Archive of SID.ir

Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 26, Issue 5
December & January 2023-2024

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

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.

PROOF

Copyright ©2024 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره ۲۶، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

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

مریم عربلوئی ثانی [۱]، زهرا حاج ابراهیمی [۲*]، پریچهره 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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱
واژگان کلیدی:
دیابت، p-cymene
کاتالاز
گلوتاتیون پراکسیداز، mTOR

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

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 بتای پانکراس دارد. در مطالعه حاضر، اثرات درمانی p-cymene بر مارکرهای 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 استرپتوزوتوسین القا شد. آنالیزهای بیوشیمیایی بافت پانکراس و ریل تایم PCR برای بررسی اثرات متفورمین (۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و p-cymene (دوز ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و بیان ژن mTOR انجام شد.

یافته‌ها: استرپتوزوتوسین موجب کاهش آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش بیان ژن mTOR در بافت پانکراس شد. تیمار با متفورمین یا p-cymene فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون 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 اکسیدانتی است و می تواند مسیر پیام رسان 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 ویا 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 قبلا 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 کلیدی دارد. ارتباط مهمی بین سطوح بالای گلوکز در خون و القای استرس اکسیداتیو و التهاب از یک طرف و ایجاد مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ و عوارض آن از سوی دیگر وجود دارد. قند بالای خون تولید ROS را تحریک می کند، افزایش استرس اکسیداتیو باعث التهاب می شود و التهاب به نوبه خود باعث افزایش تولید ROS می شود (۴). بنابراین، یک استراتژی برای درمان دیابت نوع ۲ کنترل تولید ROS و استفاده از داروهایی است که مقاومت به انسولین را بهبود می بخشد.

پروتئین mTOR (mammalian target of rapamycinis) یک سرین/ترئونین پروتئین کیناز و متعلق به خانواده کینازهای مرتبط با فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز(PI3K) است. این پروتئین توسط گلوکز، اسید آمینه و فاکتورهای رشد تنظیم می شود و نقش مهمی در تنظیم رشد سلول، تکثیر سلولی، بقای سلولی، سنتز پروتئین و متابولیسم لیپیدها و گلوکز ایفا می کند (۵). بی نظمی در سیگنال دهی mTOR در چندین بیماری مانند چاقی، دیابت نوع ۲، سرطان و اختلالات عصبی گزارش شده است (۵). مطالعات تجربی نشان داده

Copyright © 2024 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

است که چاقی و مصرف کالری زیاد، موجب فعال شدن mTOR در بافت‌های مختلف جزایر لانگرهانس می شود (۶). درواقع 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 اکسیدانتی 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 اکسیدانتی، 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 ۲۰۰±۲۰ گرم استفاده شد. این حیوانات از حیوانخانه آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، موش‌ها به مدت دو هفته در آزمایشگاه رازی با شرایط محیطی سازگار شدند. موش‌ها به تعداد ۴ عدد در هر قفس و تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد با دمای کنترل شده (۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد)، شرایط رطوبت (۱۵٪±۵۰)، چرخه نور-تاریکی ۱۲ ساعته (خاموش شدن چراغها بین ساعت ۶:۰۰ بعد از ظهر تا ۶:۰۰ صبح)، و تهویه هوای خوب (۸الی۱۵ بار در ساعت) نگهداری شدند. در طول آزمایش، موش ها برای خوردن و نوشیدن آزاد بودند. دیابت در موش‌ها با تزریق داخل صفاقی ۵۵ میلی‌گرم 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 کیلوگرم وزن بدن، سیگما، آمریکا)، ۵- کنترل-۵۰ (C50): 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 آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت پانکراس اندازه گیری شد. برای این منظور در پایان هفته چهارم حیوانات با کتامین و زایلازین (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 اکسیدانتی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به ترتیب توسط کیت‌های تجاری NactaseTM Catalase و NagpixTMGlutathione 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 برای سنجش کاتالاز و در دور ۹۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه برای سنجش گلوتاتیون پراکسیداز و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی تا زمان استفاده در دمای ۴درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای سنجش کاتالاز و گلوتاتیون 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 نمونه‌های پانکراس با استفاده از محلول ترایزول (TRIZol) (شرکت کیازیست، همدان، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا بررسی بیشتر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد 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, MA) تیمار شد. CDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Easy™ cDNA Synthesis Kit، 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 PCRکمی انجام شد. واکنش PCR با استفاده از سایبرگرین (Addbio، کره) و براساس دستورالعمل سازنده انجام شد. ژن mTOR در واکنش‌های دوتایی با استفاده از دستگاه ریل تایم StepOnePlus (Applied Biosystems ، آمریکا) و با استفاده از پرایمرهای ژنی با توالی زیر تکثیر شدند: پرایمر فوروارد 5′

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

TGATTTTGGGAGAACAGAAGATGA 3′ و ریورس 5′GAGGTAACAGGATGGTGGAGTG 3′ برای ژن mTOR و پرایمر فوروارد 5′AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3′ و ریورس 5′TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3′ برای ژن GAPDH. تمامی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) سنتز شدند. واکنش PCR دومرحله 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 پژوهش‌های 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± انحراف معیار و با استفاده از 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.

