

## تأثیر تجویز خوراکی اینترلوکین ۲ نو ترکیب انسانی بر نشانگرهای مولکولی نوروپاتی دیابتی در مغز مگس سرکه

مائده امام جمعه<sup>۱</sup>، مجید حسن پورعزتی<sup>۱\*</sup>، عاطفه حسینعلی<sup>۱</sup>

### چکیده

مقدمه: در این مطالعه، اثر تجویز خوراکی اینترلوکین-۲ نو ترکیب انسانی (rhIL-2) بر سطح NO و فعالیت AChE مغزی در شرایط هیپرگلیسمی القا شده توسط رژیم غذایی با ساکارز بالا (HSD)، بعنوان مدل دیابت نوع دو، در مگس سرکه بررسی شد. روش‌ها: در این تحقیق تجربی، مگس‌های سرکه بالغ از هر دو جنس (۳۰ عدد در هر گروه) به شش گروه دریافت کننده‌ی غذای استاندارد (ND)، غذایی با ساکارز بالا (HSD)، دریافت کننده‌ی rhIL-2 در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌علاوه ND و دریافت کننده‌ی rhIL-2 در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌علاوه HSD تقسیم‌بندی شدند. مگس‌ها به مدت سه هفته روی این محیط‌های کشت پرورش داده شدند. مغز مگس‌های سرکه استخراج، هموژن و سطح گلوکز، NO و فعالیت AChE در انتهای آزمایش‌ها سنجیده شد.

یافته‌ها: سطح گلوکز، فعالیت کولین استراز و سطح نیتریک اکساید در هموژنای مغز مگس‌های سرکه HFD در مقایسه با گروه ND افزایش یافت. وزن بدن مگس‌های HSD در مقایسه با ND کاهش یافت. تجویز rhIL-2 در هر دو دوز همراه با HSD به‌طور قابل توجهی از بروز این تغییرات پیشگیری کرد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که rhIL-2 تا حدی از نوروپاتی دیابتی در مگس‌های سرکه جلوگیری می‌کند. به نظر می‌رسد که اثرات پیشگیرانه این ترکیب از طریق سازکارهای وابسته به نیتریک اکساید و استیل کولین استراز در مغز واسطه‌گری می‌شود.

واژگان کلیدی: اینترلوکین-۲ نو ترکیب انسانی، نوروپاتی دیابتی، مگس سرکه، نیتریک اکساید، استیل کولین استراز

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

\* نشانی: تهران، بزرگراه خلیج فارس، روبروی مرقد مطهر امام خمینی (ره)، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، د پستی: ۷۱۸۷۹۸۵۴۴۳، تلفن: ۰۲۱۵۱۲۱۲۲۵۲، ۰۹۱۲۵۴۶۴۴۳۹، نمابر: ۰۲۱۵۱۲۱۲۲۰۱، پست الکترونیک: Hassanpour@shahed.ac.ir

## مقدمه

نوروپاتی دیابتی به شرایطی اطلاق می‌شود که در طی آن به دلیل بروز هیپرگلاسمی فعالیت طبیعی سیستم اعصاب دچار اختلال می‌شود [۱]. به‌طور متوسط بین ۶۰ تا ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به دیابت از نوروپاتی رنج می‌برند، و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ بیش از ۲۰۰ میلیون نفر در سطح جهان با این مشکل مواجه شوند [۲، ۳]. اختلالات ناشی از هیپرگلاسمی از طریق سازکارهایی چون: افزایش نیتریک اکساید به دلیل بیان بیش از حد طبیعی نیتریک اکساید سنتتاز در میتوکندری‌ها و تشدید بیان آنزیم استیل‌کولین‌استراز در نورون‌های مغزی می‌تواند به بروز اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی منجر شود [۴، ۵].

پژوهشگران امروزه از مدل القاء شرایط هیپرگلاسمی در مگس سرکه همگام با مدل‌های مطالعاتی چونندگان با هدف درک بهتر سازکارهای دخیل در اختلال عملکرد مغز ناشی از هیپرگلاسمی و یافتن راهکارهای درمانی بالقوه استفاده می‌کنند [۶، ۷]. وجود هفت ژن برای پدید شبه انسولین در ژنوم، بروز اختلال در عملکرد سلول‌های تولیدکننده انسولین مشابه با دیابت نوع یک و استعداد ابتلا به اختلالات متابولیک و قلبی در مگس سرکه به دنبال مصرف رژیم غذایی با چربی یا قند بالا از موارد شباهت دیابت این حشره با انسان است [۸]. امروزه مشخص شده است که بروز هیپرگلاسمی در مگس سرکه مشابه با انسان با میانجی‌گری سیستم ایمنی منجر به بروز عواقب نورپاتی می‌شود [۹]. گزارش شده است که نیتریک اکساید (NO) یک میانجی بالقوه بین فرایندهای متابولیسمی و نقص در عملکرد عروق خونی در سیستم عصبی در شرایط نوروپاتی دیابتی عمل می‌کند [۱۰]. همچنین مطالعات آزمایشگاهی در چونندگان دیابتی شده با آلوکسان نشان داد که مهار فعالیت آنزیم AChE در مغز در سازکار عواقب ناشی از هیپرگلاسمی دخالت دارد [۱۱]. در همین راستا پژوهشگران با مطالعه بر روی مگس سرکه کشف کرده‌اند که مصرف رژیم غذایی حاوی ساکاروز بالا سبب افزایش فرایندها التهابی و استرس اکسیداتیو در بدن این جانور می‌شود [۱۲]. در حقیقت،

بین رژیم غذایی و بروز اختلالات نورپاتی در طی دیابت ارتباط نزدیکی وجود دارد [۱۳].

