







Research Article

Investigating the Therapeutic Effect of P-cymene on Oxidative Stress and mRNA Level of mTOR Gene in Diabetic Rats

Maryam Arabloei Sani ¹ , Zahra Hajebrahimi ^{2,*} , Parichehreh Yaghmae ³ ,
Nasim Hayati Roodbari ⁴ 

¹ Ph.D., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* **Corresponding author:** Zahra Hajebrahimi, Associate Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran. E-mail: hajebrahimi@ari.ac.ir

DOI: [10.61186/jams.26.5.20](https://doi.org/10.61186/jams.26.5.20)

How to Cite this Article:

Arabloei Sani M, Hajebrahimi Z, Yaghmae P, Hayati Roodbari N. Investigating the Therapeutic Effect of P-cymene on Oxidative Stress and mRNA Level of mTOR Gene in Diabetic Rats. *J Arak Uni Med Sci.* 2023;**26**(5):20-26. DOI: 10.61186/jams.26.5.20

Received: 24 Jan 2024

Accepted: 10 Apr 2024

Keywords:

Diabetes

P-cymene

Catalase

Glutathione peroxidase

mTOR

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Diabetes is a type of metabolic disease and one of the most common endocrine diseases. Oxidative stress and inflammation play an important role in the development and progression of diabetes. mTOR signaling pathway play an important role in glucose homeostasis and proliferation of pancreatic beta cells. In the present study, the therapeutic effects of p-cymene on oxidative stress markers and expression of the mTOR gene in diabetic male Wistar rats were investigated.

Methods: Diabetes was induced by injecting 55 mg/kg body weight of streptozotocin. Biochemical analyses of pancreatic tissue and real-time PCR were done to investigate the effects of metformin (55 mg/kg body weight) and p-cymene (25, 50, and 100 mg/kg body weight) on the activities of catalase and glutathione peroxidase enzymes and mTOR gene expression.

Results: Streptozotocin decreased catalase and glutathione peroxidase enzymes and decreased the expression of the mTOR gene in pancreatic tissue. Treatment with metformin or p-cymene improved the activities of catalase and glutathione peroxidase enzymes and the expression of the mTOR gene in a dose-independent manner.

Conclusions: Results indicate that p-cymene has antioxidant properties and can regulate the mTOR signaling pathway. Therefore, p-cymene may be effective for the treatment of diabetes alone or in combination with metformin.

بررسی اثر درمانی p-cymene بر استرس اکسیداتیو و میزان mRNA ژن mTOR در موش های صحرایی دیابتی

مریم عربلوئی ثانی^۱، زهرا حاج ابراهیمی^{۲*}، پرچهره یغمایی^۳، نسیم حیاتی رودباری^۴

^۱ دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲ دانشیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران.

^۳ استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۴ دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: زهرا حاج ابراهیمی، دانشیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران. ایمیل:

hajebrahimi@ari.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.26.5.20

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱

واژگان کلیدی:

دیابت، p-cymene

کاتالاز

گلوکاتیون پراکسیداز، mTOR

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

مقدمه: دیابت نوعی بیماری متابولیکی و یکی از شایعترین بیماری های غدد است. استرس اکسیداتیو و التهاب نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت دیابت دارد. مسیر پیام رسانی mTOR نقش مهمی در هموستاز گلوکز و تکثیر سلول های بنای پانکراس دارد. در مطالعه حاضر، اثرات درمانی p-cymene بر مارکهای استرس اکسیداتیو و بیان ژن mTOR در موش های صحرایی نر نژاد ویستار دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: دیابت با تزریق ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزتوسین القا شد. آنالیزهای بیوشیمیایی بافت پانکراس و ریل تایم PCR برای بررسی اثرات متفورمین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و p-cymene (دوز ۰.۲۵، ۰.۵۰ و ۱.۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز و بیان ژن mTOR انجام شد. **یافته ها:** استرپتوزتوسین موجب کاهش آنزیم های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز و کاهش بیان ژن mTOR در بافت پانکراس شد. تیمار با متفورمین یا p-cymene فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز و بیان ژن mTOR را به روش مستقل از دوز بهبود بخشید.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که p-cymene دارای ویژگی آنتی اکسیداتی است و می تواند مسیر پیام رسانی mTOR را تنظیم کند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که p-cymene برای درمان دیابت به تنهایی یا همراه با متفورمین موثر باشد.

