

## The Effect of P-Cymene on Glucose, Insulin, Antioxidant Power, and the Level of AKT Gene mRNA in Streptozotocin-Induced Diabetes Model in Male Wistar Rats

Maryam Arabloei Sani<sup>1</sup>, Zahra Hajebrahimi<sup>2</sup>, Parichehreh Yaghmaei<sup>3</sup>, Nasim Hayati Roodbari<sup>4</sup>

1. Ph.D., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2479-5034

2. Associate Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-21-88366030, Email: hajebrahimi@ari.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-9211-5953

3. Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9888-6935

4. Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5942-5770

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Diabetes is a main metabolic disorder in middle-aged and older people. Oxidative stress can interfere with insulin signaling and are directly relevant to the incidence of diabetes. The AKT signaling pathways plays a critical role in regulating glucose homeostasis and proliferation of  $\beta$  cells. P-cymene is an aromatic monoterpene with antioxidant and anti-inflammatory properties. In the present study, the therapeutic effects of p-cymene on blood glucose and insulin levels, the antioxidant power of serum (FRAP assay) and the expression of *AKT* mRNAs in streptozotocin-induced diabetic rats were investigated.

**Materials and Methods:** Diabetes was induced using the injection of 55 mg/kg streptozotocin in male Wistar rats. Histological, biochemical, and real-time PCR analyses were done to study the effects of metformin (55 mg/kg) and p-cymene (25, 50, and 100 mg/kg) on levels of glucose, insulin, oxidative stress status, and the expression of *AKT* mRNA.

**Results:** Streptozotocin increased serum levels of glucose and decreased serum levels of insulin, the antioxidant power of serum, pancreas levels of *AKT* mRNA, and  $\beta$  island size. Administration of metformin or p-cymene improved the levels of glucose, insulin, *AKT* mRNA,  $\beta$  island size, and antioxidant power in an independent manner of dose.

**Conclusion:** These results suggest that p-cymene has hypoglycemic, hyperinsulinemia, and antioxidant properties. It can regulate Akt signaling pathway. Therefore, it may be suggested for the diabetes therapy alone or in combination with metformin.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, P-Cymene, Oxidative Stress, *AKT*

**Received:** Jan 17,2024

**Accepted:** May 26,2024

**How to cite the article:** Maryam Arabloei Sani, Zahra Hajebrahimi, Parichehreh Yaghmaei, Nasim Hayati Roodbari. The Effect of P-Cymene on Glucose, Insulin, Antioxidant Power, and the Level of AKT Gene mRNA in Streptozotocin-Induced Diabetes Model in Male Wistar Rats. 2024;29(5):25-36

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## تأثیر پارا-سایمن بر روی گلوکز، انسولین، ظرفیت آنتی اکسیدانی و میزان mRNA ژن AKT در مدل دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین در موش های نر نژاد ویستار

مریم عربلوئی نانی<sup>۱</sup>، زهرا حاج ابراهیمی<sup>۲</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۳</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۴</sup>

۱. دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۵۰۳۴-۲۴۷۹-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۲. دانشیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران. پست الکترونیک: hajebrahimi@ari.ac.ir ، تلفن: ۰۲۱-۸۸۳۶۶۰۳۰ ، کد ارکید:

۵۹۵۳-۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۲۱۱

۳. استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۶۹۳۵-۹۸۸۸-۰۰۰۰-۰۰۰۱

۴. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۵۷۷۰-۵۹۴۲-۰۰۰۰-۰۰۰۲

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت یک اختلال متابولیکی مهم است و استرس اکسیداتیو می تواند با مسیر سیگنال دهی انسولین تداخل داشته باشد و یا به طور مستقیم با پاتوژنز دیابت مرتبط باشد. مسیرهای سیگنالینگ AKT نقش مهمی در تنظیم هموستاز گلوکز و تکثیر سلول های بتا دارد. پارا-سایمن یک مونوتروپن معطر با خواص آنتی اکسیدانی و آنتی التهابی می باشد. در مطالعه حاضر، اثرات درمانی پارا-سایمن بر سطح گلوکز و انسولین خون، ظرفیت آنتی اکسیدانی و میزان mRNA ژن AKT در موش های صحرایی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** دیابت با تزریق ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار القا شد. آنالیزهای بافت شناسی، بیوشیمیایی و Real-time PCR برای بررسی اثرات متفورمین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و پارا-سایمن (دوز ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر میزان گلوکز، انسولین، ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیان mRNA ژن AKT انجام شد.

**یافته ها:** استرپتوزوتوسین باعث افزایش سطح سرمی گلوکز، کاهش سطح سرمی انسولین، ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم، میزان mRNA AKT در پانکراس و اندازه جزایر بتا شد. تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن سطح گلوکز، انسولین، mRNA AKT، اندازه جزایر بتا و ظرفیت آنتی اکسیدانی را به روش مستقل از دوز بهبود بخشید.

**نتیجه گیری:** این نتایج نشان می دهد که پارا-سایمن دارای ویژگی کم کردن قند، افزایش انسولین و خاصیت آنتی اکسیدانی است و می تواند مسیر سیگنالینگ Akt/mTOR را تقویت کند. بنابراین، ممکن است برای درمان دیابت به تنهایی یا همراه با متفورمین موثر باشد.