به تازگی، انتشار یک گزارش جالب نشان داد که تجویز یک سیتوکائین نو ترکیب می‌تواند گزینه‌ی درمانی مناسبی برای نوروپاتی دیابتی در بیماران باشد [۱۴]. پیش از این نیز از تجویز ترکیبات نو ترکیب انسانی، چون فاکتور رشد عصبی، برای درمان پلی نوروپاتی دیابتی در بیماران بهره گرفته شده بود [۱۵]. اینترلوکین-۲ نو ترکیب انسانی (rhIL-2) سابتوکینی است که توسط تکنیک‌های بیان ژن در باکتری اشرشیا کلی ساخته می‌شود. این اینترلوکین خاصیت ضد التهابی داشته و سبب تحریک تولید اینترلوکین-۶ می‌شود [۱۶، ۱۷]. اینترلوکین ۶ در دوزهای اندک اثر درمانی بر نوروپاتی محیطی ناشی از دیابت داشته است [۱۸، ۱۹]. به‌علاوه، تجویز IL-2 به‌عنوان یک درمان مناسب برای بسیار از بیماری‌های صعب‌العلاج دارای سازکاری مشابه با شرایط بیماری دیابت و خودایمنی، مورد استفاده واقع شده است [۲۰]. ساختار برخی گیرنده‌های درون سلولی در مگس سرکه با گیرنده اینترلوکین-۱ در پستانداران دارای درصد بالایی از همسانی است [۲۱]. گزارش شده است که IL-2 می‌تواند بر فعالیت الکتریکی سیستم عصبی مرکزی تأثیر گذاشته و به‌عنوان یک تعدیل‌کننده عصبی در مغز عمل کند [۲۲]. لازم به ذکر است که بین IL-2 مگس سرکه و نوع انسانی آن تشابه ساختاری بسیار بالایی وجود دارد [۲۳].

از سوی دیگر، سازکارهای کنترل‌کننده متابولیسم بدن در مگس سرکه و پستانداران از سطح بالایی از تشابه برخوردار بوده و در طول تکامل دست نخورده حفظ شده‌اند [۲۴، ۲۵]. لذا، استفاده از مگس سرکه می‌تواند یک مدل معتبر و دقیق را برای ارزیابی ترکیبات داروی جدید برای درمان دیابت به‌خصوص ناشی از مصرف ترکیبات غذایی در اختیار پژوهشگران قرار دهد. هیپرگلاسمی و کاهش وزن ساده‌ترین شاخص‌های فنوتیپی مشترک ناشی از مصرف HSD در مگس سرکه و انسان محسوب می‌شوند.

بنابر این تحقیق حاضر قصد دارد به ارزیابی تأثیر درمانی تجویز خوراکی rhIL-2 بر سطح NO و AChE در مغز

تجویز دوزهای بسیار اندک IL-2 در درمان کودکان مبتلا به دیابت مؤثر است [۲۸]. مگس‌های در همی گروه‌ها به مدت سه هفته در روی محیط کشت پرورش داده شدند.

در انتهای آزمایش‌ها، مگس‌ها در هر گروه توسط سرما بیهوش و بلافاصله سر مگس‌ها جداسازی و پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین سرد هموژنای مغز مگس‌ها تهیه و پس از سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) از محلول فوقانی برای سنجش‌های بعدی استفاده شد [۲۹].

سطح گلوکز در محلول فوقانی هموژنات توسط دستگاه گلوکومتر «آوان درمان فارس» ساخت ایران اندازه‌گیری شد. فعالیت AChE براساس روش Ellman و همکاران و توسط کیت خریداری شده از بایرکس فارس اندازه‌گیری شد [۳۰]. فعالیت آنزیم به مدت ۲ دقیقه براساس میکرومول کولین استراز بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه محاسبه شد.

سطح نیتریک اکساید (نیتريت و نیترات) NO به کمک کیت شرکت نوند سلامت تعیین شد [۳۱]. حساسیت این کیت ۱۵ نانومول تا ۱۵ میکرومول در میلی‌لیتر است. این کیت براساس واکنش NO<sub>2</sub> با سولفانیل‌آمید و N-1- نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌کلراید (NED) در شرایط اسیدی (فسفریک اسید) عمل کرده و ترکیب قابل سنجش و رنگی آزو را تولید می‌کند. سنجش پروتئین به روش برادفورد و توسط کیت شرکت کالازیست انجام شد.

داده‌ها از نظر توزیع متغیرها توسط آزمون شاپیرو ویلک مورد ارزیابی واقع شدند. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (دارو و تغذیه) و آزمون بونفرنی استفاده شد.

## یافته‌ها

مقدار گلوکز در محلول سوپرنانت هموژنای مغز مگس‌های سرکه به ترتیب در گروه‌های ND، HSD، rhIL-2+ND و rhIL-2+HSD:  $2.5 \pm 0.25$ ،  $4 \pm 1.72/5.2$ ،  $3.3 \pm 2.6/3$  و  $2.2 \pm 2.4$  میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود [F(1,84)=8.09, P<0.0056]. افزایش معنی‌دار (P<0.01) گلوکز در هموژنای مغز مگس‌ها HSD تأیید کننده بروز هیپرگلاسمی در مغز مگس‌ها است.

