایش شاخص‌های کموتاکسی و القای مهاجرت لنفوسیت‌های B و T بیشتری به جزایر پانکراس می‌شود و همچنین سبب حفظ این عوامل توسط جزایر می‌گردد (۱۲). از طرفی $\text{IFN-}\gamma$ با فعال سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن و استروما تولید واسطه‌های التهابی را افزایش می‌دهد، مانند گونه‌های فعال اکسیژن که سبب مختل نمودن و نکروز سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد؛ علاوه بر این $\text{IFN-}\gamma$ در کنار اینترلوکین ۱ بتا و $\text{TNF-}\alpha$ سبب القاء آپوپتوز سلول‌های بتا می‌گردد (۱۳، ۱۴). $\text{IFN-}\gamma$ به همراه لیپوپولی ساکارید به عنوان محرک، سبب تحریک فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در ماکروفاژها و سلول‌های ایمنی می‌گردند (۱۵).

هایپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو سبب فعال شدن فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال شده (NF-kB) می‌گردد و منجر به رونویسی از ژن سایتوکاین‌ها از جمله $\text{TNF-}\alpha$ خواهد شد (علاوه بر این در شرایط دیابتی، مهاجرت ماکروفاژها باعث تحریک آزادسازی سایتوکاین‌ها می‌شود که موجب القا استرس اکسیداتیو خواهد شد (۱۶).

افزایش میزان استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت دیابت داشته است. تحت شرایط دیابتیک، گلوکز اکسید شده و موجب تولید واکنش پذیرترین گونه‌های رادیکال آزاد از قبیل پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌گردد (۱۷). بیان ژن‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های بتا به طور غیرمعمول کم است (۱۸). مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد باعث آسیب پروتئین‌های سلولی، غشای لیپیدی، نوکلئیک اسیدها و مرگ سلولی خواهد شد (۱۹).

گلوکز: طبق روش آنزیمی گلوکز اکسیداز با استفاده از کیت اندازه گیری گلوکز شرکت پارس آزمون، میزان سرمی گلوکز رت های مورد آزمایش بر حسب mg/dl تعیین شد. این روش تا غلظت گلوکز ۴۰۰ mg/dl از قانون بیر-لامبرت تبعیت می کند یعنی جذب با غلظت رابطه مستقیم دارد. نمونه هایی که پیش بینی می کردیم غلظت گلوکز در آنها بالاست را رقیق نمودیم (۳۲).

سنجش TNF- α به روش الایزا: با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت کریستال دی بایوتک، میزان TNF- α موجود در سرم رت های مورد مطالعه را به روش الایزای ساندویچ با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر Epoch2 ساخت آمریکا، موجود در آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بر اساس واحد ng/l اندازه گیری نمودیم. کیت مذکور یک کیت اختصاصی به منظور سنجش کمی TNF- α به صورت *in vitro* در سرم، هموژن بافتی و دیگر مایعات بیولوژیکی در رت ها می باشد. CV کیت مذکور کمتر از ۱۰٪ می باشد (۳۳).

سنجش IFN- γ به روش الایزا: با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت کریستال دی بایوتک، میزان اینترفرون گاما موجود در سرم رت های مورد مطالعه را به روش الایزای ساندویچ با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر Epoch2 موجود در آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بر اساس واحد ng/l اندازه گیری نمودیم. کیت مذکور یک کیت اختصاصی به منظور سنجش کمی اینترفرون گاما به صورت *in vitro* در سرم، هموژن بافتی و دیگر مایعات بیولوژیکی در رت ها می باشد. CV کیت مذکور کمتر از ۱۰٪ می باشد (۳۴).

روش اندازه گیری فاکتور بیوشیمیایی GSH: با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت کبازیس، میزان GSH موجود در هموژن بافتی پانکراس رت های مورد مطالعه را با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر Epoch2 موجود در آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بر اساس واحد M/ml μ اندازه گیری نمودیم (۳۵).

روش اندازه گیری فاکتور بیوشیمیایی MDA: با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت پژوهان طب رازی، میزان MDA موجود در هموژن بافتی پانکراس رت های مورد مطالعه را با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر Epoch2 موجود در آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بر اساس واحد M/ml μ اندازه گیری نمودیم (۳۶).

روش آنالیز داده ها: ابتدا داده ها در نرم افزار Excel مرتب و طبقه بندی شدند. مفاهیم آماری مانند میانگین، انحراف معیار (SD) و خطای استاندارد (SE) توسط نرم افزار SPSS ورژن ۲۴ انجام شد. ابتدا باید مشخص نماییم که متغیر کمی ما توزیع نرمالی دارد یا خیر که برای سنجش نرمال بودن توزیع آن از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف استفاده کردیم. اگر متغیر کمی توزیعی نرمال داشت از آزمون T-test و اگر توزیعی غیر نرمال داشت از آزمون Mannwithney بهره می بریم. مقایسه بین گروه ها با استفاده از آزمون ANOVA با سطح معنی داری $P=0.05$ و نمودار هیستوگرام انجام خواهد شد. بعد از مشاهده معنی دار شدن اختلاف بین گروه ها با استفاده از آزمون پست هوک توکی گروه ها دو به دو آنالیز شدند، نتایج حاصل از این بررسی به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید و اختلاف آماری با $P=0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد (۳۷).

روش اجرا: ۲۸ رت نر نژاد ویستار دارای وزن بین ۲۵۰-۲۰۰ گرم که تحت شرایط کنترل شده دمایی ($22 \pm 2^\circ C$) و با دسترسی آزادانه به آب و غذا و برخورداری از ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای خو گرفتن با محیط قرار گرفتند. رت ها به ۴ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. بعد از یک هفته همه رت ها وزن گردید و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از دم آنها خونگیری شد و قند خون آنها با گلوکومتر اندازه گیری شد. سپس بطور تصادفی یک گروه جدا کردیم که به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شد که دی متیل سولفوکسیک ۰.۵٪ (DMSO) را به صورت گاوژ دریافت کرد. به ۳ گروه دیگر دیابت را القا کردیم. پودر ۱ گرمی STZ مربوط به شرکت سیگما آمریکا را در میکروتیوب به نسبت مساوی (۱۰۰ mg در هر میکروتیوب) تقسیم کردیم سپس ۱ میلی لیتر بافر سیترات سدیم ۰.۱/۰ مولار با pH=۴.۵ اضافه کرده و تا زمان تریزیک بروی یخ نگهداری کردیم (۱۵ STZ دقیقه در دمای اتاق پایدار می باشد). STZ را با دوز mg/kg ۵۵ بصورت داخل صفاقی به رت ها تزریق کردیم (۲۹). برای تأیید ایجاد دیابت ۷۲ ساعت بعد، نمونه قند خون با گلوکومتر اندازه گیری شد. دیابتی شدن رت ها، توسط مقادیر گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ mg/dl تأیید می شود (۳۰). نمونه های خون از دم حیوان جمع آوری شد. پس از اطمینان از دیابتی شدن رت ها، یک گروه از رت های دیابتی شده بعنوان کنترل جدا شده و ۲ گروه دیگر مورد درمان و مداخله دارویی با بیوکائین A قرار گرفت. بیوکائین A از شرکت سیگما خریداری شد و با دوز mg/kg ۱۰ به صورت محلول در ۰.۵٪ DMSO برای یک گروه (گروه سوم) و با دوز ۱۵ mg/kg به صورت محلول در ۰.۵٪ DMSO برای گروه دیگر (گروه چهارم) به مدت ۴۲ روز به صورت گاوژ به رت ها داده شد. دوز های انتخابی جز دوز های مؤثر در مطالعات قبلی می باشند (۲۷، ۳۱، ۳۲). در این مدت گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی فقط ۰.۵٪ DMSO دریافت کردند.