**کلمات کلیدی:** دیابت ملیتوس، پارا-سایمن، استرس اکسیداتیو، AKT

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۱/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۶

## مقدمه

های مثبتی مانند در دسترس بودن، عوارض جانبی کم و سهولت استفاده، توجه قابل توجهی را در سراسر جهان به خود جلب کرده اند. پارا-سایمن (p-cymene) که به عنوان p-cymol یا p-isopropyltoluene نیز شناخته می شود، یک مونوترپن معطر است که به عنوان آلکیل بنزن طبقه بندی می شود. این ماده به طور طبیعی در اسانس اکثر گونه های گیاهان معطر یافت می شود که به دلیل خواص دارویی آن مانند ویژگی های ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است (۸ و ۹). مطالعه Haribabu و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که پاراسایمن می تواند موجب مهار تشکیل و تجمع آمیلوئید بتا گردد (۱۰) و مطالعه صیفی ناهوندی و همکاران در سال ۲۰۲۰ تایید کرد که مصرف پاراسایمن موجب بهبود آلزایمر در موش های مدل آلزایمری القا شده با بتا آمیلوئیدی می شود و حافظه و یادگیری را در این موش ها بهبود بخشیده و منجر به کاهش پلاک های آمیلوئیدی می گردد (۱۱). همچنین مصرف پاراسایمن منجر به کاهش احتمال سرطان کولون در موش های مدل هایپریلیپیدی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش سیتوکین های التهابی می شود (۱۲) که تایید کننده خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن می باشد. با توجه به مطالب گفته شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات درمانی پارا-سایمن بر میزان انسولین خون، بیان mRNA *AKT* و پاتولوژی بافت پانکراس در موش های صحرایی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین می باشد.

## مواد و روش ها

۵۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از حیوانخانه آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران خریداری شد. حیوانات به تعداد ۲ عدد در هر قفس نگهداری شدند و به مدت یک هفته تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد با دما و رطوبت کنترل شده (به ترتیب ۲۲ درجه سانتیگراد،  $50 \pm 10$  درصد)

دیابت نوع ۲ اغلب در افراد میانسال و مسن که از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به دیابت هستند و دارای سابقه خانوادگی می باشند رخ می دهد. همچنین احتمال بروز این بیماری در افرادی که اضافه وزن دارند یا چاق هستند، بیشتر است. در این بیماری سلول ها در برابر اثرات طبیعی انسولین مقاوم هستند و سلول های پانکراس به تدریج ظرفیت ترشح انسولین کافی را از دست می دهند. این تغییرات منجر به افزایش قند خون، افزایش میزان چربی ها در خون، اختلال در سنتز پروتئین و اختلال در تکثیر سلولی و بقای آن می شود. در واقع، دیابت نوع ۲ یک اختلال متابولیک است که با بالا بودن میزان قند، بالا بودن میزان چربی ها، و پایین بودن سطح انسولین شناخته می شود (۱). استرس اکسیداتیو و فرآیندهای التهابی می توانند با سیگنال دهی انسولین تداخل داشته باشند و به طور مستقیم با بروز دیابت نوع ۲ مرتبط هستند (۲). مسیرهای پیام رسان PI3K-AKT-mTOR (phosphoinositide 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin) نقش مهمی را در تنظیم بسیاری از فرآیندهای طبیعی سلول، از جمله هموستاز گلوکز، متابولیسم چربی، سنتز پروتئین و رشد و بقای سلولی ایفا می کند (۳). *AKT* یا پروتئین کیناز *B (PKB)* یک سرین/ترئونین-پروتئین کیناز است که در پاتوفیزیولوژی دیابت و عوارض آن نقش دارد (۴). فسفوریلاسیون *AKT* توسط PI3K منجر به فعال شدن آن می شود که این امر موجب تحریک سلول های بتا و ترشح انسولین از آنها و تکثیر سلول های بتا در جزایر پانکراس می شود (۵). همچنین مولکول *AKT* فعال شده برای انتقال ناقل گلوکز ۴ (*GLUT4*) به غشای پلاسمایی سلول و جذب گلوکز با واسطه *GIUT1* در پاسخ به انسولین ضروری است (۶، ۷). در حال حاضر، داروهای شیمیایی به طور گسترده ای برای کنترل و کاهش علائم دیابت نوع ۲ استفاده می شود. با این حال، کارایی و پتانسیل این داروها در بهبود دیابت ۲ محدود است. طی سال های گذشته، محصولات طبیعی به دلیل جنبه

با ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند.

پژوهش حاضر همچنین با تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی وابسته به دانشگاه علوم و تحقیقات، با شناسه اخلاق

IR.IAU.SRB.REC.1396.168 مصوب گردید. مدل دیابت با یک تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (سیگما آلدریچ، آمریکا) القا شد (۱۳). برای این منظور، ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین در بافر سیترات سدیم (۰/۰۱ مولار، pH ۴/۵) حل شد. پس از ۲ روز، نمونه خون از ورید دم موش گرفته شد و میزان گلوکز خون کامل توسط گلوکومتر (Cerapet، کره جنوبی) اندازه گیری شد. حیوانات با سطوح گلوکز بیشتر از ۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر، دیابتی در نظر گرفته شدند و برای آزمایش های بعدی انتخاب شدند.

حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه (۶ موش در هر گروه) به شرح زیر تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل (C): حیوانات با رژیم غذایی استاندارد و آب به صورت آزاد و بدون درمان، ۲- گروه دیابتی (D): حیوانات با تزریق درون صفاقی ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین، ۳- گروه دیابتی-متفورمین (D-Met): حیوانات دیابتی که به مدت ۴ هفته متفورمین (به صورت خوراکی گاواژ، ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، شرکت داروسازی Osve، ایران) دریافت کردند، ۴- کنترل-۲۵ (C-P25): حیوانات کنترلی که ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن پارا-سایمن خوراکی (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، ۵- کنترل-۵۰ (C-P50): حیوانات کنترلی که ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن پارا-سایمن خوراکی را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، ۶- کنترل-۱۰۰ (C-P100): حیوانات کنترلی که ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن پارا-سایمن خوراکی را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، ۷- دیابت-۲۵ (D-P25): حیوانات دیابتی که ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم

وزن بدن پارا-سایمن خوراکی را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، ۸- دیابت-۵۰ (D-P50): حیوانات دیابتی که ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن پارا-سایمن خوراکی را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، ۹- دیابت-۱۰۰ (D-P100): حیوانات دیابتی که ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن پارا-سایمن خوراکی را به مدت ۴ هفته دریافت کردند. دوز داروی پارا-سایمن براساس مطالعات قبلی انتخاب شد (۱۴ و ۱۵).

### تهیه نمونه های بافتی پانکراس و رنگ آمیزی دیتیزون (Dithizone)

بافت پانکراس جدا و در پارافرمالدهید ۱۰ درصد تثبیت شد و سپس قالب های پارافین از آن تهیه شدند (۱۶). سپس نمونه های پارافین با استفاده از میکروتوم به ضخامت ۵-۶ میکرومتر برش داده شدند و بر روی لام های شیشه ای نصب شدند. محلول دیتیزون (Sigma-Aldrich، آمریکا) با حل کردن ۱۰ میلی گرم دیتیزون در ۱ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO، Sigma-Aldrich، آمریکا) تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک در ۱ میلی لیتر محلول بافر فسفات نمکی (PBS) حل شد و بافت ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رنگ آمیزی شدند. بافت های رنگ آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

### اندازه گیری سطح سرمی انسولین و قند خون

نمونه های سرم در پایان هفته چهارم تهیه شد. حیوانات با کتامین (۰/۸ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) و زایلازین (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) بیهوش شدند. نمونه خون از بطن چپ قلب گرفته شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، نمونه ها در ۲۵۰۰g×۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم جمع آوری شد و تا آنالیز بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان انسولین با استفاده از کیت تست ELISA موش سوری/موش صحرايي (Cosmo Bio Co.)

تکنیک ریل تایم RT-PCR سنجش شد. گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. تکنیک ریل تایم PCR با استفاده از دستگاه Applied StepOnePlus Real-Time PCR (Biosystems, آمریکا) با استفاده از سایبرگرین (Addbio, کره) انجام شد. واکنش ریل تایم PCR به صورت دو مرحله ای و به شرح زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، تکثیر در ۴۰ سیکل با واسرشت در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه. سپس منحنی های ذوب در دماهای بین ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتیگراد (مرحله اول ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله ۲ در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه) تهیه شد تا از اختصاصی بودن محصولات PCR اطمینان حاصل شود. بیان ژن ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. تمام واکنش ها سه بار تکرار انجام شد. توالی پرایمرها به صورت زیر بود:

پرایمر AKT فرورارد 5' CCCTTCCTTACAGCCCTCAAG 3' و ریورس 5' ACACAATCT CCGCACCGTAG 3' پرایمر

پرایمر GAPDH فرورارد 5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3' و ریورس 5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'

تمامی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) سنتز شدند (۱۸).

#### آنالیز آماری

مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. برای مقایسه بین گروه ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده شد. 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

Ltd, ژاپن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه گیری شد. داده ها به صورت میکرومول در لیتر بیان شد. میزان گلوکز خون با استفاده از کیت های اسپکتروفتومتری تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده اندازه گیری شد.

#### اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی

آزمون توانایی کاهش آهن پلازما (FRAP) برای ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی نمونه های سرم بر اساس روشی که توسط Benzie و Strain توضیح داده شده است مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر سرم به ۱/۵ میلی لیتر از معرف FRAP تازه تهیه و از قبل گرم شده (۳۷ درجه سانتیگراد) اضافه شد (۱۰ حجم بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۳، ۱ حجم از TPTZ ۱۰ میلی مولار (2,4,6-tri-(2-pyridil)-s-triazine) در اسید هیدروکلریک ۴۰ میلی مولار (HCl) و ۱ حجم از کلرید آهن ۲۰ میلی مولار (FeCl<sub>3</sub>) و در تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه انکوبه شد. جذب کمپلکس آبی رنگ در برابر معرف شاهد در طول موج ۵۹۳ نانومتر به مدت ۴ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش خوانده شد. تفاوت جذب نوری بین نمونه و ماده شاهد برای محاسبه مقدار FRAP محاسبه شد. داده ها بر اساس منحنی استاندارد محلول های ترلوکس (Trolox) با غلظت مشخص محاسبه شد و نتایج به صورت اکی والانت میکرومول ترلوکس بیان شد. مواد شیمیایی مورد استفاده برای سنجش FRAP از شرکت مرک (آلمان) به دست آمد.