مگس‌های سرکه دریافت کننده HSD به‌عنوان یک مدل بروز نوروپاتی دیابتی همراه با دو فاکتور فنوتیپی این پدیده پردازد.

## روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی تجربی است که بر روی مگس‌های سرکه بالغ نوع وحشی از هر دو جنس انجام شده است. مگس‌های سرکه از آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه شاهد تهیه شدند. حجم نمونه در این مطالعه براساس نتایج مطالعات مشابه پیشین و با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۵ درصد و توان آماری ۹۵٪ به ترتیب برای خطاهای نوع اول و دوم توسط نرم‌افزار Medcalc تعیین شد.

مگس‌های سرکه (۳۰ عدد در هر گروه) در بطری درون انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی مطلق نگه‌داری شدند. مگس‌ها هر دو هفته یکبار به بطری‌های حاوی محیط کشت‌های جدید انتقال داده می‌شدند.

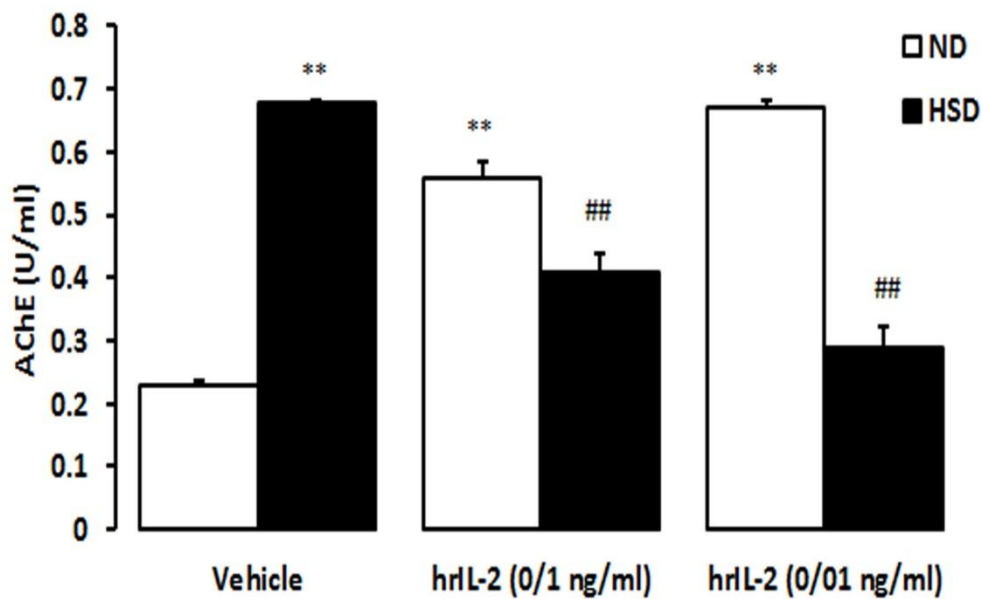
مگس‌ها به شش گروه: دریافت کننده‌ی غذای استاندارد (ND)، دریافت کننده‌ی غذای با ساکاروز بالا (HSD)، دریافت کننده‌ی rhIL-2 (۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر) همراه با D، و دریافت کننده‌ی rhIL-2 (۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر) همراه با HSD تقسیم شدند.

در این مطالعه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله تغذیه، و شرایط نگه‌داری در نظر گرفته شد. این مطالعه دارای کد اخلاق: IR.SHAHED.REC.1400.105 است.

محیط کشت ND توسط مخلوط کردن آرد ۳ گرم، شکر ۴ گرم، مخمر ۶/۵۲ گرم، آگار ۰/۶۸ گرم، اسید پروپیونیک ۶۰۰ میکرولیتر در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. محیط کشت حاوی غلظت بالا ساکارز (HSD) با افزودن غلظت ۳۰ درصد ساکارز به محیط کشت ND تهیه شد [۲۶، ۲۷]. این محیط‌های کشت در زیر نور ماورابنفش استریل شده و تا زمان مصرف در یخچال نگه‌داری شدند. محیط‌های کشت حاوی rhIL-2 نیز با افزودن دوزهای ۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر به آنها تهیه شدند. انتخاب دوزهای rhIL-2 براساس مطالعه‌ی Rosenzawajg و همکاران صورت گرفت که نشان داده بودند

میزان فعالیت آنزیم AChE (واحد/میلی لیتر) در هموژنای مغز مگس‌های سرکه در گروه‌های مختلف مشخص کرد که مصرف HSD سبب افزایش فعالیت این آنزیم به‌طور معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) در هموژنای مغز مگس‌های در مقایسه با گروه ND می‌شود (شکل ۱). مصرف هر دو دوز rhIL-2 توسط گروه ND سبب افزایش معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) فعالیت این آنزیم در مغز مگس‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد. اما، مصرف هر دو دوز rhIL-2 سبب کاهش فعالیت این آنزیم در مغز مگس‌های سرکه دریافت‌کننده HSD شد. اثر پیشگیری‌کننده rhIL-2 بر فعالیت این آنزیم در دوز ۰/۰۱ نانوگرم/میلی‌لیتر بیشتر از ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر بود [ $F(2, 174)=199.23, P < 0.0001$ ].