مقدمه

دیابت نوع ۲ که به آن دیابت بزرگسالان نیز گفته می شود، شایع ترین اختلال متابولیک مزمن است (۱) که عمدتاً با غلظت بالای گلوکز در خون مشخص می شود و در نتیجه مقاومت به انسولین و یا ناکافی بودن ترشح انسولین در بافت های محیطی ایجاد می شود. بر اساس گزارش ها، دیابت نوع ۲ بین ۸۷٪ تا ۹۱٪ از کل بیماران دیابتی را تشکیل می دهد. سازمان بهداشت جهانی تخمین می زند که تا سال ۲۰۳۰، ۴۳۹ میلیون نفر به این دیابت مبتلا خواهند شد (۲).

به عنوان یک بیماری چند عاملی، ایجاد دیابت نوع دوم به دلیل ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی مانند چاقی، کمبود فعالیت بدنی، رژیم غذایی ناسالم، استرس، سیگار کشیدن و مصرف الکل می باشد (۳). استرس اکسیداتیو، التهاب و چاقی که متعاقباً می تواند منجر به تولید استرس اکسیداتیو و التهاب شود، نقش مهمی در ایجاد دیابت دارند (۴). همانطور که قبلاً ذکر شد، دیابت نوع ۲ یک اختلال متابولیک مزمن است که در آن میتوکندری به عنوان شایع ترین منبع تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species=ROS) نقش

دیابت نوع ۲ که به آن دیابت بزرگسالان نیز گفته می شود، شایع ترین اختلال متابولیک مزمن است (۱) که عمدتاً با غلظت بالای گلوکز در خون مشخص می شود و در نتیجه مقاومت به انسولین و یا ناکافی بودن ترشح انسولین در بافت های محیطی ایجاد می شود. بر اساس گزارش ها، دیابت نوع ۲ بین ۸۷٪ تا ۹۱٪ از کل بیماران دیابتی را تشکیل می دهد. سازمان بهداشت جهانی تخمین می زند که تا سال ۲۰۳۰، ۴۳۹ میلیون نفر به این دیابت مبتلا خواهند شد (۲).

به عنوان یک بیماری چند عاملی، ایجاد دیابت نوع دوم به دلیل ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی مانند چاقی، کمبود فعالیت بدنی، رژیم غذایی ناسالم، استرس، سیگار کشیدن و مصرف الکل می باشد (۳). استرس اکسیداتیو، التهاب و چاقی که متعاقباً می تواند منجر به تولید استرس اکسیداتیو و التهاب شود، نقش مهمی در ایجاد دیابت دارند (۴). همانطور که قبلاً ذکر شد، دیابت نوع ۲ یک اختلال متابولیک مزمن است که در آن میتوکندری به عنوان شایع ترین منبع تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species=ROS) نقش

کیلوگرم وزن بدن، سیگما، آمریکا)، ۵- کنترل-۵۰ (CS0): حیوانات کنترل + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، ۶- کنترل-۱۰۰ (C100): حیوانات کنترل + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، ۷- دیابت-۲۵ (D25): حیوانات دیابتی + p-cymene (خوراکی، ۴ هفته، ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، ۸- دیابت-۵۰ (D50): حیوانات دیابتی + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، ۹- دیابت-۱۰۰ (D100): حیوانات دیابتی + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).

اندازه گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو

میزان آزمین های کاتالاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز در بافت پانکراس اندازه گیری شد. برای این منظور در پایان هفته چهارم حیوانات با کتامین و زایلانزین (به ترتیب ۰/۸ و ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) بیهوش شدند و بافت پانکراس خارج شد. میزان مارکرهای آنتی اکسیدانسی کاتالاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز به ترتیب توسط کیت های تجاری Nactase™ Catalase و Nagpix™ Glutathione Peroxidase (شرکت نوندسلامت، ارومیه، ایران) و طبق پروتکل شرکت سازنده اندازه گیری شد. برای این منظور، پس از شستشوی بافت با بافر فسفات نمکی (-Phosphate buffered saline= PBS) سرد، بافت توسط محلول لیز کننده موجود در کیت لیز و هموژن شد. سپس در دور ۸۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه دقیق برای سنجش کاتالاز و در دور ۹۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه برای سنجش گلوکاتاتیون پراکسیداز و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای سنجش کاتالاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز، جذب نوری محلول رویی پس از اضافه شدن محلول ها طبق پروتکل شرکت سازنده کیت به ترتیب در طول موج ۵۵۰ و ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه گیری بیان ژن mTOR