#### اندازه گیری بیان ژن

RNA کل از بافت پانکراس هموزن و با استفاده از معرف ترایزول (TRIZol) (شرکت کبازیس، همدان، ایران) و طبق روش شرکت سازنده استخراج شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Easy<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit، بیوتکنولوژی پارس توس، تهران، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. میزان بیان ژن AKT با استفاده از

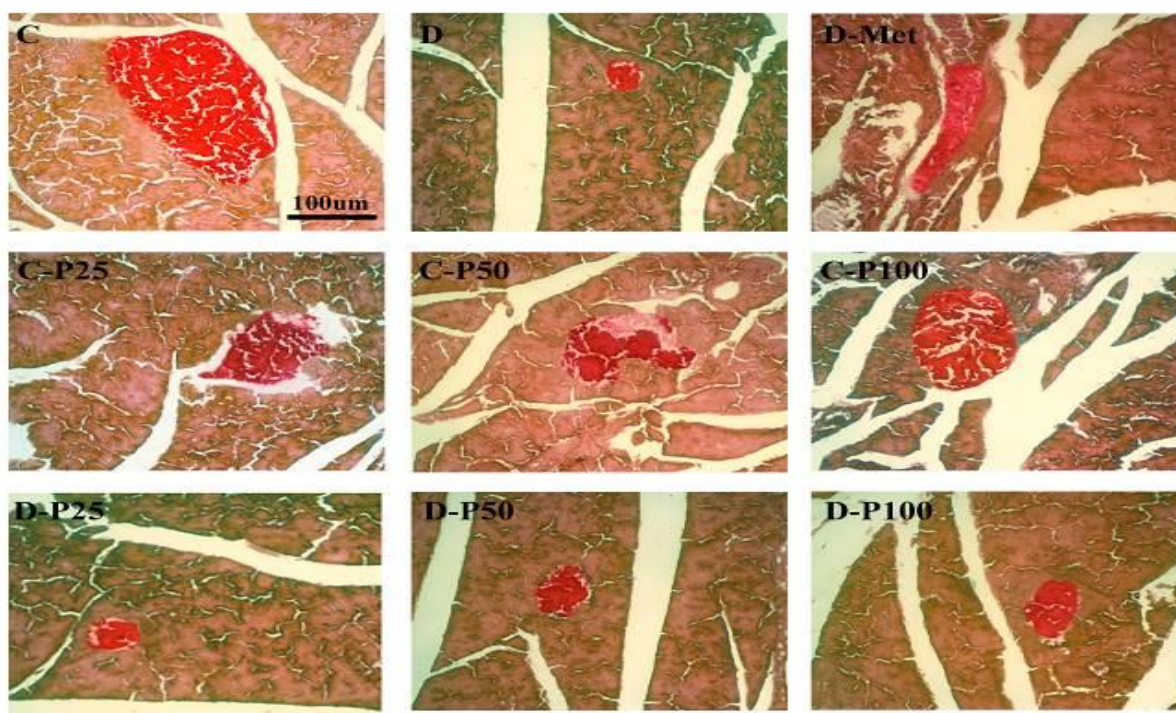
شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ ترسیم شدند.  $P \leq 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### نتایج بافت پانکراس

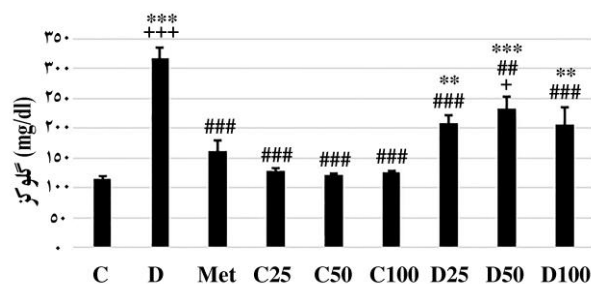
دی فنیل تیوکاربازون (دیتیزون) یک مولکول متصل شونده به روی می باشد که برای رنگ آمیزی اختصاصی سلول های بتای جزایر لانگرهانس در بافت های پانکراس استفاده می شود. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، جزایر لانگرهانس در تمامی گروه های کنترل دارای مورفولوژی طبیعی بدون هیچ گونه تغییر مشخصی هستند

(مناطق مثبت دیتیزون یا مناطق قرمز). القای دیابت با استرپتوزوتوسین باعث کاهش توده سلولی بتای جزایر در گروه های دیابتی، دیابتی-متفورمین، دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ شد. تغییرات جزایر لانگرهانس در گروه های دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ کمتر از تغییرات گروه دیابت-۲۵ است و مورفولوژی جزایر آنها بیشتر شبیه مورفولوژی جزایر در گروه کنترل است. بنابراین به نظر می رسد که پارا-سایمن در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ممکن است تغییر جزایر لانگرهانس را در موش های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین کاهش دهد.