در نهایت گروه بندی به صورت زیر می باشد:

کنترل سالم دریافت کننده ۰.۵٪ DMSO

کنترل دیابتی دریافت کننده ۰.۵٪ DMSO

گروه دیابتی دریافت کننده بیوکائین A با دوز ۱۰ mg/kg

گروه دیابتی دریافت کننده بیوکائین A با دوز ۱۵ mg/kg

در پایان تمامی رت ها وزن شده و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی توسط استنشاق کلروفورم بیهوش شده و از قلب آنها خونگیری می شود.

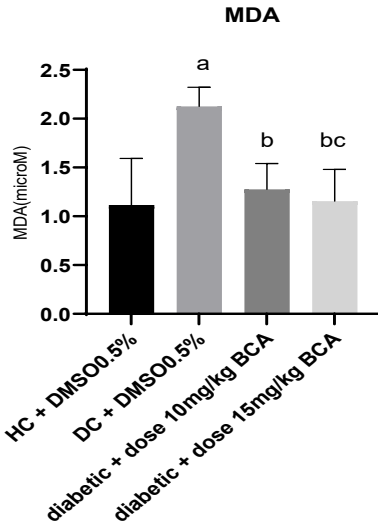
روش خونگیری و تهیه پلاسما: برای اندازه گیری سطوح سرمی پارامترهای بیوشیمیایی، پس از بیهوشی خون از بطن چپ قلب رت ها با استفاده از سرنگ جمع آوری شد. نمونه های خون را جهت لخته شدن به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق داخل لوله آزمایش های پلاستیکی ریختیم و با سانتریفیوژ شرکت سیگما آمریکا با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم جدا گردید. پس از جداسازی سرم، آن ها را در میکروتیوب کوچک ریختیم و درب آن ها را محکم بستیم و تا پایان کار در فریزر آزمایشگاه بیوشیمی و در دمای ۷۰ درجه زیر صفر نگهداری شدند.

تشریح و جداسازی بافت پانکراس: پس از خونگیری از قلب رت ها بلافاصله بافت پانکراس آن ها با کمک وسایل جراحی استریل جداسازی شد و پس از شستشو در سرم فیزیولوژی، در نیتروژن مایع فریز شد و تا زمان سنجش TNF- α و اینترفرون گاما به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل شد (۳۲).

روش اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی:

یافته‌ها

وزن بدن



نمودار ۳. مقایسه میانگین مقادیر مالون دی آلدئید در بافت پانکراس. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

جدول ۲. میانگین متغیر گلوکز خون در انتهای مطالعه در ۴ گروه تحت مطالعه (داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است). (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

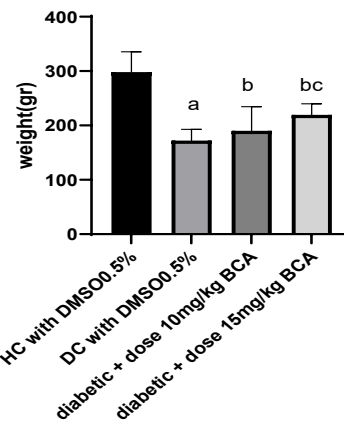
گروه‌های مورد مطالعه	وزن بدن در انتهای مطالعه (گرم)
کنترل سالم + ۰.۵٪ DMSO	۲۹۸/۲ \pm ۳۷/۲۵
کنترل دیابتی + ۰.۵٪ DMSO	a ۲۰۷/۲۰ \pm ۱۷۲/۱۷۲
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۰ mg/kg	b ۳۷/۴۴ \pm ۱۹۰/۱۹۰
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۵ mg/kg	bc ۴۵/۲۰ \pm ۲۱۹/۴۵

جدول ۳. تست‌های استرس اکسیداتیو (داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است). (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

گروه‌های مورد مطالعه	MDA M μ	GSH M μ /ml
کنترل سالم + ۰.۵٪ DMSO	۱/۱۱۷ \pm ۰/۴۷	± ۱۲۱/۵
کنترل دیابتی + ۰.۵٪ DMSO	a ۱۹/۰ \pm ۱۲۵/۲	۳۹۲/۸ \pm ۳۱/۹
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۰ mg/kg	b ۲۶/۰ \pm ۲۷۶/۱	۵۵۵/۳ \pm ۳۲/۸
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۵ mg/kg	bc ۳۲/۰ \pm ۱۵۵/۱	۶۷۹/۳ \pm ۷۳/۸

جدول ۴. تست‌های مرتبط با التهاب (داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است). (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

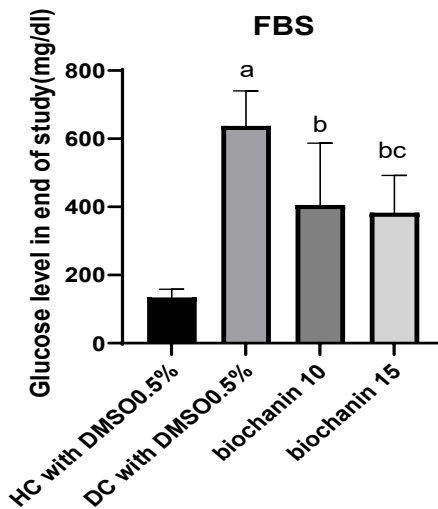
گروه‌های مورد مطالعه	TNF- α (ng/l)	IFN- γ (ng/l)
کنترل سالم + ۰.۵٪ DMSO	۱۰/۱۶ \pm ۳/۰۶	۹۸/۸ \pm ۲۷/۲۶
کنترل دیابتی + ۰.۵٪ DMSO	a ۸/۷۳ \pm ۸/۱۴۲	۱۴۴a \pm ۷/۴۶
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۰ mg/kg	b ۹/۴ \pm ۱۰/۸۰	۱۲۶/۸ \pm ۷/۲۹
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۵ mg/kg	bc ۰/۱۰۲ \pm ۳/۲۵	۱۱۹/۲ \pm ۱۵/۹۱



نمودار ۱. مقایسه میانگین وزن رت‌ها. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

جدول ۱. میزان وزن در انتهای مطالعه. نمودار ۱ مقایسه میانگین وزن رت‌ها (داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است). (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