RNA کل از نمونه های پانکراس با استفاده از محلول تریزول (TRIZol) (شرکت کبازیس، همدان، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا بررسی بیشتر در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. غلظت RNA با استفاده از نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, USA) اندازه گیری شد و خلوص آن با اسپکتروفتومتری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. تایید یکپارچگی RNA ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ شناسایی شد. به منظور حذف DNA ژنومی، RNA استخراج شده با DNAaseI عاری از RNAase (Thermo Fisher Scientific, RNAase Easy™) cDNA (MA تیمار شد. با استفاده از کیت سنتز cDNA (cDNA Synthesis Kit, Biosystems) بیوتکنولوژی پارس توس، تهران، ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. برای سنجش بیان ژن mTOR برای هر نمونه نسبت به گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل داخلی، ریل تایم PCR کمی انجام شد. واکنش PCR با استفاده از سایبرگرین (Addbio، کره) و براساس دستورالعمل سازنده انجام شد. ژن mTOR در واکنش های دوتایی با استفاده از دستگاه ریل تایم (Applied StepOnePlus, Biosystems، آمریکا) و با استفاده از پرایمرهای ژنی با توالی زیر تکثیر شدند: پرایمر فوروارد 5'

است که چاقی و مصرف کالری زیاد، موجب فعال شدن mTOR بافت های مختلف جزایر لانگرهانس می شود (۶). در واقع mTOR تنظیم کننده اصلی سیگنال های انسولین و گلوکز است که در مسیرهای متابولیک حیاتی است.

انواع مختلفی از داروهای دیابت وجود دارد ولی اکثر این داروها کارایی محدود دارند و منجر به عوارض جانبی نامطلوب می شوند. بنابراین، نیاز به یافتن داروهای جدید با سمیت کم و تاثیر بیشتر به ویژه در درمان های طولانی مدت وجود دارد. در دهه های اخیر، استفاده از داروهای گیاهی به دلیل حداقل سمیت، دسترسی آسان، مقرون به صرفه بودن و استفاده آسان، برای درمان بسیاری از بیماری ها به عنوان جایگزین مناسبی برای عوامل شیمیایی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. در این راستا، نتایج چندین مطالعه نشان داده اند که بسیاری از مونوترپن ها دارای خواص آنتی اکسیدانسی و ضد التهابی هستند و در کاهش قند و چربی خون موثرند (۷-۱۰). مونوترپن ها متعلق به گروه ترپنوئیدها و از متابولیت های ثانویه گیاهی هستند. P-cymene یک مونوترپن آلی معطر است که از بیش از ۱۰۰ گیاه دارویی مختلف جدا شده است و دارای خواص آنتی اکسیدانسی، ضد التهابی، ضد درد، ضد اضطراب، ضد سرطان و ضد میکروبی می باشد (۱۱، ۱۲). با توجه به توضیحات فوق، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات p-cymene بر پیشگیری و درمان دیابت نوع ۲ در مدل موش دیابتی انجام شد.

روش کار

برای این مطالعه از تعداد ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. این حیوانات از حیوانخانه آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، موش ها به مدت دو هفته در آزمایشگاه رازی با شرایط محیطی سازگار شدند. موش ها به تعداد ۴ عدد در هر قفس و تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد با دمای کنترل شده (۲۵±۱) درجه سانتی گراد، شرایط رطوبت (۵۰±۱۵)٪، چرخه نور-تاریکی ۱۲ ساعته (خاموش شدن چراغ ها بین ساعت ۶:۰۰ بعد از ظهر تا ۶:۰۰ صبح) و تهویه هوای خوب (۱۵ الی ۱۵ بار در ساعت) نگهداری شدند. در طول آزمایش، موش ها برای خوردن و نوشیدن آزاد بودند. دیابت در موش ها با تزریق داخل صفاقی ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) حل شده در بافر سیترات سدیم ۰/۱ مولار در pH ۴/۵ القا شد. یک هفته پس از تزریق STZ، نمونه خون از ورید دم گرفته شد و مقادیر سطح گلوکز با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Cera pet، کره جنوبی) اندازه گیری شد. موش هایی با سطح گلوکز خون بالاتر از ۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر دیابتی در نظر گرفته شدند.

حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه (۶ موش در هر گروه) تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل (C): حیوانات با رژیم غذایی استاندارد و آب به صورت آزاد و بدون دریافت هیچ درمان، ۲- گروه شم (D) یا موش های دیابتی: تزریق درون صفاقی ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین، ۳- گروه متفورمین (Met): حیوانات دیابتی + متفورمین (خوراکی، ۴ هفته، ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، شرکت داروسازی Osve، ایران) دریافت کردند، ۴- کنترل-۲۵ (C25): حیوانات کنترل + p-cymene (خوراکی، ۴ هفته، ۲۵ میلی گرم بر

اندازه گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو

اثرات دیابت و p-cymene بر روی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی از جمله کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در تمام گروه های حیوانی بررسی شد (نمودار ۱). تیمار با استرپتوزوتوسین به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بافت پانکراس حیوانات دیابتی یا شم (D) را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد ($P \leq 0.01$). فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بافت پانکراس حیوانات دیابتی به ترتیب به میزان ۵۶٪ و ۲۳/۲۴٪ کاهش یافت. تیمار با متفورمین یا p-cymene منجر به جبران تغییرات ناشی از استرپتوزوتوسین گردید. تیمار با متفورمین یا p-cymene باعث افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بافت پانکراس در گروه های متفورمین، دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با گروه دیابتی یا شم شد ($P \leq 0.05$). تفاوتی بین گروه های دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). تیمار با p-cymene هیچ تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در حیوانات گروه های شاهد (گروه های کنترل-۲۵، کنترل-۵۰ و کنترل-۱۰۰) نداشت.

بیان ژن mTOR

واکنش ریل تایم PCR برای ارزیابی هرگونه تغییر در بیان ژن mTOR انجام شد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود تیمار با استرپتوزوتوسین به طور قابل توجهی سطح بیان mTOR را در گروه شم یا دیابتی در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد ($P \leq 0.05$). تیمار با متفورمین یا p-cymene با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سطح بیان این ژن را در گروه های متفورمین و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با حیوانات دیابتی افزایش داد ($P \leq 0.05$). تیمار با p-cymene هیچ تأثیر معنی داری بر بیان ژن mTOR در گروه های دیابت-۲۵ و دیابت-۵۰ در مقایسه با حیوانات شم نداشت ($P \geq 0.05$). تجویز p-cymene همچنین بیان ژن mTOR را در گروه کنترل-۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش داد ($P \leq 0.05$).

3' TGATTTTGGGAGAACAGAAGATGA و
ریورس 5' GAGGTAACAGGATGGTGGAGTG 3'
ژن mTOR و پرایمر فوروارد
3' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 5' و ریورس
3' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 5' برای ژن
GAPDH. تمامی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) سنتز
شدند. واکنش PCR دو مرحله ای با سیکل های حرارتی به صورت زیر
تنظیم شد: ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان زمان
واسرشت آغازی؛ ۴۰ چرخه تکثیر با واسرشت در ۹۵ درجه سانتیگراد
به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت
۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه.
جهت اطمینان از اختصاصی بودن محصولات PCR، منحنی های ذوب
در دماهای بین ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتیگراد به صورت مرحله اول ۹۵
درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله دوم در دمای ۶۵ درجه
سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه تهیه شد. بیان ژن ها با صورت نسبی و با
استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. تمام آنالیزها سه بار تکرار شد.