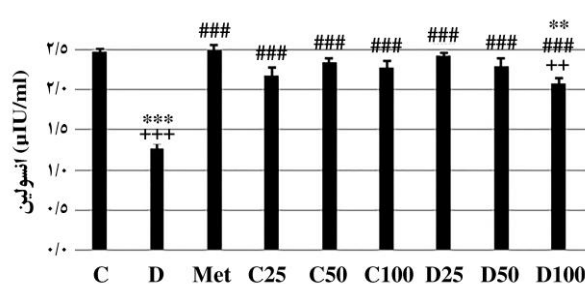


شکل ۱. رنگ آمیزی دیتیزون بافت های پانکراس در تمام موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل. مناطق قرمز نشان دهنده سلول های بتا در جزایر لانگرهانس است. C: موشهای کنترل، D: موشهای دیابتی، D-Met: موشهای دیابتی-متفورمین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P25: موشهای کنترل + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P50: موشهای کنترل + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P100: موشهای کنترل + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P25: موشهای دیابتی + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P50: موشهای دیابتی + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P100: موشهای دیابتی + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن). بزرگنمایی ۴۰۰، نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

دیابتی کاهش داد. تفاوت معنی داری بین گروه‌های دیابت-۲۵، دیابت-۵۰ و دیابت-۱۰۰ مشاهده نشد ( $P \geq 0/05$ ). تیمار با پارا-سایمن در مقایسه با گروه کنترل (C) هیچ اثر معنی داری ( $P \geq 0/05$ ) بر سطح سرمی گلوکز در حیوانات گروه‌های کنترل ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نداشت (نمودار ۱).



**تغییرات انسولین و گلوکز در سرم خون**  
 القای دیابت با استرپتوزوتوسین به طور معنی داری سطح سرمی گلوکز را در گروه دیابتی (D) در مقایسه با گروه کنترل (C) افزایش داد ( $P \leq 0/001$ ). تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن میزان گلوکز سرم را در گروه‌های دیابتی-متفورمین ( $P \leq 0/001$ )، دیابت-۲۵ ( $P \leq 0/001$ )، دیابت-۵۰ ( $P \leq 0/01$ ) و دیابت-۱۰۰ ( $P \leq 0/001$ ) در مقایسه با گروه

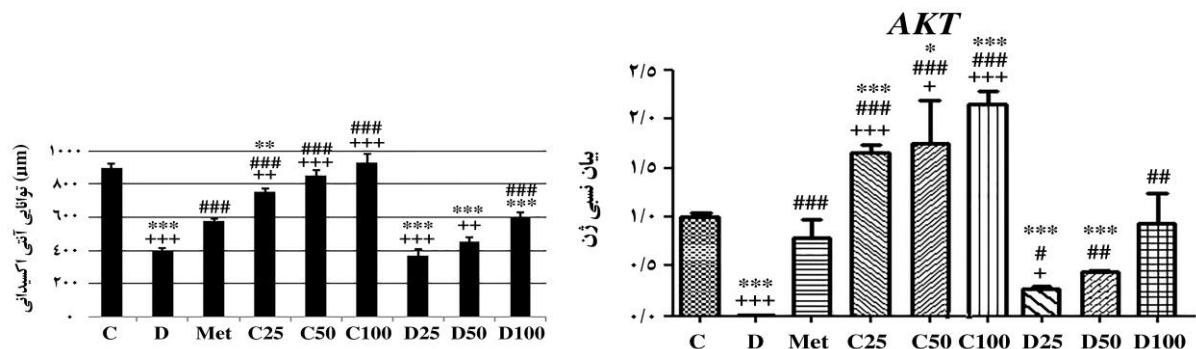


**نمودار ۱. سطح سرمی گلوکز و انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی و گروه کنترل.** مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است (۶ موش در هر گروه). علامت‌های ستاره، مربع و به اضافه به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل، گروه شم و گروه متفورمین می باشد. یک، دو و سه علامت (ستاره، مربع و به اضافه) به ترتیب سطح معنی داری  $P \leq 0/05$ ،  $P \leq 0/01$  و  $P \leq 0/001$  را نشان می دهد. C: موش‌های کنترل، D: موش‌های دیابتی، D-Met: موش‌های دیابتی-متفورمین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P25: موش‌های کنترل + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P50: موش‌های کنترل + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P100: موش‌های کنترل + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P25: موش‌های دیابتی + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P50: موش‌های دیابتی + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P100: موش‌های دیابتی + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).

### توانایی آنتی اکسیدانی

القای دیابت با استرپتوزوتوسین باعث کاهش قدرت آنتی اکسیدانی در سرم گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل شد ( $P \leq 0/001$ ). تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی در گروه دیابتی-متفورمین (Met) و گروه دیابت-۱۰۰ شد ( $P \leq 0/001$ ). تفاوتی بین گروه دیابت-۲۵ با دیابت-۵۰ مشاهده نشد ( $P \geq 0/05$ ). تیمار با پارا-سایمن در مقایسه با گروه کنترل (C) هیچ اثر معنی داری ( $P \geq 0/05$ ) بر قدرت آنتی اکسیدانی در حیوانات گروه‌های کنترل ۵۰ و ۱۰۰ نداشت (نمودار ۲).