گروه‌های مورد مطالعه	گلوکز خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)
کنترل سالم + ۰.۵٪ DMSO	۱۳۴/۳ \pm ۲۳/۷۷
کنترل دیابتی + ۰.۵٪ DMSO	a ۸/۶۳۷ \pm ۴/۱۰۲
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۰ mg/kg	b ۹/۴۰۵ \pm ۹/۱۸۰
دیابتی درمان با بیوکاتین دوز ۱۵ mg/kg	bc ۷/۱۰۹ \pm ۳۸۲/۷



نمودار ۲. مقایسه میزان گلوکز خون در بین گروه‌های مختلف در پایان مطالعه. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکاتین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

($P < 0/0001$) که ناشی از تزریق STZ بود. آزمون توکی نشان داد که بین گروه‌های دوز ۱۰ بیوکائین در مقابل کنترل دیابتی ($P = 0/008$) و دوز ۱۵ بیوکائین مقابل کنترل دیابتی ($P = 0/01$) اختلاف معنادار است اما بین دو گروه درمان با بیوکائین اختلاف معنی داری وجود ندارد ($P = 0/4$). (نمودار ۱)

گلوکز خون

جدول ۲، اثر بیوکائین آ را در گروه‌های تحت درمان بر میزان گلوکز خون ناشتا در انتهای مطالعه نشان می‌دهد. مقایسه میانگین گلوکز با استفاده از آزمون آماری آنووا نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها بود. از آزمون توکی نیز برای بررسی دو به دوی گروه‌ها استفاده شد که نمایانگر اختلاف در میزان گلوکز خون در بین گروه‌های کنترل و درمان است. گروه کنترل دیابتی که تنها ۰.۵٪ DMSO دریافت کرده بود افزایش معنی دار گلوکز خون در انتهای دوره درمان را در مقایسه با گروه کنترل سالم نشان داد ($P < 0/0001$). با انجام درمان با بیوکائین آ به صورت خوراکی با دوز ۱۰ mg/kg ($P = 0/03$) و ۱۵ mg/kg ($P = 0/01$) به مدت شش هفته با کاهش معنی داری در قند خون این دو گروه درمانی نسبت به گروه کنترل دیابتی مشاهده گردید. قابل ذکر است که تفاوت معنی داری در بین دو گروه درمانی در پایان دوره درمان شش هفته مشاهده نگردید ($P = 0/1$). (نمودار ۲)

نتایج مربوط به پارامترهای مرتبط با استرس اکسیداتیو

مالون دی آلدئید

در **جدول ۳**، میانگین و انحراف معیار متغیرهای MDA و GSH در گروه‌های تحت مطالعه نمایش داده شده است. آنالیز داده‌ها MDA با استفاده از آزمون‌های آنووا و توکی نشان داد که تغییر غلظت MDA در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با کنترل سالم معنی دار است ($P < 0/001$)، از طرفی با مقایسه گروه دوز ۱۰ بیوکائین در مقابل کنترل دیابتی ($P = 0/004$) و گروه دوز ۱۵ بیوکائین در مقابل کنترل دیابتی ($P = 0/001$) تفاوت‌های معنی داری مشاهده شد و در سایر قیاس‌ها داده معنی داری مشاهده نشد. (نمودار ۳)

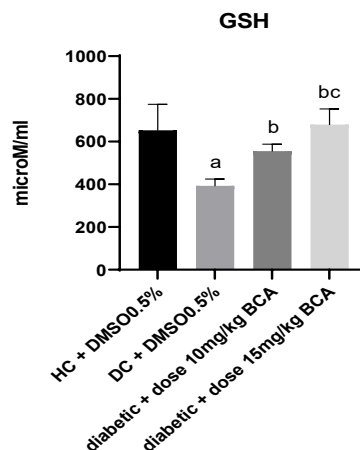
گلوکاتین احیا

آنالیز داده‌های گلوکاتین احیا با استفاده از آزمون‌های آماری آنووا و توکی نشان داد در گروه کنترل دیابتی تغییر معناداری نسبت به گروه کنترل سالم ($P = 0/0002$) ایجاد شده است. در هر دو گروه درمانی افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی دیده شد ($P < 0/01$). (نمودار ۴)

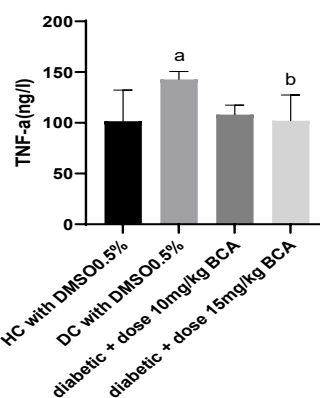
نتایج مربوط به پارامترهای مرتبط با التهاب

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

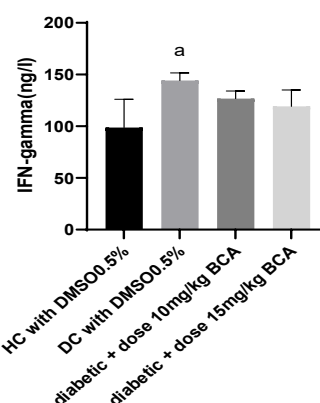
جدول ۴، میانگین و انحراف معیار متغیرهای TNF- α و IFN- γ را در گروه‌های تحت مطالعه نشان می‌دهد. آنالیز داده‌های TNF- α با استفاده از آزمون‌های آنووا و توکی حاکی از آن است که تنها اختلاف گروه کنترل دیابتی در مقابل کنترل سالم ($p = 0/02$) و گروه دوز ۱۵ بیوکائین آ در مقابل کنترل دیابتی معنادار است ($p = 0/03$) و در سایر قیاس‌ها داده معنی داری یافت نشد. (نمودار ۵)



نمودار ۴، مقایسه میانگین مقادیر گلوکاتین احیا در بافت پانکراس. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC)، (c) در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز ۱۰ بیوکائین. سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۵، مقایسه میانگین مقادیر TNF- α سرم رت‌های مورد مطالعه. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC)، (b) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (DC). سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۶، مقایسه میانگین مقادیر IFN- γ سرم رت‌های مورد مطالعه. (a) در مقایسه با گروه کنترل سالم (HC). سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

پس از دوره ۶ هفته‌ای درمان، وزن رت‌ها اندازه‌گیری شد. (جدول ۱) آنالیز آماری آنووا و توکی به ترتیب برای بررسی اختلاف معنی داری گروه‌ها و بررسی دو به دوی گروه‌ها انجام شد. گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش وزن معنی داری داشت

اینترفرون گاما

آنالیز داده‌های IFN- γ با استفاده از آزمون‌های آنووا و توکی نشان داد که تنها اختلاف گروه کنترل دیابتی در مقابل کنترل سالم معنادار است ($p < 0/002$) و در سایر قیاس‌ها داده معنی داری یافت نشد. (نمودار ۶)

بحث

ما در این مطالعه اثرات قابل توجه مصرف خوراکی بیوکائین آ را بر کاهش وزن، FBS و TNF- α در سرم و کاهش MDA و افزایش GSH در بافت پانکراس را در رت‌های سالم و دیابتی مشاهده کردیم.