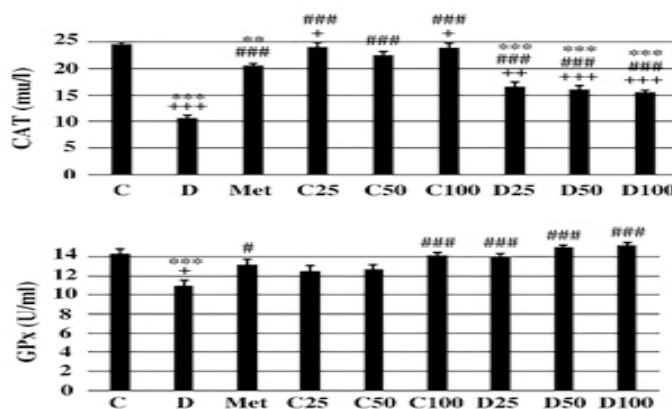
ملاحظات اخلاقی

تمام پروتکل های آزمایشی مطابق با دستورالعمل های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی وابسته به دانشگاه علوم و تحقیقات، با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1396.168 انجام شد.

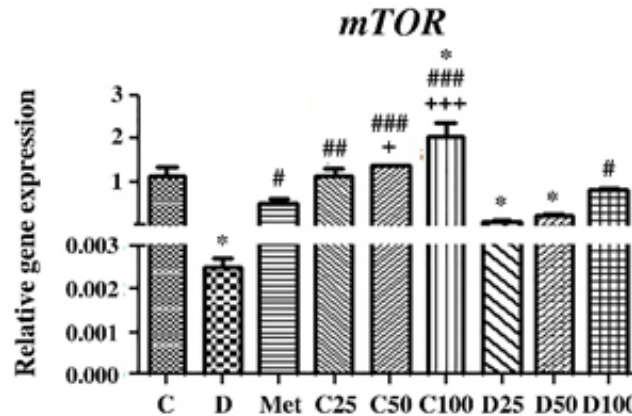
آنالیز آماری

داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای مقایسه بین گروه ها ارائه شده است. نرمال بودن داده ها و همگنی واریانس ها توسط آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) و آزمون لوین (Levene) مشخص شد. تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ورژن ۲۰۱۰ ترسیم شدند. $P \leq 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها



نمودار ۱. میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بافت پانکراس در موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. علامت های ستاره، مربع و به اضافه به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل، گروه دیابت و گروه متفورمین می باشد. یک، دو و سه علامت به ترتیب سطح معنی داری $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ را نشان می دهد.



نمودار ۲. بیان ژن mTOR در موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. علامت های ستاره، مربع و به اضافه به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل، گروه شم و گروه متفورمین می باشد. یک، دو و سه علامت به ترتیب سطح معنی داری $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ را نشان می دهد.

نشانه های استرس اکسیداتیو شناخته می شوند. کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات زنده یافت می شود. این آنزیم در برخی از ارگان های بدن یافت می شود. آنزیم کاتالاز از ریبوزوم های آزاد درون سیتوزول ساخته می شود. این آنزیم آب اکسیژنه را به اکسیژن و آب تجزیه می کند (۱۵). نقش زیستی گلوکاتایون پراکسیداز محافظت از لیپیدهای غشای پلاسما در برابر اکسیداسیون با کاهش پراکسیدهای لیپیدی توسط گلوکاتایون است (۱۶). همچنین پراکسید هیدروژن را توسط گلوکاتایون به آب کاهش می دهد (۱۶). در مطالعه حاضر، تیمار با استرپتوزوتوسین میزان آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز را در بافت پانکراس کاهش داد که نشان دهنده افزایش استرس اکسیداتیو است. گزارشات زیادی وجود دارد که بیان می کنند که استرس اکسیداتیو نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت دیابت دارد (۱۷).