تجویز هر دو دوز rhIL-2 هیچ اثری بر قند خون در گروه ND نداشت. همچنین، وزن بدن مگس‌ها در گروه دریافت‌کننده ND و HSD به‌ترتیب  $0.01 \pm 0.01$  و  $0.02 \pm 0.068$  میکروگرم بود. مقایسه وزن بدن مگس‌ها کاهش معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) وزن بدن مگس‌ها در گروه HSD را تأیید کرد [ $t=3.578, Df=58, P=0.0007$ ]. تجویز هر دو دوز rhIL-2 به مگس‌های گروه HSD با شدت مساوی از کاهش در وزن بدن مگس‌ها جلوگیری کرده و میانگین وزن بدن مگس‌ها  $0.01 \pm 0.077$  بود. مصرف هر دو دوز rhIL-2 توسط مگس‌های گروه ND و HSD سبب تغییر معنی‌داری در تعداد مرگ مگس‌ها در کل دوره آزمایش نشد.



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مغز مگس سرکه دریافت‌کننده rhIL-2 (۰/۰۱ و ۰/۱ نانوگرم/میلی لیتر) همراه با ND و یا HSD در گروه‌های مختلف.

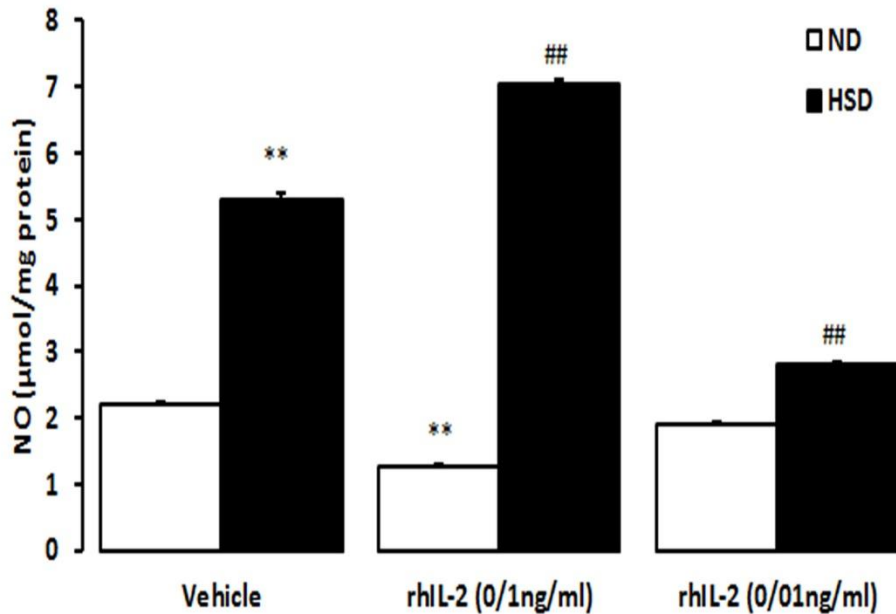
داده‌ها توسط آزمون ANOVA دو طرفه و آزمون بن فرنی مقایسه شدند.

$P < 0.01$  نسبت به گروه ND،  $##P < 0.01$  نسبت به گروه HSD.

علائم اختصاری: ND=غذای استاندارد، HSD=غذای با ساکارز بالا، rhIL-2=اینترلوکین-۲ نوترکیب انسانی.

نانوگرم/میلی لیتر rhIL-2 همراه با HSD باعث افزایش سطح NO در مغز مگس‌ها و مصرف دوز ۰/۰۱ نانوگرم/میلی لیتر rhIL-2 همراه با HSD باعث کاهش سطح NO مغز مگس‌ها در مقایسه با مگس‌های HSD به تنهایی شد [F(2,174)=1049.66, P<0.0001].

ارزیابی سطح نیتریک اکساید در هموژنای مغز مگس‌های سرکه گروه HSD در مقایسه با گروه ND افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲). تجویز دوز ۰/۱ نانوگرم/میلی لیتر rhIL-2 توسط مگس‌های ND سبب کاهش سطح NO در مغز مگس‌ها شد. مصرف دوز ۰/۱



شکل ۲- اثر مصرف اینترلوکین ۲ نوترکیب انسانی بر سطح نیتریک اکساید در مغز مگس‌های سرکه تغذیه شده با HSD. داده‌ها توسط ANOVA و آزمون توکی مقایسه شده‌اند.

P<0.01 \*\*نسبت به گروه کنترل، ## P<0.01 نسبت به گروه با ساکارز بالا.

علام اختصاری: ND=غذای استاندارد، HSD=غذای با ساکارز بالا، rhIL-2=اینترلوکین-۲ نوترکیب انسانی.

به‌علاوه، این ترکیب توانسته است که از اختلال عروقی ناشی از التهاب جلوگیری کند [۳۶]. در مقابل گزارش دیگری هم در دست است که استفاده از rhIL-2 در موش‌های که به‌طور ژنتیکی دچار دیابت از نوع مقاوم به انسولین بوده‌اند اثر تشدید کننده‌ای بر دیابت آنها در پی داشته است [۳۷]. لذا به‌نظر می‌رسد که سازکارهای متنوعی تحت تأثیر rhIL-2 قرار می‌گیرند و کاربردهای درمانی جدیدی ناشناخته‌ای با مشخص شدن نحوه‌ی تجویز و دوز تجویزی اینترلوکین-۲ نوترکیب انسانی به‌دست می‌آیند که باید مورد ارزیابی دقیق‌تر واقع شوند.

## بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند که مصرف خوراکی rhIL-2 منجر به کاهش سطح گلوکز، و تغییر در سطح NO و فعالیت AChE در مغز مگس سرکه به‌عنوان فاکتورهای میانجی در القا نوروپاتی دیابتی به‌دنبال مصرف HSD می‌شود. در تأیید یافته‌های حاضر پیش از این نیز، رابطه‌ای بین افزایش سطح IL-2 درون‌زاد مغز و دیابت و عواقب ناشی از آن گزارش شده است [۳۲]. امروزه از روش ژن درمانی با ژن اینترلوکین-۲ در درمان نوروپاتی و دیگر بیماری‌های التهابی استفاده شده است [۳۳، ۳۴]. همچنین، اثرات مفید تجویز rhIL-2 از طریق تحریک بازسازی میلین در مغز گزارش شده است [۳۵].

مدل ایجاد نوروپاتی دیابتی در مگس سرکه دارای شباهت‌های بسیاری با مدل‌های مشابه در پستانداران است، با وجود تفاوت‌های فیزیولوژیکی آشکار که از جمله تشابه‌ها می‌توان به شباهت بین متابولیسم و تنظیم کربوهیدرات‌ها، سازکارهای موجود در سطح گیرنده انسولین و عواقب پس از هیپرگلیسمی در مگس سرکه و مهره‌داران عالی اشاره کرد [۳۸-۴۰]. در این ارتباط دانشمندی به نام Strange در سال ۲۰۱۶ در مقاله‌ی خود به مقایسه‌ی این مدل‌ها بین موش، مگس سرکه، ماهی گورخری و کرم سی الگانس در زمینه‌ی کشف داروهای جدید پرداخته است [۴۱].

ارزیابی سازکارهای حاکم بر نوروپاتی دیابتی مشخص کرده است که کاهش در میزان مصرف گلوکز در بافت مغز می‌تواند زیربنای برای بروز هیپرگلیسمی در بافت مغزی و بروز نوروپاتی دیابتی باشد [۴۲]. در نهایت در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر عنوان شده است که هیپرگلیسمی در سیستم عصبی مرکزی باعث بروز شرایط التهاب عصبی و تحریک فرایندهای استرس اکسیداتیو و تشدید فعالیت AChE در نوروپاتی‌های مغزی حیوانات دیابتی می‌شود [۴۳].

یافته‌های ما افزایش سطح گلوکز در هموژنای بافت مغزی و کاهش وزن بدن در مگس‌های سرکه را به دنبال مصرف HSD در مگس‌های سرکه نشان داد. به‌طور مشابه افزایش در گلوکز مغز در بیماران انسانی در شرایط دیابت گزارش شده است [۴۴]. در ضمن، افزایش گلوکز همولنف در شرایط هیپرگلیسمی ناشی از HSD در مگس‌های سرکه مشاهده شده است [۴۵]. یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند که مصرف rhIL-2 نه تنها سبب کاهش میزان سطح گلوکز در هموژنای مغز مگس‌ها می‌شود، بلکه از کاهش وزن بدن مگس‌ها در شرایط هیپرگلیسمی ناشی از HSD نیز جلوگیری می‌کند. کاهش وزن بدن یکی از علائم ظاهری است که به دنبال بروز نوروپاتی دیابتی در مگس سرکه به دنبال تجویز HSD مشاهده می‌شود [۶]. مقالات نشان داده‌اند که تجویز IL-2 به تنهایی به موش‌های دچار التهاب تأثیری بر وزن بدن آنها نداشته است [۴۶].

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که مصرف HSD فعالیت AChE مغز مگس‌های سرکه را افزایش داده و مصرف خوراکی هم‌زمان rhIL-2 و HSD توسط مگس‌های سرکه از افزایش فعالیت این آنزیم در مغز مگس‌ها جلوگیری می‌کند. یک یافته‌ی به‌دست آمده از مطالعه بر روی جوندگان افزایش فعالیت AChE در مغز در شرایط نوروپاتی دیابتی را تأیید می‌کند [۴۷]. یافته‌های ما هم‌راستا با یافته‌های Vukšić و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که تغییر در فعالیت برخی از انواع کولین استراز در مغز نسبت به تغییر در متابولیسم ترکیبات قندی حساس بوده و ترکیبات سایتوکائینی چون IL-2 می‌تواند سبب تعدیل فعالیت این آنزیم شوند [۴۸].

Darreh-Shori و همکاران نشان دادند که سطح فعالیت AChE در مغز با میزان فعال شدن آستروسیت‌های واکنشی ارتباط داشته و از طریق تنظیم سطح استیل کولین مغز نقش مهمی بر عملکرد سیستم ایمنی دارد [۴۹]. یافته‌های ما اثر کاهش دهنده‌ی مصرف rhIL-2 بر فعالیت AChE در مغز مگس‌های دچار دیابت را تأیید کرد.

به‌علاوه، یافته‌های ما مشخص کرد که مصرف خوراکی rhIL-2 توسط مگس‌های سرکه کاملاً بی‌خطر بوده و همراه با مصرف HSD اثر کشنده‌ای بر مگس‌های سرکه ندارد. این یافته با مطالعات قبلی دال بر بی‌خطر بودن مصرف rhIL-2 در انسان تأیید می‌شود [۵۰].

لذا، به‌عنوان یک جمع‌بندی کلی تا این مرحله می‌توان گفت که جلوگیری از تشدید فعالیت AChE در مغز می‌تواند یک سازکار زیربنای ضد نوروپاتی دیابتی برای rhIL-2 در مدل HSD مگس سرکه مطرح شود.