استرس اکسیداتیو و التهاب ارتباط مستقیمی با دیابت دارند و در مطالعاتی که بر روی دیابت انجام می‌شود نباید از این دو موضوع مهم غافل شد. به همین دلیل ما تلاش کردیم که در این پژوهش سایتوکاین‌های التهابی TNF- α و IFN- γ را در سرم و مارکرهای استرس اکسیداتیو شامل MDA و GSH را در بافت پانکراس در رت‌های دیابتی بررسی کنیم، رت‌هایی که پس از ابتلا به دیابت با نوعی بیوفلاوونوئید به نام بیوکائین آ درمان شدند.

اختلال متابولیک مزمن دیابت یکی از سریع‌ترین بیماری‌های در حال رشد در سراسر جهان است که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۴۵ بر ۶۹۳ میلیون بزرگسال تأثیر بگذارد (۳۸). دیابت یک بیماری است که با هیپرگلیسمی مشخص می‌شود و در اثر کمبود مطلق یا نسبی انسولین ایجاد می‌شود که گاهی با مقاومت به انسولین همراه است. هیپرگلیسمی مزمن علت تفریبی رتینوپاتی، نارسایی کلیه، نوروپاتی‌ها و بیماری ماکروواسکولار در دیابت است (۳۹). شکست سلول‌های بتا پانکراس مشخصه مشترک دیابت نوع ۱ و نوع ۲ است. دیابت نوع ۱ با تخریب سلول‌های β پانکراس که با یک مکانیسم خود ایمنی و در نتیجه فرآیند التهابی می‌باشد، ایجاد می‌شود. سیتوکین‌های التهابی مختلف و استرس اکسیداتیو در طی این فرآیند تولید می‌شوند که پیشنهاد شده است نقش مهمی در میانجیگری تخریب سلول‌های β ایفا کند (۴۰). افزایش میزان استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت دیابت و عوارض ناشی از آن داشته و دیابت معمولاً با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا اختلال دفاع آنتی‌اکسیدانی اتفاق می‌افتد (۱۷). مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد باعث آسیب پروتئین‌های سلولی، غشای لیپیدی، نوکلئیک اسیدها و مرگ سلولی خواهد شد. اعتقاد بر این است که اکسیداسیون گلوکز منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد است (۱۹). بنابراین در بیماران دیابتی افزایش استرس اکسیداتیو ممکن‌ترین نتیجه اختلال متابولیسم گلوکز است در نتیجه تمرکز بر روی داروهایی است که رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و آسیب اکسیداتیو در بیومولکول‌ها را بهبود ببخشد (۴۱).

درمان با انسولین در افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ دارای کاستی‌هایی است و بسیاری از بیماران به اهداف گلیسمی و متابولیک دست نمی‌یابند. در نتیجه، تمرکز بر رویکردهای جدید درمانی غیرانسولینی است که هیپرگلیسمی را کاهش می‌دهد و متغیرهای متابولیک را بدون افزایش خطر هیپوگلیسمی یا سایر عوارض جانبی بهبود می‌بخشد. چندین روش درمانی همراه با انسولین در آزمایش‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، از جمله پرامیلینتید، آگونیست‌های گیرنده پپتید-۱ شبه گلوکاگون، مهارکننده‌های دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴، مهارکننده‌های ناقل سدیم-گلوکز، متفورمین، سولفونیل اوره‌ها و تیازولیدیدین دیون‌ها این

داروها اثرات پلی‌تروپیک بر متابولیسم گلوکز و اثرات متفاوت مکمل انسولین دارند (۴۲). مطالعات متعددی روی این داروها صورت گرفته است که نشان دهنده عوارض آن‌ها می‌باشد (۴۳-۴۶). داروهای سنتی مشتق از گیاهان دارویی در بیش از ۶۰ درصد از مردم جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (در مطالعاتی که در کشورهای هند و آفریقا صورت گرفته بود نشان داده شده است که بیش از ده‌ها مورد از گیاهان بسته به شرایط جغرافیایی و پوشش گیاهی توسط مردم منطقه برای درمان دیابت استفاده می‌شده است (۴۷، ۴۸).

BCA یک ایزوفلاون غذایی طبیعی است که در چندین مکمل غذایی گیاهی وجود دارد (۴۹). با توجه به مطالعات گذشته و تاثیرات این ترکیب بر التهاب و شرایط اکسیداتیو، در این مطالعه اثرات جدایی از این ترکیب مورد مطالعه قرار گرفت و تاثیرات شش هفته درمان با بیوکائین آ در دوزهای ۱۰ mg/Kg و ۱۵ mg/Kg بر سطح MDA و GSH در پانکراس و سطح TNF- α و IFN- γ در سرم بررسی گردید. مطالعه Schnedl و همکاران نشان داده است که STZ باعث اختلال در اکسیداسیون گلوکز شده و ساخت و ترشح انسولین را کاهش می‌دهد (۵۰). قند خون در این مطالعه در گروه کنترل دیابتی در طول مدت تحقیق افزایش یافت در حالیکه در گروه‌های دیابتی تحت درمان به طور معنی داری کاهش یافت. مشابه این یافته در بررسی‌های Harini و همکارانش در رت‌های دیابتی که به BCA درمان شدند مشاهده گردید که دلیل کاهش قند خون را افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتا دانستند زیرا در این شرایط استفاده از گلوکز به وسیله بافت افزایش می‌یابد. BCA با مهار تیروزین کینازهای مربوط به گیرنده انسولین فیدبک منفی انسولین بر ترشح خودش را خنثی می‌کند (۵۱). مطالعات اثرات BCA در سلول‌های بتا را به فعالیت بازدارندگی تیروزین کینازی نسبت می‌دهند. از طرفی Brahmachari گزارش کرد که فلاوونوئیدها ترکیبات فنولی هستند که احتمالاً از طریق مهار آنزیم آلفاگلوکونیاز روده‌ای و جلوگیری از جذب روده‌ای گلوکز در دیابت موثرند (۵۲).

بر اساس ارزیابی‌های عمیق مطالعات *in vivo* و *in vitro*، ایزوفلاوونوئیدها بیان ژن را از طریق تحریک گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیرکننده پراکسی زوم (PPARs) فعال می‌کنند، متابولیسم کربوهیدرات را تعدیل می‌کنند، هیپرگلیسمی را تنظیم می‌کنند، باعث ایجاد دیس لیپیدمی می‌شوند، مقاومت به انسولین را کاهش می‌دهند و تمایز سلول‌های چربی و متابولیسم بافتی را تغییر می‌دهد. همچنین گزارش شده است که اثر کاهش قند خون ایزوفلاوونوئیدها عمدتاً با کاهش جذب روده‌ای کربوهیدرات‌های غذایی، تعدیل آنزیم‌های دخیل در متابولیسم گلوکز، بهبود عملکرد سلول‌های β و انسولین مرتبط است. تحریک ترشح انسولین و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین اثر ضد التهابی این ترکیبات یکی از شناخته شده ترین خواص ایزوفلاوونوئیدها بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها، مهار روده‌ای آلفا گلوکونیاز در هیدرولیز کربوهیدرات‌ها است (۵۳). کاهش قابل توجهی در سطوح گلوکز، مقاومت به انسولین، هموگلوبین، و گلوکز-۶-فسفات، و فعالیت فروکتوز-۱،۶-بیس فسفاتاز و گلیکوژن فسفوریلاز، پس از تجویز خوراکی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن BCA مشاهده شد. علاوه بر این، موش‌های هیپرگلیسمی تحت درمان با بیوکائین A، فعالیت‌های قابل توجه بالاتری از هگزوکیناز و گلیکوژن سنتاز و سطوح کبدی گلیکوژن نشان دادند (۵۴).