تیمار حیوانات با استرپتوزوتوسین همچنین سطح بیان ژن mTOR را در گروه دیابتی کاهش داد. مسیرهای پیام رسانی PI3K-AKT-mTOR نقش مهمی در هموستاز گلوکز دارند. مسیر PI3K/Akt/mTOR در تنظیم انتقال پیام های سلولی و بسیاری از مکانیسم های سلولی از جمله بقا، تکثیر، رشد، متابولیسم، رگزایی و متاستاز در شرایط طبیعی و پاتولوژیک بسیار مهم است. اختلال در این مسیر با بسیاری از اختلالات انسانی از جمله دیابت مرتبط است (۱۸). در مطالعه حاضر، بیان ژن mTOR در بافت های پانکراس حیوانات دیابتی کاهش یافت که مطابق با نتایج Bathina و Das در سال ۲۰۱۸ است. Bathina و Das تغییر در مسیر PI3K/Akt/mTOR را در مغز موش های دیابتی نوع ۲ ناشی از استرپتوزوتوسین بررسی کردند. آنها نشان دادند که به دنبال تیمار با استرپتوزوتوسین، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول های بتای پانکراس افزایش می یابد. آنها همچنین نشان دادند که استرپتوزوتوسین می تواند بیان mTOR فسفریله شده را در حیوانات تحت تیمار کاهش دهد (۱۹). بنابراین، استرپتوزوتوسین ممکن است از طریق اختلال در تنظیم مسیر PI3K/Akt/mTOR، که متعاقباً با فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک دیابت و عوارض آن مرتبط است، انتقال سیگنال را مسدود کند. فعال سازی mTOR برای تنظیم چرخه سلولی و تکثیر سلول های β در جزایر پانکراس ضروری است و یک تنظیم کننده اصلی سیگنال های انسولین و گلوکز است که برای مسیرهای متابولیک حیاتی است (۲۰).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که p-cymene می تواند برخی از ویژگی های پاتوفیزیولوژیک را در مدل دیابت موش صحرایی نژاد ویستار بهبود بخشد. تیمار با این ترکیب موجب کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود وضعیت بیان ژن mTOR در حیوانات دیابتی گردید.

برای ایجاد مدل تجربی دیابت از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین استفاده شد. بسیاری از مطالعات از استرپتوزوتوسین برای القای مدل دیابت در حیوانات استفاده کرده اند. در این مدل، استرپتوزوتوسین موجب نکروز سلول های بتای پانکراس می شود که نتیجه این امر کاهش ترشح انسولین و افزایش قند خون در حیوانات تیمار شده می باشد. استرپتوزوتوسین یک ترکیب ضد میکروبی است که از باکتری Streptomyces achromogens استخراج می شود و به طور انتخابی به سلول های B در جزایر پانکراس آسیب می زند (۱۳). استرپتوزوتوسین از نظر ساختاری شبیه مولکول گلوکز است بنابراین می تواند به گیرنده انتقال گلوکز ۲ (GLUT2) متصل شود و وارد سلول شود. سلول های بتای پانکراس غنی از گیرنده های GLUT2 هستند، بنابراین این سلول ها یک هدف خاص برای استرپتوزوتوسین هستند (۱۳).

در مطالعه حاضر، تیمار با استرپتوزوتوسین باعث افزایش استرس اکسیداتیو در موش های تحت درمان شد. این داده ها با نتایج Raza و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد (۱۴). نتایج آنها نشان داده است که استرپتوزوتوسین موجب مهار آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز میتوکندری می شود که این امر منجر به کاهش ظرفیت آنتی اکسیداتیو گلوکاتایون و در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو در رده سلول های HepG2 (رده سلولی کبدی انسانی) می شود. تیمار سلول های HepG2 با استرپتوزوتوسین باعث تولید هر دوی گونه های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species=ROS) و گونه های نیتروژن فعال (Reactive Nitrogen Species=RNS) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می شود (۱۴). در مطالعه حاضر، تیمار حیوانات با استرپتوزوتوسین موجب کاهش آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز و در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو شد. کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز آنزیم های آنتی اکسیداتیو اصلی هستند که به عنوان

ژن mTOR را در گروه دیابت-۱۰۰ افزایش داد ولی تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن mTOR در گروه‌های دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ نداشت. همانطور که قبلاً ذکر شد، مسیره‌های سیگنالینگ PI3K-AKT-mTOR هموستاز گلوکز را تنظیم می‌کند (۲۰، ۲۱). بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که p-cymene ممکن است میزان گلوکز و انسولین را از طریق افزایش بیان mTOR اصلاح کند، که بیشتر پتانسیل ضد دیابتی p-cymene را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، داده‌های ما نشان داد که تیمار با استرپتوزوتوسین می‌تواند عوارض پاتولوژیک دیابت را در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار القا کند و منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش بیان ژن mTOR گردد. تیمار با P-cymene موجب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش بیان ژن mTOR شد. بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالاً p-cymene از طریق تنظیم بیان mTOR در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیداتیو را اعمال می‌کند. بنابراین، می‌توان گفت که کنترل و تنظیم مسیر پیام‌رسانی AKT/mTOR ممکن است یک استراتژی درمانی مهم برای دیابت باشد.