در ادامه، نتایج ما نشان دادند که تجویز HSD به مگس‌های سبب افزایش سطح NO مغز در مگس‌ها گروه ND می‌شود. مصرف rhIL-2 همراه با HSD فقط در دوز ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر توانست اثر تحریکی HSD بر سطح NO مغز مگس‌ها را کاهش دهد. اثر تجویز دو دوز rhIL-2 بر سطح NO مغز به مگس‌های HSD در دوز ۰/۱ بیشتر سبب افزایش و در دوز کمتر سبب کاهش سطح NO در مغز مگس‌های دریافت کننده‌ی HSD شد. مشاهدات ما در ارتباط با اثر

دیگر فاکتورهای مرتبط با این دو فاکتور در مغز در شرایط HSD اشاره کرد.

### نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر یک مبنای اولیه‌ای را برای بررسی استفاده بالقوه استفاده درمانی از rhIL-2 برای درمان عوارض مغزی ناشی از هیپرگلاسمی فراهم آورده است. این نتایج نشان می‌دهند که این ترکیب دارای اثر کاهشی بر عوامل القا کننده نوروپاتی ناشی از هیپرگلاسمی در مغز مگس‌های است. با این حال، هنوز جزئیات بیشتری از سازکارهای دقیق عملکرد آن برای تأیید سودمندی مصرف آن در شرایط دیابت لازم است که منتظر مشخص شدن هستند.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل بخشی از یافته‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مائده امام جمعه است.

### تضاد منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی برای نویسندگان نداشته است.

تحریک کننده‌ی مصرف HSD بر فعالیت سیستم NO در مغز هم‌راستا با گزارش O'Brien در سال ۲۰۲۰ است [۵۱]. پژوهشگران مختلفی، افزایش در NO مغز را به‌عنوان سازکار ملکولی دخیل در بروز اختلال عملکرد در سیستم عصبی مرکزی ناشی از هیپرگلاسمی در مدل موشی معرفی کرده‌اند [۵۲، ۵۳]. اما جالب است که تجویز دوز پایین از rhIL-2 به مگس‌های دریافت کننده HSD اثرات کاهشی بر سطح NO مغز مگس‌های سرکه در پی داشت. یک توضیح برای این تناقض می‌تواند تغییرات پیچیده و چندگانه در سیستم تولید کننده‌ی NO به‌دنبال بروز شرایط دیابت باشد [۵۴]. این امر توسط به تازگی توسط تحقیقات دیگری تأیید شده است به این ترتیب به‌نظر می‌رسد که پاسخ سیستم نیتریک اکساید به شدت تحت تأثیر هیپرگلاسمی و عوارض آن تغییر پیدا می‌کند [۵۵]. بدین ترتیب می‌توان گفت که مصرف rhIL-2 می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز سبب کنترل تغییر در برخی فاکتورهای مغزی ناشی از مصرف HSD دخیل در نوروپاتی دیابتی می‌شود.

یافته‌ها نشان می‌دهند که تجویز rhIL-2 می‌تواند در دوز خاصی از بروز هیپرگلاسمی و افزایش فعالیت AChE و سطح NO در مغز مگس‌های دریافت کننده HSD جلوگیری کند. از محدودیت‌های حاکم بر این پژوهش می‌توان به عدم تعیین

### مآخذ

- Dobretsov M., Romanovsky D., Stimers J.R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. *World Journal of Gastroenterology*, 2007; 13:175–191.
- Tesfaye S., Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2012; 28: 8–14.
- Liu YW, Zhang L, Li Y, Cheng YQ, Zhu X, Zhang F, Yin XX. Activation of mTOR signaling mediates the increased expression of AChE in high glucose condition: in vitro and in vivo evidences. *Molecular Neurobiology*, 2016; 53(7): 4972-80.
- Catalani E, Fanelli G, Silvestri F, Cherubini A, Del Quondam S, Bongiorno S, Taddei AR, Ceci M, De Palma C, Perrotta C, Rinalducci S, Prantera G, Cervia D. Nutraceutical strategy to counteract eye neurodegeneration and oxidative stress in drosophila melanogaster fed with high-sugar diet. *Antioxidants (Basel)*, 2021; 10(8):1197.
- Ecker A, Gonzaga TKSDN, Seeger RL, Santos MMD, Loreto JS, Boligon AA, Meinerz DF, Lugokenski TH, Rocha JBTD, Barbosa NV. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in drosophila melanogaster: protective role of syzygium cumini and bauhinia forficata. *Biomed Pharmacother*, 2017; 89:605-616.
- Garcia-Serrano AM, Duarte JMN. Brain metabolism alterations in type 2 diabetes: what Did we learn from diet-induced diabetes models? *Frontiers in Neuroscience*, 2020; 14:229.