مختلف مؤثر بوده است اما در رابطه با تأثیر آن بر کاهش IFN- γ مطالعه قابل ذکری یافت نشد. در این مطالعه ما اثر دریافت بیوکائین آ بر سطح سرمی دو فاکتور را مورد بررسی قرار دادیم که سطح فاکتور TNF- α کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان دادند اما میزان IFN- γ با دریافت بیوکائین آ کاهش چندانی نداشته و سطح تغییرات آن نسبت به گروه کنترل دیابتی معنی دار نبود. (نمودارهای ۵ و ۶)

در مطالعه آقای نیکنام که پلی مورفیسم ژن سایتوکاین IFN- γ را در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک بررسی کرد نشان داده شد که اختلاف معنی داری در بروز آل TT ژن IFN- γ وجود دارد. این رابطه از نوع منفی بود و بروز آل TT در ژن IFN- γ می‌تواند از بروز دیابت جلوگیری کند (۵۷). اما در مطالعه آقای آفرید که سطح سرمی IFN- γ را در بیماران دیابتی مبتلا به درگیری شبکیه بررسی کرد مشاهده گردید که ارتباط معنی داری میان سطح سرمی IFN- γ و رتینوپاتی دیابتی یافت نشد (۵۸). Von Herrath و همکاران طی پژوهشی نتیجه گرفتند که IFN- γ در تخریب سلول‌های بتا و به وجود آوردن دیابت وابسته به انسولین نقش حیاتی دارند (۵۹). در مطالعه ما افزایش معنی دار IFN- γ در گروه دیابتی دیده شد. در مطالعه Bao که مهار التهاب راه هوایی توسط ایزوفلاوون سویا را بررسی کرد دیده شد که ایزوفلاوون سویا سطح IFN- γ را در مایع لاواژ برونکوالوئولار به طور قابل توجهی بهبود می‌دهد (۶۰). در مطالعه ما کاهش IFN- γ در گروه‌های درمانی دیده شد اما این کاهش معنی دار نبود.

در دیابت نوع ۱، تخریب خودایمنی سلول‌های β پانکراس با واسطه سلول‌های T، فرایندی ثانویه به دنبال حمله اولیه ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک به جزایر است (۶۱). از طرفی سایتوکین‌ها، از جمله TNF- α ، IL-1 β و IFN- γ می‌توانند تولید رادیکال‌های آزاد سمی را تحریک کنند. این سایتوکین‌های پیش التهابی و رادیکال‌های آزاد به طور هم افزایی آسیب سلول‌های بتا را در T1DM تشدید می‌کنند (۶۲).

گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن به عنوان واسطه‌های تخریب سلول‌های β پانکراس در دیابت نقش دارند. در شروع و توسعه T1DM، ماکروفاژها رادیکال‌های آزاد مانند آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال آزاد هیدروکسیل تولید می‌کنند تا تخریب سلول‌های β را افزایش دهند. این مولکول‌های واکنشی ممکن است با غشای سلولی واکنش داده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدی شوند که باعث آسیب سلولی می‌شود. نشان داده شده است که MDA به عنوان شاخص فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی در بافت پانکراس موش‌های دیابتی ناشی از STZ افزایش یافته است (۶۲). همانگونه که در مطالعه ما نیز افزایش MDA در رت‌های دیابتی مشاهده گردید.

افزایش سطح MDA ممکن است نقش مهمی در آسیب پانکراس مرتبط با دیابت داشته باشد. در شرایط دیابتی، سطح پراکسیداسیون لیپیدی در لوزالمعده بسیار بالاتر از موش‌های غیر دیابتی است (۶۳). به منظور بررسی استرس اکسیداتیو، شاخص پراکسیداسیون لیپیدها یا MDA ارزیابی شد. MDA در رت‌های مبتلا به دیابت نسبت به رت‌های سالم افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد که بیان کننده آسیب پذیری بیشتر لیپیدهای غشا در برابر ترکیبات اکسیدکننده می‌باشد. نتایج مطالعه ما نیز حاکی از افزایش MDA در نتیجه افزایش

همانطور که در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده بود (۳۱، ۳۲) بیوکائین آ غلظت گلوکز سرمی را به طور معنی داری کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم نیز این کاهش به صورت معنی دار مشاهده گردید (نمودار ۲) که به جهت تأیید عملکرد استرپتوزوتوسین و بیوکائین آ سطح سرمی قند خون ناشتای رت‌ها در پایان مطالعه اندازه‌گیری شد و صحت عملکرد دو ترکیب تأیید گردید. اما به منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی بیوکائین آ در پانکراس و خواص ضد التهابی آن در سرم موارد دیگری را مورد ارزیابی قرار دادیم.

در دیابت نوع یک با افزایش میزان سایتوکاین‌های التهابی همچون TNF- α و IFN- γ مواجه هستیم (در مطالعه‌ای که صورت گرفت سطح این دو سایتوکاین در گروه موش‌های دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معنی داری را نشان داد. (نمودارهای ۵ و ۶)

مطالعات متعددی اثرات ضدالتهابی BCA را نشان داده‌اند که اولین بار در سال ۲۰۰۷ در میکروگلیا نشان داده شد، زمانی که نشان داده شد BCA از فعال‌سازی میکروگلیا ناشی از لیپوپولی‌ساکارید (LPS) جلوگیری می‌کند. اثر ضد التهابی BCA در بسیاری از انواع سلول‌های دیگر، از جمله ماکروفاژها، سلول‌های سرطانی مختلف و سلول‌های اندوتلیال، در آزمایش‌های متعدد *in vivo* نشان داده شده است (۵۵). ارتشاح سلول‌های لنفوسیت در سلول‌های بتا که اینسولیت نامیده می‌شود، علاوه بر تخریب انتخابی سلول‌های تولیدکننده انسولین و ایجاد بیماری دیابت می‌تواند سبب بهبودی کامل و بازگشت به وضعیت سلامت گردد. TNF- α به عنوان یک تسریع کننده با برانگیختن افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس یک و نیز افزایش بروز مولکول‌های چسبان بر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی سبب افزایش نفوذ و هجوم سلول‌های ایمنی به داخل پانکراس می‌گردد. از طرفی دیگر IFN- γ مترشح از اینسولیت‌ها سبب القای مهاجرت لنفوسیت‌های B و T بیشتری به جزایر پانکراس می‌شود و همچنین سبب حفظ این عوامل توسط جزایر می‌گردد (بنابراین کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی و همچنین کاهش گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند باعث پیشگیری از تخریب سلول‌های بتا باشد و به نوعی روند بیماری را کندتر نماید (۵۶).