القای دیابت با استرپتوزوتوسین به طور معنی داری سطح سرمی انسولین را در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $P \leq 0/001$ ). تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن باعث افزایش مقدار انسولین سرم در گروه‌های گروه‌های دیابتی-متفورمین ( $P \leq 0/001$ )، دیابت-۲۵ ( $P \leq 0/001$ )، دیابت-۵۰ ( $P \leq 0/01$ ) و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با گروه دیابتی (D) شد ( $P \leq 0/001$ ). تیمار با پارا-سایمن در مقایسه با گروه کنترل (C) هیچ اثر معنی داری بر سطح سرمی گلوکز در حیوانات گروه‌های کنترل ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نداشت ( $P \geq 0/05$ ).



**نمودار ۲. توانایی آنتی اکسیدانی و بیان نسبی ژن AKT در موش های صحرایی دیابتی و گروه کنترل.** مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است (۶ موش در هر گروه). 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 (ستاره، مربع و به اضافه) به ترتیب سطح معنی داری  $P \leq 0/05$ ،  $P \leq 0/01$  و  $P \leq 0/001$  را نشان می دهد. موشهای کنترل، D: موشهای دیابتی، D-Met: موشهای دیابتی - متفورمین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P25: موشهای کنترل + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P50: موشهای کنترل + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، C-P100: موشهای کنترل + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P25: موشهای دیابتی + p-cymene (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P50: موشهای دیابتی + p-cymene (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، D-P100: موشهای دیابتی + p-cymene (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).

### بیان ژن AKT

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود، القای دیابت با استرپتوزوتوسین به طور قابل توجهی سطح بیان AKT را در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $P \leq 0/001$ ). تیمار با پارا-سایمن در مقایسه با حیوانات شم به طور معنی داری بیان ژن AKT در گروه های دیابت-۲۵ و دیابت-۵۰ افزایش داد (به ترتیب  $P \leq 0/05$  و  $P \leq 0/01$ ). تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سطح بیان این ژن را در گروه های دیابتی-متفورمین و دیابت-۱۰۰ در مقایسه با حیوانات شم افزایش داد و به سطح کنترل رساند (به ترتیب  $P \leq 0/001$  و  $P \leq 0/01$ ). تیمار با پارا-سایمن بیان ژن AKT را در گروه های کنترل ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش داد (به ترتیب  $P \leq 0/001$ ،  $P \leq 0/05$  و  $P \leq 0/001$ ).

### بحث

در مطالعه حاضر اثرات درمانی پارا-سایمن علیه دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار

بررسی شد. در مطالعه حاضر، تیمار حیوانات با استرپتوزوتوسین موجب تغییرات بافتی و بیوشیمیایی مشخصی مانند از بین رفتن سلول های بتای جزایر لانگرهانس، کاهش انسولین، افزایش قند خون، افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش بیان ژن AKT شد که نشان دهنده ایجاد دیابت است. تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن این تغییرات پاتوفیزیولوژیک را در موش های دیابتی کاهش داد. استرپتوزوتوسین یک ترکیب گلوکزآمین-نیتروزوره (glucosamine-nitrosourea) است که از باکتری ها استخراج می شود. این ترکیب با تخریب سلول های بتا در جزایر لانگرهانس پانکراس منجر به ایجاد دیابت می شود. همچنین گفته می شود که استرپتوزوتوسین به طور انتخابی از طریق ناقل گلوکز ۲ (GLUT2) به سلول های بتای پانکراس منتقل می شود و به دلیل داشتن فعالیت آلکیله کردن DNA، این سلول ها را از بین می برد و منجر به مهار ترشح انسولین می شود (۱۹). این مسئله همچنین دلیل اختلال در تنظیم متابولیسم انسولین و گلوکز، در یک مدل دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین و در نتیجه کاهش انسولین و



است (۶ و ۷). بنابراین، کاهش AKT در مطالعه حاضر نقش مسیره‌های سیگنالینگ PI3K-AKT را در هموستاز گلوکز و ایجاد دیابت تایید می‌کند.

ارتباط پیچیده ای بین مسیره‌های سیگنالینگ PI3K-AKT و استرس اکسیداتیو وجود دارد زیرا مسیره‌های سیگنالینگ PI3K-AKT نه تنها بر استرس اکسیداتیو و تولید ROS تأثیر می‌گذارد، بلکه توسط استرس اکسیداتیو تنظیم نیز می‌شود (۲۲). چترام (Chetram) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که ROS می‌تواند بیان AKT فسفریله را در سلول‌های سرطانی پروستات انسانی 22Rv1 افزایش دهد (۲۳).

در مقابل، ون (Wen) و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که کاتوسین (chaetocin) موجب تولید ROS می‌شود و به دنبال آن مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT را غیرفعال می‌کند، و بدین وسیله تکثیر سلول‌های سرطان معده را مهار می‌کند و آپوپتوز را در آنها القا می‌کند (۲۴).