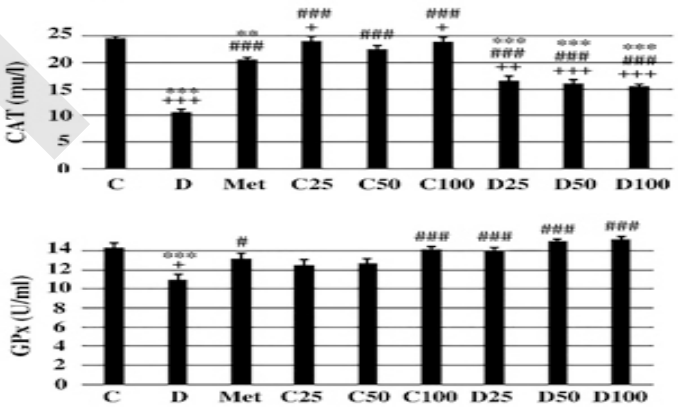
یافته ها

اندازه گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو

اثرات دیابت و p-cymene بر روی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی از جمله کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون 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 گلوتاتیون پراکسیداز در بافت پانکراس حیوانات دیابتی یا شم (D) را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد($P\leq ۰/۰۰۱$). فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون 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 گلوتاتیون پراکسیداز در بافت پانکراس در گروه‌های متفورمین، دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با گروه دیابتی یا شم شد($P\leq ۰/۰۵$). تفاوتی بین گروه‌های دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ مشاهده نشد($P\geq ۰/۰۵$). تیمار با p-cymene هیچ تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در حیوانات گروه های شاهد (گروه‌های کنترل-۲۵، کنترل-۵۰ و کنترل ۱۰۰) نداشت.

بیان ژن mTOR

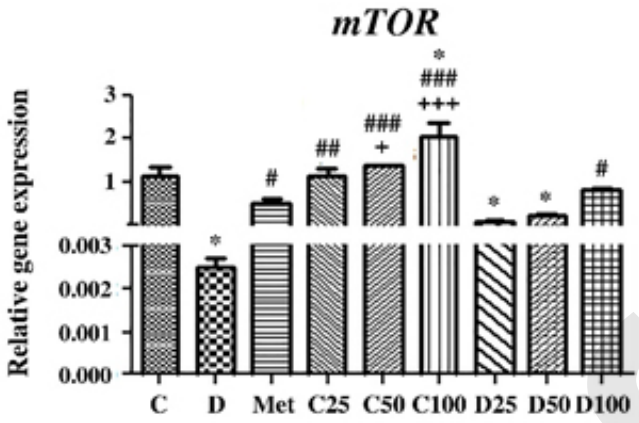
واکنش ریل تایم PCR برای ارزیابی هرگونه تغییر در بیان ژن mTOR انجام شد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود تیمار با استرپتوزوتوسین به طور قابل توجهی سطح بیان mTOR را در گروه شم یا دیابتی در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد($P\leq ۰/۰۵$). تیمار با متفورمین یا p-cymene با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سطح بیان این ژن را در گروه‌های متفورمین و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با حیوانات دیابتی افزایش داد ($P\leq ۰/۰۵$). تیمار با p-cymene هیچ تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن mTOR در گروه‌های دیابت-۲۵ و دیابت-۵۰ در مقایسه با حیوانات شم نداشت ($P\geq ۰/۰۵$). تجویز p-cymene همچنین بیان ژن mTOR را در گروه کنترل-۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل‌توجهی افزایش داد($P\leq ۰/۰۵$).



نمودار ۱. میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت پانکراس در موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل. مقادیر به صورت میانگین ± 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.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



نمودار ۲. بیان ژن mTOR در موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل. مقادیر به صورت میانگین ± 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≤0.05، P≤0.01 و P≤0.001 را نشان می دهد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که p-cymene می تواند برخی از ویژگی‌های 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 موش‌های تحت درمان شد. این داده ها با نتایج Raza و همکارانش در سال ۲۰۱۲مطابقت دارد (۱۴). نتایج آنها نشان داده است که استرپتوزوتوسین موجب مهار آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز میتوکندری می شود که این امر منجر به کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی گلوتاتیون و در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو در رده سلول های HepG2 (رده سلولی کبدی انسانی) می شود. تیمار سلول‌های HepG2 با استرپتوزوتوسین باعث تولید هر دوی گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species=ROS) و گونه‌های 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 گلوتاتیون پراکسیداز و درنتیجه افزایش استرس اکسیداتیو شد. کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم های آنتی اکسیدانتی اصلی هستند که به عنوان نشانگرهای استرس اکسیداتیو شناخته می شوند. کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات زنده یافت می‌شود. این آنزیم در برخی از ارگان‌های بدن یافت می‌شود. آنزیم کاتالاز از ریبوزوم‌های آزاد درون سیتوزول ساخته می‌شود. این آنزیم آب اکسیژنه را به اکسیژن و آب تجزیه می‌کند (۱۵). نقش زیستی گلوتاتیون پراکسیداز محافظت از لیپیدهای غشای پلاسما در برابر اکسیداسیون با کاهش پراکسیدهای لیپیدی توسط گلوتاتیون است (۱۶). همچنین پراکسید هیدروژن را توسط گلوتاتیون به آب کاهش می دهد (۱۶). در مطالعه حاضر، تیمار با استرپتوزوتوسین میزان آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در بافت پانکراس کاهش داد که نشان‌دهنده 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 مکانیسم‌های 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 بافت‌های 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 موش‌های 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،