به منظور بررسی اثرات BCA بر التهاب در این مطالعه، میزان TNF- α پس از ۶ هفته درمان با BCA سبب کاهش معنی‌دار آن در سرم رت‌های دیابتی تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد. BCA یک آگونیست بالقوه فعال برای گیرنده‌های فعال شده توسط تکثیرکننده پراکسی زوم آلفا/گاما (PPAR α/γ) است. رسپتورهای PPAR α/γ رسپتورهای درگیر در تنظیم پاسخ‌های التهابی و پاسخ‌های ایمنی هستند. به طوری که مطالعات گزارش نموده‌اند درمان با آگونیست‌های PPAR α/γ سبب کاهش سایتوکاین‌های التهابی در بیماران دیابتی می‌شود. از این رو پیش بینی می‌شود BCA به عنوان یک آگونیست برای PPAR α/γ سبب تعدیل پاسخ‌های التهابی شده و تولید سایتوکاین‌های التهابی از جمله TNF- α را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر موافق با این یافته ما مطالعه خانم اسکندری در دانشگاه علوم پزشکی اراک نشان داد که بیوکائین آ سطح TNF- α در رتینای چشم را کاهش می‌دهد (۳۲). مطالعه Aboukamar نشان داد فعالیت ضد التهابی BCA در بافت‌های مغز موش‌های مبتلا به توکسوپلاسموز مزمن با کاهش سطح بیان TNF- α همراه است (۵۵). همانطور که در مطالعات قبلی دیده شد بیوکائین آ در کاهش TNF- α در بافت‌های

پانکراس بودیم و از آنجایی که مطالعه خانم صدی نشان داد درمان با BCA موجب کاهش آنزیم گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) می‌شود و این آنزیم می‌تواند GSH خارج سلولی را به گلوتامیل و دی پپتید سیستئینیل گلیسین تجزیه می‌کند در نتیجه کاهش GGT موجب افزایش GSH می‌شود (۲۷).

مطالعه آقای عزیزی در دانشگاه علوم پزشکی اراک نشان داد که مصرف بیوکائین آ سبب بهبود آسیب‌های پاتولوژیک سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس شده است (۳۱). این یافته‌ها به همراه یافته‌های مطالعه ما می‌تواند نشان دهد که بیوکائین آ با ترمیم سلول‌های بتای پانکراس در موش‌های دیابتی می‌تواند اثرات هایپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کند.

با توجه به اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بیوکائین آ پیشنهاد می‌شود تا تأثیر آن بر مکانیسم‌های مولکولی نیز مورد بررسی قرار بگیرد تا به تأثیر آن در سطح ژن‌ها پی ببریم. با توجه به این که مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد محدودیت مالی اجازه مطالعات مولکولی را فراهم نکرد.

با توجه به محدودیت زمانی به عوارض درمانی ترکیبات دارویی در مصارف طولانی مدت پرداخته نشده است، بهتر است دوز مصرفی طولانی مدت بیوکائین آ بررسی شود تا در صورت ایجاد عوارض دوز های مختلف جهت برگزیدن بهترین دوز درمانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه گیری

درمان با بیوکائین آ در دو دوز مختلف در کنترل هایپرگلیسمی مؤثر است. این ترکیب با افزایش سطح GSH و کاهش MDA در بهبود شرایط ردوکس در پانکراس حائز اهمیت بوده و با کاهش سطح TNF- α در سرم، شرایط التهابی ناشی از دیابت را بهبود بخشیده و به کاهش عوارض ناشی از آن کمک می‌کند. تفاوت معنی داری بین دو دوز درمانی مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اراک استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مسئولان پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک و هیئت داوران پایان نامه که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام کنند.

References

1. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-74. doi: 10.2337/dc13-S067 pmid: 23264425
2. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87(1):4-14. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.007 pmid: 19896746
3. Li W, Huang E, Gao S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(1):29-36. doi: 10.3233/JAD-161250 pmid: 28222533
4. André-Schmutz I, Hindelang C, Benoist C, Mathis D. Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulinitis to diabetes. *Eur J Immunol Wiley Online Librar*. 1999;29(1):245-255. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<245::AID-IMMU245>3.0.CO;2-O

پراکسیداسیون لیپیدها در پانکراس رت های مبتلا به دیابت نوع یک نسبت به رت های کنترل سالم است. مقایسه گروه‌های درمانی با گروه کنترل دیابتی نشان می‌دهد که این ایزوفلاون خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و میزان MDA در هر دو گروه درمانی کاهش داده است. این اثر ممکن است به علت فعالیت scavenging حلقه فنولی جنیستئین باشد (۲۷).

GSH، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی، به طور مؤثر رادیکال‌های آزاد و سایر ROS را به طور مستقیم و غیر مستقیم از طریق واکنش‌های آنزیمی از بین می‌برد (۶۳). GSH یک آنتی‌اکسیدان درون‌زا است که به عنوان سیستم دفاعی خط اول در برابر وضعیت پرواکسیدانی عمل می‌کند (۶۴). مطالعه Anathan کاهش قابل توجهی در سطح GSH پلاسما در موش‌های آزمایشگاهی دیابتی نشان داد (۶۵). به طور مشابه، کاهش سطح GSH به طور مکرر در چندین بافت حیوانات دیابتی آزمایشی، از جمله چشم، آنورت، کلیه و همچنین روده کوچک گزارش شده است (۶۶-۶۸). علاوه بر این، کاهش قابل توجهی در سطح پلاسما و همچنین سطوح GSH گلبول قرمز در بیماران دیابتی ثبت شده است (۶۹، ۷۰). مطالعه Ji Wei Tan نشان داد، پیش‌انکوباسیون سلول‌های PC۱۲ با بیوکائین A، اثرات L-گلوتامات را با بازگرداندن سطح GSH درون سلولی کاهش می‌دهد، که نشان می‌دهد اثرات محافظت عصبی بیوکائین A ممکن است به توانایی آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داده شود (۷۱). در مطالعه Prachi Mishra نیز نشان داده شد که بیوکائین آ سطح گلوکاتینون احیا را در سلول‌های کبد و غدد پستان افزایش می‌دهد. GSH همچنین می‌تواند به عنوان یک کاهنده عمل کند و بنابراین می‌تواند به طور مستقیم با رادیکال‌های H₂O₂، OH و O₂ تعامل داشته باشد. این یکی از معادل‌های کاهنده تیول در سلول‌ها است. بنابراین، در مطالعه حاضر، افزایش GSH در پاسخ به BCA ممکن است سلول‌ها را با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد محافظت بیشتری کند (۷۲).