حامی مالی

این مطالعه حاصل رساله دکتری تخصصی رشته فیزیولوژی است که بخشی از آن با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گرفته است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند و معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهاد‌های کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) را داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

- Madani SM, Salemi Z, Mohaghegh P, Rezvanfar MR. Evaluation of Fetuun-A level in serum of type 2 diabetic patients and its relationship with retinopathy and nephropathy. [Persian]. *J Arak Uni Med Sci*. 2022;25(5):49-60.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843 pmid: 31518657
- Tremblay J, Hamet P. Environmental and genetic contributions to diabetes. *Metabolism*. 2019;100S:153952. doi: 10.1016/j.metabol.2019.153952 pmid: 31610851
- Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2019;11(3):45-63.
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004 pmid: 28283069
- Yuan T, Rafizadeh S, Gorrepati KD, Lupse B, Oberholzer J, Maedler K, et al. Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(4):668-678. doi: 10.1007/s00125-016-4188-9 pmid: 28004151
- Ahmed AJ, Majeed SR, Obaid HM. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Sys Rev Pharm*. 2020;11(1):850-860.
- Baddar NW, Aburjai TA, Taha MO, Disi AM. Thujone corrects cholesterol and triglyceride profiles in diabetic rat model. *Nat Prod Res*. 2011;25(12):1180-1184. doi: 10.1080/14786419.2010.496116 pmid: 21740283
- Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Aguirre-Garcia F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res*. 2002;16(4):383-386. doi: 10.1002/ptr.914 pmid: 12112298
- Kong P, Chi R, Zhang L, Wang N, Lu Y. Effects of paeoniflorin on tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance and changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Fitoterapia*. 2013;91:44-50. doi: 10.1016/j.fitote.2013.08.010 pmid: 23978582
- de Oliveira TM, de Carvalho RB, da Costa IH, de Oliveira GA, de Souza AA, de Lima SG, et al. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Biol*. 2015;53(3):423-428. doi: 10.3109/13880209.2014.923003 pmid: 25471840
- Quintans-Junior L, Moreira JC, Pasquali MA, Rabie SM, Pires AS, Schroder R, et al. Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl

- Acetate in Experimental Models. *ISRN Toxicol.* 2013;**2013**:459530. doi: 10.1155/2013/459530 pmid: 23724298
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;**51**(2):216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7 pmid: 18087688
 14. Raza H, John A. Streptozotocin-induced cytotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Mol Sci.* 2012;**13**(5):5751-5767. doi: 10.3390/ijms13055751 pmid: 22754329
 15. Demirci-Cekic S, Ozkan G, Avan AN, Uzunboy S, Capanoglu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;**209**:114477. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114477 pmid: 34920302
 16. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. *Front Pharmacol.* 2023;**14**:1147414. doi: 10.3389/fphar.2023.1147414 pmid: 36937839
 17. Bhatti JS, Sehrawat A, Mishra J, Sidhu IS, Navik U, Khullar N, et al. Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radic Biol Med.* 2022;**184**:114-134. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.019 pmid: 35398495
 18. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci.* 2018;**14**(11):1483-1496. doi: 10.7150/ijbs.27173 pmid: 30263000
 19. Bathina S, Das UN. Dysregulation of PI3K-Akt-mTOR pathway in brain of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2018;**17**(1):168. doi: 10.1186/s12944-018-0809-2 pmid: 30041644
 20. Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, et al. mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem.* 2009;**284**(12):7832-7842. doi: 10.1074/jbc.M807458200 pmid: 19144649
 21. Stamateris RE, Sharma RB, Kong Y, Ebrahimpour P, Panday D, Ranganath P, et al. Glucose Induces Mouse beta-Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor. *Diabetes.* 2016;**65**(4):981-995. doi: 10.2337/db15-0529 pmid: 26740601
 22. Rong Y, McPhee CK, Deng S, Huang L, Chen L, Liu M, et al. Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;**108**(19):7826-7831. doi: 10.1073/pnas.1013800108 pmid: 21518918
 23. Maruthur NM, Tseng E, Hutflless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z, et al. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2016;**164**(11):740-751. doi: 10.7326/M15-2650 pmid: 27088241