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۲۱). بنابراین، کاهش بیان mTOR در مطالعه حاضر نقش مسیرهای سیگنالینگ AKT-mTOR را در هموستاز گلوکز و ایجاد دیابت تایید می کند.

ارتباط پیچیده ای بین مسیرهای سیگنالینگ AKT-mTOR و استرس اکسیداتیو وجود دارد زیرا مسیرهای سیگنالینگ AKT-mTOR نه تنها بر استرس اکسیداتیو و تولید ROS تأثیر می گذارد، بلکه خود نیز توسط استرس اکسیداتیو تنظیم می شود (۲۲). در مطالعه حاضر تغییر در هر دوی بیان ژن mTOR و تغییر در استرس اکسیداتیو تاییدی بر این ارتباط می باشد.

در مطالعه حاضر همچنین به بررسی اثرات p-cymene بر درمان دیابت در مدل دیابتی موش صحرایی پرداختیم و اثرات آن را با متفورمین مقایسه کردیم. ماده P-cymene یک مونوترپن آلی معطر جدا شده از بیش از ۱۰۰ گیاه دارویی مختلف است که متعلق به گیاهان جنس Thymusمی باشد. طیف گسترده ای از خواص دارویی p-cymene از جمله اثرات آنتی اکسیدانتی، ضد التهابی، ضد درد، ضد اضطراب، ضد سرطان و اثرات ضد میکروبی ثابت شده است (۱۰, ۱۱). متفورمین اولین و متداولترین دارو برای کنترل قند خون بالا در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ است. این دارو مقدار گلوکز جذب شده از غذا و میزان گلوکز تولید شده توسط کبد را کاهش می دهد. همچنین پاسخ بدن به انسولین را افزایش می دهد (۲۳). تیمار با p-cymene در مطالعه حاضر، عوارض جانبی ناشی از استرپتوزوتوسین را بهبود بخشید. تیمار با p-cymene موجب بهبود وضعیت استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی گردید و فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در موش‌های دیابتی تحت درمان با p-cymene مستقل از دوز دارو افزایش داد که تایید کننده اثرات آنتی‌اکسیدانتی p-cymene می باشد. افزایش دوز p-cymene هیچ تاثیری در بهبود وضعیت استرس اکسیداتیو نداشت.

علاوه بر استرس اکسیداتیو، اثرات درمانی مفید p-cymene بر بیان ژن mTOR نیز در موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. تیمار با p-cymene با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سطح بیان 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 قبلا ذکر شد، مسیرهای سیگنالینگ PI3K-AKT-mTOR هموستاز گلوکز را تنظیم می کند (۲۰, ۲۱). بنابراین، می توان پیشنهاد داد که p-cymene ممکن است میزان گلوکز و انسولین را ازطریق افزایش بیان mTOR اصلاح کند، که بیشتر پتانسیل ضد دیابتی p-cymene را تایید می کند.

نتیجه گیری

به طور خلاصه، داده های ما نشان داد که تیمار با استرپتوزوتوسین می تواند عوارض پاتولوژیک دیابت را در موش های 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، می توان پیشنهاد کرد که احتمالا p-cymene از طریق تنظیم بیان mTOR در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین در موش های صحرایی، فعالیت های آنتی اکسیدانتی را اعمال می کند. بنابراین، می توان گفت که کنترل و تنظیم مسیر پیام رسانی AKT/mTOR ممکن است یک استراتژی درمانی مهم برای دیابت باشد.

حامی مالی

ایـــن 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 آماده سازی این مقاله مشارکت داشته اند و معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادهای کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) را داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

1. Madani SM, Salemi Z, Mohaghegh P, Rezvanfar MR. Evaluation of Fetuin-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.
2. 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
3. Tremblay J, Hamet P. Environmental and genetic contributions to diabetes. *Metabolism.* 2019;**100S**:153952. **doi:** 10.1016/j.metabol.2019.153952 **pmid:** 31610851
4. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019;**11**(3):45-63.
5. 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
6. 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
7. Ahmed AJ, Majeed SR, Obaid HM. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Sys Rev Pharm.* 2020;**11**(1):850-860.
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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 redoxidation. *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, Hutfless 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

Proof

Archive of SID.ir