Pasaoglu و همکاران در طی تحقیقاتی در رابطه با افراد دیابتی دریافتند که مقدار گروه‌های تیول آن‌ها کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل داشت (۷۳). از طرفی Ceriello و همکاران نیز با مطالعه روی بیماران دیابتی مشاهده کردند که گروه‌های تیول کاهش و MDA به طور معنی داری افزایش پیدا کرده بود (۷۴). نتایج مطالعه ما با مطالعات ذکر شده هماهنگ است و میزان GSH در رت های دیابتی کاهش یافته بود چون افزایش تولید ROS باعث تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود. در گروه‌های درمانی شاهد افزایش این ترکیب در

- (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med*. 1996;**184**(5):1963-1974. doi: 10.1084/jem.184.5.1963 pmid: 8920883
9. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, et al. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature*. 1987;**326**(6110):304-306. doi: 10.1038/326304a0 pmid: 3102976
 10. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*. 1996;**39**(1):60-69. doi: 10.1007/BF00400414 pmid: 8720604
 11. Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB, Katz JD. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1999;**189**(7):1053-1062. doi: 10.1084/jem.189.7.1053 pmid: 10190896
 12. Walker LS, von Herrath M. CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2016;**183**(1):16-29. doi: 10.1111/cei.12672 pmid: 26102289
 13. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005;**54** Suppl 2:S97-107. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97 pmid: 16306347
 14. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther*. 2005;**12**(6):580-591. doi: 10.1097/01.mjt.0000178767.67857.63 pmid: 16280652
 15. Switching AP, Self DS, Path V, Healing S, Path LS, Reroute F. *Arch ch Ar*. 1987:15-23.
 16. Ziamajidi N, Nasiri A, Abbasalipourkabir R, Sadeghi Moheb S. Effects of garlic extract on TNF-alpha expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ + nicotinamide-induced diabetes. *Pharm Biol*. 2017;**55**(1):526-531. doi: 10.1080/13880209.2016.1255978 pmid: 27937047
 17. Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, Hassani S, Pakzad M, Baeeri M, et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World J Diabetes*. 2011;**2**(11):204-210. doi: 10.4239/wjcd.v2.i11.204 pmid: 22087357
 18. Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017;**26**(10):501-518. doi: 10.1089/ars.2016.6755 pmid: 27225690
 19. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*. 1999;**26**(1-2):202-226. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00196-8 pmid: 9890655
 20. C R V I H O E H C I v O E F. 1931:110-120.
 21. Abdel-Wahab MH, Abd-Allah AR. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice. *Pharmacol Res*. 2000;**41**(5):533-537. doi: 10.1006/phrs.1999.0614 pmid: 10753552
 22. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;**17**(1):24-38. doi: 10.1002/jbt.10058 pmid: 12616644
 23. Li DD, Chen JH, Chen Q, Li GW, Chen J, Yue JM, et al. Swietenia mahagony extract shows agonistic activity to PPAR(gamma) and gives ameliorative effects on diabetic db/db mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;**26**(2):220-222. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00527.x pmid: 15663902
 24. Jain A, Lai JC, Bhushan A. Biochanin A inhibits endothelial cell functions and proangiogenic pathways: implications in glioma therapy. *Anticancer Drugs*. 2015;**26**(3):323-330. doi: 10.1097/CAD.000000000000189 pmid: 25501542
 25. Kole L, Giri B, Manna SK, Pal B, Ghosh S. Biochanin-A, an isoflavone, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkappaB nuclear translocation. *Eur J Pharmacol*. 2011;**653**(1-3):8-15. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.11.026 pmid: 21147093
 26. Ming X, Ding M, Zhai B, Xiao L, Piao T, Liu M. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci*. 2015;**136**:36-41. doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.015 pmid: 26141992
 27. Sadri H, Goodarzi MT, Salemi Z, Seifi M. Antioxidant effects of biochanin A in streptozotocin induced diabetic rats. *Brazilian Arch Biol Technol SciELO Brasil*. 2017:60. doi: 10.1590/1678-4324-2017160741
 28. Guo M, Lu H, Qin J, Qu S, Wang W, Guo Y, et al. Biochanin A Provides Neuroprotection Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Nrf2-Mediated Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation Signaling Pathway in Rats. *Med Sci Monit*. 2019;**25**:8975-8983. doi: 10.12659/MSM.918665 pmid: 31767824
 29. Xu HL, Wang XT, Cheng Y, Zhao JG, Zhou YJ, Yang JJ, et al. Ursolic acid improves diabetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;**105**:915-921. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.055 pmid: 30021385
 30. Thirapattthanavong P, Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-mee W, Lertrat K, Suriham B. The combined extract of purple waxy corn and ginger prevents cataractogenesis and retinopathy in streptozotocin-diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;**2014**:789406. doi: 10.1155/2014/789406 pmid: 25614778
 31. Azizi R, Goodarzi MT, Salemi Z. Effect of biochanin a on serum visfatin level of streptozocin-induced diabetic rats. *Iran Red Crescent Med J Kowsar Med Institut*. 2014;**16**(9). doi: 10.5812/ircmj.15424
 32. Mehrabadi ME, Salemi Z, Babaie S, Panahi M. Effect of Biochanin A on Retina Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-1Beta in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Can J Diabetes*. 2018;**42**(6):639-644. doi: 10.1016/j.jcjd.2018.03.008 pmid: 30054234
 33. Allahtavakoli M, Kamiab Z, Zamanian MY, Kujawska M, Boroushaki MT, Rahmani MR. Potential Anti-inflammatory Activity of Brown Propolis Against Brain Ischemia Damage in Mice. *Casp J Neurol Sci Caspian J Neurologic Sci*. 2023;**9**(2):61-70. doi: 10.32598/CJNS.9.33.396.1
 34. Rahimlou M, Nematollahi S, Husain D, Banaei-Jahromi N, Majdinasab N, Hosseini SA. Probiotic supplementation and systemic inflammation in relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Front Neurosci*. 2022;**16**:901846. doi: 10.3389/fnins.2022.901846 pmid: 36203797
 35. Rahmani H, Moloudi MR, Hashemi P, Hassanzadeh K, Izadpanah E. Alpha-Pinene Alleviates Motor Activity in Animal Model of Huntington's Disease via Enhancing Antioxidant Capacity. *Neurochem Res*. 2023;**48**(6):1775-1782. doi: 10.1007/s11064-023-03860-9 pmid: 36689085
 36. Javid H, Hashemy SI, Heidari MF, Esparham A, Gorgani-Firuzjaee S. The Anticancer Role of Cerium Oxide Nanoparticles by Inducing Antioxidant Activity in Esophageal Cancer and Cancer Stem-Like ESCC Spheres. *Biomed Res Int*. 2022;**2022**:3268197. doi: 10.1155/2022/3268197 pmid: 36506910
 37. Salemi Z. Archive of SID effect of Biochanin A, an isoflavone, on VEGF and TNF-A levels in kidneys of STZ Induced type 1 diabetic rats.
 38. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*. 2020;**16**(7):377-390. doi: 10.1038/s41581-020-0278-5 pmid: 32398868
 39. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004;**279**(41):42351-42354. doi: 10.1074/jbc.R400019200 pmid: 15258147
 40. Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Yoshiuchi K, et al. Oxidative stress and the JNK pathway are involved in the development of type 1 and type 2 diabetes. *Curr Mol Med*. 2007;**7**(7):674-686. doi: 10.2174/156652407782564408 pmid: 18045145