در مطالعه حاضر، ما اثرات درمانی پارا-سایمن را در مدل موش دیابتی بررسی کردیم. تیمار با متفورمین یا پارا-سایمن تغییرات پاتوفیزیولوژیک ناشی از استرپتوزوتوسین را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش داد. نتایج مشابهی با متفورمین در موشهایی که با پارا-سایمن تیمار شده بودند مشاهده شد. بر اساس داده‌های به دست آمده، پارا-سایمن می‌تواند سطح سرمی گلوکز و انسولین را در موش‌های دیابتی به روشی مشابه متفورمین بهبود بخشد. بنابراین، نتایج نشان داد که پارا-سایمن دارای پتانسیل کم کردن قند خون و افزایش انسولین در دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین در موش صحرایی است. مطالعه ما با مطالعه لطفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ همسو است. آنها نشان دادند که پارا-سایمن می‌تواند منجر به کاهش قند خون و چربی کبد در موش‌های که قند و چربی آنها به دلیل رژیم غذایی با چربی بالا افزایش یافته است گردد (۱۵). به نظر می‌رسد افزایش دوز پارا-سایمن هیچ تاثیری در بهبود سطح گلوکز یا انسولین ندارد. حتی به نظر می‌رسد که دوز بالای پارا-سایمن اثرات

افزایش قند خون ناشی از آن می‌باشد (۲۰)، که ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم. در مطالعه حاضر، تیمار با استرپتوزوتوسین باعث از بین رفتن توده سلولی بتای جزایر لانگرهانس در بافت پانکراس موش‌های دیابتی شد. علاوه بر این، داده‌ها نشان داد که استرپتوزوتوسین باعث کاهش سطح سرمی انسولین و افزایش سطح سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود که نشان می‌دهد مدل دیابت با موفقیت ایجاد شده است.

تیمار با استرپتوزوتوسین همچنین باعث افزایش استرس اکسیداتیو در موش‌های تحت درمان شد. داده‌ها نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی (آزمایش FRAP) در نمونه‌های سرم گروه دیابتی کاهش یافت که تاییدی بر افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد. شواهد فزاینده ای وجود دارد که استرس اکسیداتیو نقشی اساسی در ایجاد و پیشرفت دیابت دارد. افزایش استرس اکسیداتیو در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین ممکن است به دلیل افزایش قند خون نیز باشد (۲۱). مطالعات Nogueira-Machado و Chaves در سال ۲۰۰۸ نشان داد که افزایش قند خون می‌تواند دی‌آسیل‌گلیسرول (diacylglycerol) را فعال کند فعال شدن دی‌آسیل‌گلیسرول به نوبه خود پروتئین کیناز C و NADPH اکسیداز را فعال می‌کند (۲۱). فعال شدن NADPH اکسیداز منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) و استرس اکسیداتیو می‌شود.

تیمار با استرپتوزوتوسین همچنین سطح بیان AKT را در گروه دیابتی کاهش داد. مسیره‌های سیگنالینگ PI3K-AKT نقش مهمی در هموستاز گلوکز دارند (۳). فسفوریلاسیون AKT توسط PI3K منجر به فعال شدن آن می‌شود که این امر موجب تحریک سلول‌های بتا و ترشح انسولین از آنها و تکثیر سلول‌های بتا در جزایر پانکراس می‌شود (۵). همچنین مولکول AKT فعال شده برای انتقال ناقل گلوکز ۴ (GLUT4) به غشای پلاسمایی سلول و جذب گلوکز با واسطه GLUT1 در پاسخ به انسولین ضروری

التهابی می شود (۱۲) که تایید کننده خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن می باشد.

علاوه بر استرس اکسیداتیو، اثرات درمانی پارا-سایمن بر بیان AKT نیز در موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. تیمار با پارا-سایمن سطح بیان ژن AKT را در همه گروه‌های دیابتی افزایش داد و این افزایش وابسته به دوز بود. همانطور که قبلاً ذکر شد، مسیرهای سیگنالینگ PI3K-AKT هموستاز گلوکز را تنظیم می کند (۲۷ و ۲۶-۷ و ۵-۳). بنابراین، این احتمال وجود دارد که پارا-سایمن سطح گلوکز و انسولین را با افزایش بیان AKT بهبود بخشد و پتانسیل ضد دیابتی پارا-سایمن ناشی از این مسئله باشد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع داده‌های ما نشان داد که پس از القای دیابت توسط استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی نر ویستار، تیمار پارا-سایمن تغییرات پاتوفیزیولوژیک را در موش‌های صحرایی دیابتی بهبود بخشید و منجر به بهبود سطح انسولین، گلوکز و وضعیت استرس اکسیداتیو در حیوانات تحت درمان شد که نشان دهنده پتانسیل ضد دیابتی پارا-سایمن است. همچنین بیان ژن AKT را افزایش داد. این احتمال وجود دارد که مسیر سیگنالینگ AKT یک مسیر سیگنالینگ مهم برای درمان دیابت باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اعلام می‌دارند. پژوهش حاضر همچنین با تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی وابسته به دانشگاه علوم و تحقیقات، با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1396.168 مصوب گردید. هیچ کدام از نویسندگان، تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

معکوس دارد به گونه‌ای که سطح انسولین را در گروه دیابت-۱۰۰ (D-P100) کاهش داد. پارا-سایمن یا p-isopropyltoluene یک مونوترپن معطر است که به عنوان آلکیل بنزن طبقه‌بندی می‌شود. این ماده به طور طبیعی در اسانس اکثر گونه‌های گیاهان معطر یافت می‌شود که به دلیل خواص دارویی آن مانند ویژگی‌های ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است (۸، ۹).

تیمار با پارا-سایمن وضعیت استرس اکسیداتیو را نیز در موش‌های دیابتی بهبود بخشید. قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های سرمی موش‌های دیابتی تحت درمان با پارا-سایمن به دنبال تیمار با پارا-سایمن (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) افزایش یافت. بهبود قدرت آنتی‌اکسیدانی ممکن است نتیجه افزایش انسولین و کاهش گلوکز به دنبال تیمار با پارا-سایمن باشد.