7. Na J, Musselman LP, Pendse J, Baranski TJ, Bodmer R, Ocorr K, Cagan R. A Drosophila model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet*, 2013;9(1):e1003175.
8. Musselman LP, Fink JL, Grant AR, Gatto JA, Tuthill BF 2nd, Baranski TJ. A Complex Relationship between Immunity and Metabolism in Drosophila Diet-Induced Insulin Resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 2017; 38(2):e00259-17.
9. Stevens MJ. Nitric oxide as a potential bridge between the metabolic and vascular hypotheses of diabetic neuropathy. *Diabetic Medicine*, 1995; 12(4):292-5.
10. Ahmed N, Tarannum S. Acetylcholinesterase activity in the brain of alloxan diabetic albino rats: Presence of an inhibitor of this enzyme activity in the cerebral extract. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 2009; 29(4):174-7.
11. Strilbytska O, Strutynska T, Semaniuk U, Burdylyk N, Bubalo V, Lushchak O. Dietary Sucrose Determines Stress Resistance, Oxidative Damages, and Antioxidant Defense System in Drosophila. *Scientifica (Cairo)*, 2022; 2022:7262342.
12. Im SH, Patel AA, Cox DN, Galko MJ. Drosophila Insulin receptor regulates the persistence of injury-induced nociceptive sensitization. *Dis Model Mech*, 2018; 11(5):dmm034231.
13. Velikova TV, Kabakchieva PP, Assyov YS, Georgiev TA. Targeting Inflammatory Cytokines to Improve Type 2 Diabetes Control. *BioMed Research International*, 2021; 2021:7297419.
14. Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF Study Group. *Neurology*, 1998; 51(3):695-702.
15. Locker GJ, Kofler J, Stoiser B, Wilfing A, Wenzel C, Wögerbauer M, Steger GG, Zielinski CC, Mader R, Burgmann H. Relation of pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide in patients receiving high-dose immunotherapy with interleukin-2. *European Cytokine Network*, 2000; 11(3):391-6.
16. Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL, Varesio L. IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J Immunol*, 1992; 148(3):795-800.
17. Cox AA, Sagot Y, Hedou G, Grek C, Wilkes T, Vinik AI, Ghatnekar G. Low-Dose Pulsatile Interleukin-6 As a Treatment Option for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2017; 8:89.
18. Andriambelison E, Baillet C, Vitte PA, Garotta G, Dreano M, Callizot N. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology*, 2006; 26(1):32-42.
19. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO reports*, 2007; 8(12):1142-8.
20. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998; 95(2):588-93.
21. Sarder M, Saito H, Abe K. Interleukin-2 promotes survival and neurite extension of cultured neurons from fetal rat brain. *Brain Research*, 1993; 625(2):347-50.
22. Kubick N, Klimovich P, Flournoy PH, Bieńkowska I, Łazarczyk M, Sacharczuk M, Bhaumik S, Mickael ME, Basu R. Interleukins and interleukin receptors evolutionary history and origin in relation to CD4+ T cell evolution. *Genes (Basel)*, 2021; 12(6):813.
23. Owusu-Ansah E, Perrimon N. Modeling metabolic homeostasis and nutrient sensing in Drosophila: implications for aging and metabolic diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 2014; 7(3):343-50.
24. Macdonald IA. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes. *European Journal of Nutrition*, 2016; 55(Suppl 2):17-23.
25. Ye JH, Tao L, Zalcman SS. Interleukin-2 modulates N-methyl-D-aspartate receptors of native mesolimbic neurons. *Brain Research*, 2001; 894(2):241-8.
26. Morris SN, Coogan C, Chamseddin K, Fernandez-Kim SO, Kolli S, Keller JN, Bauer JH. Development of diet-induced insulin resistance in adult Drosophila melanogaster. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1822(8):1230-7.
27. Rosenzweig M, Lorenzon R, Cacoub P, Pham HP, Pitoiset F, El Soufi K, Ribet C, et al. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2019; 78(2):209-217.
28. Abrahamzadeh MA, Karami M, Golrokh M., Measurement of AChE activity in the brain of sea, well- and river-fed white fish (*Rutilus frisi*) as a health index. *J Shahrekord Univ Med Sci*, 2004; 6(3): 33-38.
29. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961; 7:88-95.
30. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007; 43(5):645-57.
31. Sai Laxmi M and Prabhakar O. Inflammatory biomarkers as a part of diagnosis in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2021; 20(1):869-882.
32. Yao MZ, Gu JF, Wang JH, Sun LY, Lang MF, Liu J, Zhao ZQ, Liu XY. Interleukin-2 gene therapy of chronic neuropathic pain. *Neuroscience*, 2002; 112(2):409-16.