41. Badalzadeh R, Chodari L, Ghorbanzadeh V. Troxerutin, a bioflavonoid, improves oxidative stress in blood of streptozotocin-induced Type-1 diabetic rats. *Iran J Pharm Sci*. 2017;**13**(2):75-86.
42. Frandsen CS, Dejgaard TF, Madsbad S. Non-insulin drugs to treat hyperglycaemia in type 1 diabetes mellitus. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;**4**(9):766-780. doi: 10.1016/S2213-8587(16)00039-5 pmid: 26969516
43. Mittermayer F, Cavenev E, De Oliveira C, Fleming GA, Gourgiotis L, Puri M, et al. Addressing Unmet Medical Needs in Type 1 Diabetes: A Review of Drugs Under Development. *Curr Diabetes Rev*. 2017;**13**(3):300-314. doi: 10.2174/1573399812666160413115655 pmid: 27071617
44. Modi P. Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol*. 2007;**4**(1):39-47. doi: 10.2174/157016307781115476 pmid: 17630927
45. Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*. 2016;**82**:93-100. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.026 pmid: 25913633
46. Ledford H. Diabetes drugs ride a bumpy road. *Nature*. 2013;**504**(7479):198. doi: 10.1038/504198a pmid: 24336264
47. Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, Devasagayam TP. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;**40**(3):163-173. doi: 10.3164/jcfn.40.163 pmid: 18398493
48. Tsabang N, Ngah N, Estella FT, Agbor GA. Herbal medicine and treatment of diabetes in Africa: case study in Cameroon. *Diabetes Case Rep*. 2016;**1**(112):2.
49. Sundaresan A, Radhiga T, Deivasigamani B. Biological activity of biochanin A: A review. *Asian J Pharm Pharmacol*. 2018;**4**(1):1-5. doi: 10.31024/ajpp.2018.4.1.1
50. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994;**43**(11):1326-1333. doi: 10.2337/diab.43.11.1326 pmid: 7926307
51. Harini R, Ezhumalai M, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2012;**676**(1-3):89-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.051 pmid: 22178203
52. Brahmachari G. Bio-flavonoids with promising anti-diabetic potentials: A critical survey. *Oppor Chall Scope Nat Prod Med Chem - Res Signpost*. 2011;**661**(2):187-212.
53. Ahmed QU, Ali AHM, Mukhtar S, Alsharif MA, Parveen H, Sabere ASM, et al. Medicinal Potential of Isoflavonoids: Polyphenols That May Cure Diabetes. *Molecules*. 2020;**25**(23). doi: 10.3390/molecules25235491 pmid: 33255206
54. Pudhupalayam SP, Uddandhrao VV, Ponnusamy C, Singaravel S, Periyasamy T, Ponnusamy P. Biochanin A Attenuates Hyperglycemia in High-Fat Diet-Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Modulating the Activities of Carbohydrate-Metabolizing Enzymes in Vital Organs. *Rev Bras Farmacogn Springer*. 2022;**32**(4):608-617. doi: 10.1007/s43450-022-00280-8
55. Yu C, Zhang P, Lou L, Wang Y. Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans. *Front Pharmacol*. 2019;**10**:793. doi: 10.3389/fphar.2019.00793 pmid: 31354500
56. Kolb H. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev*. 1997;**13**(3):139-146. doi: 10.1002/(SICI)1099-0895(199709)13:3<139::AID-DMR190>3.0.CO;2-9
57. Niknam MH, Rafinejad A, Amirzargar AA, Khosravi F, Larijani B. Investigating the relationship between interferon gamma gene polymorphism and type 1 diabetes in patients referred to the center Endocrine and metabolism research in the first half of 82. *ijld* [Internet]. 2004;**3**(2):107-111.
58. Afarid M, Heidari M, Assadi M. Serum Levels of Interferon-Gamma in Patients with Diabetic Retinopathy TT. BPUMS [Internet]. The Persian Gulf Nuclear Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. 2019;**22**(2):106-118. doi: 10.29252/ismj.22.2.106
59. von Herrath MG, Oldstone MB. Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*. 1997;**185**(3):531-539. doi: 10.1084/jem.185.3.531 pmid: 9053453
60. Bao ZS, Hong L, Guan Y, Dong XW, Zheng HS, Tan GL, et al. Inhibition of airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by soy isoflavone in a murine model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2011;**11**(8):899-906. doi: 10.1016/j.intimp.2011.02.001 pmid: 21354484
61. Delmastro MM, Piganelli JD. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*. 2011;**2011**:593863. doi: 10.1155/2011/593863 pmid: 21647409
62. Amirshahrokhi K, Zohouri A. Carvedilol prevents pancreatic beta-cell damage and the development of type 1 diabetes in mice by the inhibition of proinflammatory cytokines, NF-kappaB, COX-2, iNOS and oxidative stress. *Cytokine*. 2021;**138**:155394. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155394 pmid: 33310423
63. Yazdanparast R, Ardestani A, Jamshidi S. Experimental diabetes treated with Achillea santolina: effect on pancreatic oxidative parameters. *J Ethnopharmacol*. 2007;**112**(1):13-18. doi: 10.1016/j.jep.2007.01.030 pmid: 17336007
64. El-Alfy AT, Ahmed AA, Fatani AJ. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol Res*. 2005;**52**(3):264-270. doi: 10.1016/j.phrs.2005.04.003 pmid: 15925517
65. Ananthan R, Baskar C, NarmathaBai V, Pari L, Latha M, Ramkumar KM. Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes. *Pharmacol Res*. 2003;**48**(6):551-556. doi: 10.1016/s1043-6618(03)00219-6 pmid: 14527818
66. Yue KK, Chung WS, Leung AW, Cheng CH. Redox changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and aorta, but not in kidneys of diabetic rats. *Life Sci*. 2003;**73**(20):2557-2570. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00662-3 pmid: 12967680
67. Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 2003;**34**(2):186-195. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01195-4 pmid: 12521600
68. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;**36**(1):89-97. doi: 10.1016/s1357-2725(03)00142-0 pmid: 14592535
69. Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 2002;**51**(10):1360-1362. doi: 10.1053/meta.2002.35192 pmid: 12370859
70. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 2004;**346**(2):161-170. doi: 10.1016/j.cccn.2004.03.030 pmid: 15256317
71. Tan JW, Tham CL, Israf DA, Lee SH, Kim MK. Neuroprotective effects of biochanin A against glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells via apoptosis inhibition. *Neurochem Res*. 2013;**38**(3):512-518. doi: 10.1007/s11064-012-0943-6 pmid: 23224778
72. Mishra P, Kale RK, Kar A. Chemoprevention of mammary tumorigenesis and chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in prepubertal Sprague Dawley rats by Biochanin A. *Mol Cell Biochem*. 2008;**312**(1-2):1-9. doi: 10.1007/s11010-008-9714-8 pmid: 18273562
73. Faculty M, Peroxidation L. TJ2033_09.pdf. 2004:211-218.
74. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, et al. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1997;**20**(2):194-197. doi: 10.2337/diacare.20.2.194 pmid: 9118773