همانطور که پیشتر ذکر شد، افزایش استرس اکسیداتیو در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین ممکن است به دلیل افزایش قند خون باشد. بنابراین، پارا-سایمن ممکن است به جلوگیری از تولید ROS در بیماران دیابتی کمک کند. مطالعات مختلفی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی پارا-سایمن را نشان داده است. مطالعه Haribabu و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که پاراسایمن می‌تواند موجب مهار تشکیل و تجمع آمیلوئید بتا گردد (۱۰) و مطالعه صیفی‌نهادندی و همکاران در سال ۲۰۲۰ تایید کرد که مصرف پاراسایمن موجب بهبود آلزایمر در موش‌های مدل آلزایمری القا شده با بتا آمیلوئیدی می‌شود و حافظه و یادگیری را در این موش‌ها بهبود بخشیده و منجر به کاهش پلاک‌های آمیلوئیدی می‌گردد (۱۱). استرس اکسیداتیو و التهاب از عوامل مهم در ایجاد و پیشرفت آلزایمر می‌باشد و امروزه حتی از آلزایمر به عنوان دیابت تیپ ۳ نیز یاد می‌کنند (۲۵). همچنین مصرف پاراسایمن منجر به کاهش احتمال سرطان کولون در موش‌های مدل هایپرلیپیدمی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش سیتوکین‌های

1. Murea M, Ma L, Freedman BI. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev Diabet Stud.* 2012;9(1):6–22.
2. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *IJPPP.* 2019;11(3):45-63.
3. Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2015;74:38–48.
4. Zdychová J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res.* 2005;54:1.
5. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Stahlhut S, Welling CM, Permutt MA. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1631–8.
6. Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP. Insulin signaling through akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *PNAS.* 2003;100:7569–74.
7. Beg M, Abdullah N, Thowfeik FS, Altorki NK, McGraw TE. Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *eLife.* 2017;6:e26896.
8. De Oliveira TM, de Carvalho RBF, da Costa IHF, de Oliveira GAL, de Souza AA, de Lima SG, et al. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Bio.* 2015;53:423–8.
9. Quintans-Júnior L, Moreira JC, Pasquali MA, Rabie SM, Pires AS, Schröder 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.
10. Haribabu J, Ranade DS, Bhuvanesh NSP, Kulkarni PP, Karvembu R. Ru(II)-p-cymene thiosemicarbazone complexes as inhibitors of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide aggregation and  $A\beta$ -induced cytotoxicity. *Chemistry Select.* 2017;2(35):11638-44.
11. Seifi-Nahavandi B, Yaghmaei P, Ahmadian S, Ghobeh M, Ebrahim-Habibi A. Cymene consumption and physical activity effect in Alzheimer's disease model: an in vivo and in vitro study. *J Diabetes Metab Disord.* 2020;19(2):1381–89.
12. Wang S, Wang X, Wang Y, Leng Q, Sun Y, Hoffman RM, et al. The Anti-oxidant Monoterpene p-Cymene Reduced the Occurrence of Colorectal Cancer in a Hyperlipidemia Rat Model by Reducing Oxidative Stress and Expression of Inflammatory Cytokines. *Anticancer Res.* 2021;41(3):1213-18.
13. Rahimpour P, Sheikholeslami-Vatani D, Moloudi M, Ghaeeni S. The effect of training type on the signaling Pathway of ceramide-dependent insulin resistance in the flexor hallucis longus muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell J.* 2023;25(7):461-9.
14. de Oliveira TM, de Carvalho RBF, da Costa IHF, de Oliveira GAL, de Souza AA, de Lima SG, et al. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Biol.* 2015;53(3):423–8.
15. Lotfi P, Yaghmaei P, Ebrahim-Habibi A. Cymene and Metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;14:52.
16. Poorgholam P, Yaghmaei P, Nouredini M, Hajebrahimi Z. Effects of artemisinin and TSP-1-human endometrial-derived stem cells on a streptozocin-induced model of Alzheimer's disease and diabetes in Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp.* 2021;81(2):141-150.
17. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.

- 18- Ahmadi A, Vahabzadeh Z, Moloudi M, Farhadi L, Shirahmadi S. Contribution of toll-like receptor 2 and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase to the trimethylamine N-oxide-induced inflammatory reactions in U937-derived macrophages. *ARYA Atheroscler*. 2021;17:2096.
19. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216–26.
20. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*. 1990;13:259–62.
21. Nogueira-Machado JA, Chaves MM. From hyperglycemia to AGE-RAGE interaction on the cell surface: a dangerous metabolic route for diabetic patients. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:871–82.
22. Rong Y, McPhee C K, 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 USA* 2011;108(19):7826–31.
23. Chetram MA, Bethea DA, Jones KJ, Don-Salu-Hewage AS, Odero-Marah VA, Hinton CV. ROS-mediated activation of AKT induces apoptosis via pVHL in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;376(1-2):63–71.
24. Wen C, Wang H, Wu X, He L, Zhou Q, Wang F, et al. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antitumor effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):809.
25. Li X, Song D, Leng SX. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging*. 2015;10:549-60.
26. 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;284:7832–42.
27. 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;65:981–95.