33. Araujo LM, Jouhault Q, Fert I, Bouiller I, Chiocchia G, Breban M. Effects of a low-dose IL-2 treatment in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2021; 23(1):193.
34. Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nature Neuroscience*, 2017; 20(5):674-680.
35. Sivakumar PV, Garcia R, Waggle KS, Anderson-Haley M, Nelson A, Hughes SD. Comparison of vascular leak syndrome in mice treated with IL21 or IL2. *Comparative Medicine*, 2013; 63(1):13-21.
36. Kolb H, Zielasek J, Treichel U, Freytag G, Wrann M, Kiesel U. Recombinant interleukin 2 enhances spontaneous insulin-dependent diabetes in BB rats. *European Journal of Immunology*, 1986; 16(2):209-12.
37. Dabbara H, Schultz A, Im SH. Drosophila insulin receptor regulates diabetes-induced mechanical nociceptive hypersensitivity. *MicroPubl Biol*, 2021; 2021: 10.17912/micropub.biology.000456.
38. Graham P, Pick L. Drosophila as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. *Curr Top Dev Biol*, 2017; 121:397-419.
39. Miao Y, Chen R, Wang X, Zhang J, Tang W, Zhang Z, Liu Y, Xu Q. Drosophila melanogaster diabetes models and its usage in the research of anti-diabetes management with traditional Chinese medicines. *Front Med (Lausanne)*, 2022; 9:953490.
40. Strange K. Drug Discovery in Fish, Flies, and Worms. *ILAR J*, 2016;57(2):133-143.
41. Ziegler D, Langen KJ, Herzog H, Kuwert T, Mühlen H, Feinendegen LE, Gries FA. Cerebral glucose metabolism in type 1 diabetic patients. *Diabetic Medicine*, 1994;11(2):205-9.
42. D. Modulation of neuro-inflammatory condition, acetylcholinesterase and antioxidant levels by genistein attenuates diabetes associated cognitive decline in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 2017; 268:93-102.
43. Hwang JJ, Jiang L, Hamza M, Sanchez Rangel E, Dai F, Belfort-DeAguiar R, Parikh L, Koo BB, Rothman DL, Mason G, Sherwin RS. Blunted rise in brain glucose levels during hyperglycemia in adults with obesity and T2DM. *JCI Insight*, 2017; 2(20):e95913.
44. Pasco MY, Léopold P. High sugar-induced insulin resistance in Drosophila relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36583
45. Araujo LM, Jouhault Q, Fert I, Bouiller I, Chiocchia G, Breban M. Effects of a low-dose IL-2 treatment in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2021; 23(1):193.
46. Mushtaq N, Schmatz R, Pereira LB, Ahmad M, Stefanello N, Vieira JM, Abdalla F, Rodrigues MV, Baldissarelli J, Pelinson LP, et al. Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function*, 2014; 32:287-293.
47. Vukšić A, Lovrić J, Konjevoda P, Blažević N, Bilušić M, Bradamante V. Effects of simvastatin and fenofibrate on butyrylcholinesterase activity in the brain, plasma, and liver of normolipidemic and hyperlipidemic rats. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2019; 70(1):30-35.
48. Darreh-Shori T, Vijayaraghavan S, Aeinehband S, Piehl F, Lindblom RP, Nilsson B, Ekdahl KN, Långström B, Almkvist O, Nordberg A. Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2013; 34(11):2465-81.
49. Tan Q, Min R, Dai GQ, Wang YL, Nan L, Yang Z, Xia J, Pan SY, Mao H, Xie WP, Wang H. Clinical and Immunological Effects of rhIL-2 Therapy in Eastern Chinese Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis. *Scientific Reports*, 2017; 7(1):17854.
50. O'Brien P, Han G, Ganpathy P, Pitre S, Zhang Y, Ryan J, Sim PY, Harding SV, Gray R, Preedy VR, Sanders TAB, Corpe CP. Chronic Effects of a High Sucrose Diet on Murine Gastrointestinal Nutrient Sensor Gene and Protein Expression Levels and Lipid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 22(1):137.
51. Richa R, Yadawa AK, Chaturvedi CM. Hyperglycemia and high nitric oxide level induced oxidative stress in the brain and molecular alteration in the neurons and glial cells of laboratory mouse, *Mus musculus*. *Neurochemistry International*, 2017; 104:64-79.
52. Wass CE, Andrezza A. The Redox Brain and Nitric Oxide: Implications for Psychiatric Illness. *Journal of Pharmacology & Clinical Toxicology*, 2013; 1:1008-1009.
53. Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 2007; 232(11):1458-64
54. Castrejón-Téllez V, Villegas-Romero M, Pérez-Torres I, Zarco G, Rubio-Ruiz ME, Carreón-Torres E, Díaz-Díaz E, Grimaldo OE, Guarnier-Lans V. Effect of Sucrose Ingestion at the End of a Critical Window that Increases Hypertension Susceptibility on Peripheral Mechanisms Regulating Blood Pressure in Rats. Role of Sirtuins 1 and 3. *Nutrients* 2019; 11(2):309.

## The Effect of Oral Administration of Recombinant Human Interleukin-2 on Molecular Markers of Diabetic Neuropathy in the Brain of *Drosophila Melanogaster*

Maedeh Imamjomeh<sup>1</sup>, Majid Hassanpourezatti<sup>\*1</sup>, Atefeh Hosseinali<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahid University, Tehran, Iran

### ABSTRACT

**Background:** In this study, the effect of oral administration of recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) on brain NO level and AChE activity in hyperglycemic conditions induced by high-sucrose diet (HSD), as a type-2 diabetes model, was investigated in *Drosophila melanogaster*.

**Methods:** In this experimental research, adult fruit flies of both sexes (30 in each group) were divided into the six groups: receiving normal diet (ND); high-sucrose diet (HSD); ND with rhIL-2 at 0.01 and 0.1 ng/ml; and HSD with rhIL-2 at 0.01 and 0.1 ng/ml. Flies were bred on these culture media for three weeks. At the end of the experiments, the brains of the flies were extracted, homogenized, and glucose, NO, and AChE activity levels were measured by the kit.

**Results:** Glucose level, AChE activity and NO level increased in brain homogenate of HFD flies compared to ND group. The body weight of HSD flies was reduced compared to the ND. Administration of rhIL-2 along with HFD significantly prevented these changes.

**Conclusion:** These findings suggest that rhIL-2 partially prevents diabetic neuropathy in *Drosophila*. It seems that the preventive effects of this compound are mediated through mechanisms dependent on nitric oxide and acetylcholinesterase in the brain.

**Keywords:** Recombinant Human Interleukin-2, Diabetic Neuropathy, *Drosophila Melanogaster*, Nitric Oxide, Acetylcholinesterase

\* Iran, Tehran, Khalij Fars Expressway, Opposite Holy Shrine of Imam Khomeini, Shahed University, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology. Tel: +982151212252, Fax: +982151212201, Email: Hassanpour@shahed.ac.ir

