

Effect of Aerobic Training, Vitamin D, and Injection of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Some Apoptotic and Anti-Apoptotic Indices of Beta-Pancreatic Cells in Diabetic Rats

Seyed Hosein Babae Sadati¹,
Abdolreza Jafari Chashmi²,
Seyed Abdollah Hashemvarzi²

¹ PhD Student in Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

(Received June 7, 2020 ; Accepted December 6, 2020)

Abstract

Background and purpose: Apoptosis is a protective cellular process that plays an important role in the development and homeostasis of natural tissues as well as disease-causing factors. Current study aimed at determining the effect of aerobic training, Vitamin D, and injection of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) on some apoptotic and anti-apoptotic indices of beta-pancreatic cells of streptozotocin (STZ) induced diabetic rats.

Materials and methods: In an experimental study, 80rats (220-240g, 8 weeks old) were randomly divided into 10 groups: Control, Sham, diabetics, ADSCs, exercise, Vitamin D, ADSCs +exercise, ADSCs +Vitamin D, exercise+ Vitamin D, and ADSCs +exercise+ Vitamin D. The exercise protocol included treadmill running at 60-70% VO₂max for 5 days a week/ 6 weeks. In ADSCs receiver groups, human ADSCs (1.5*10⁶ PBS/5mL) were injected to the tail vein. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg/kg) dissolved in citrate buffer, pH 4.5. Bax and Bcl2 values of beta pancreatic cells were measured following homogenization and centrifugation using ELISA. Data analysis was done applying one way analysis of variance and Tukey test.

Results: Significant differences were seen between the levels of Bax and Bcl2a well as the ratio of Bcl-2/Bax between diabetic group and control group and diabetic group and other groups (P=0.001). But, there were no significant differences between other groups (P=0.001).

Conclusion: It seems that all interventions, especially their combination, can have an increasing effect on Bcl2 values and decrease Bax values and the ratio of beta-pancreatic cells. So, they can be used as a Bax pharmacological method to reduce hyperglycemia-induced apoptosis on beta cells.

Keywords: progressive aerobic training, Adipose-derived stem cells, beta pancreatic cells, streptozotocin, Vitamin D

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (194): 11-22 (Persian).

* **Corresponding Author:** Seyed Hosein Babae Sadati - Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
(E-mail: zfotoukian@gmail.com)

تأثیر تمرین هوازی و مصرف ویتامین D همراه با تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر شاخص‌های آپوتوزی و ضد آپوتوزی سلول‌های بتای پانکراس رت‌های دیابتی

سید حسین بابایی ساداتی¹

عبدالرضا جعفری چاشمی²

سید عبدالله هاشم‌ورزی²

چکیده

سابقه و هدف: آپوتوز فرآیند سلولی محافظت‌کننده است که نقش مهمی در توسعه و هموستاز بافت طبیعی و نیز پیدایش بیماری‌ها دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر تمرین هوازی و مصرف ویتامین D به همراه تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر برخی از شاخص‌های آپوتوزی و ضد آپوتوزی سلول‌های بتای پانکراس رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین (STZ) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 80 سررت (با وزن 220-240 گرم و سن 8 هفته) به 10 گروه کنترل، شم، دیابت، تمرین، سلول، ویتامین، تمرین و سلول، تمرین و ویتامین، سلول و ویتامین، تمرین و سلول و ویتامین تقسیم شدند. گروه تمرینی 6 هفته و هفته‌ای پنج روز با شدت 60-70 درصد VO_{2max} به تمرین روی نوارگردان پرداختند. در گروه سلول به سیاهرگ دم موش‌های دیابتی، به کمک سرنگ انسولینی PBS/5ml حاوی $1/5 \times 10^6$ عدد سلول استخراج شده از بافت چربی انسانی تزریق شد. برای ایجاد مدل دیابت، STZ با دوز 60mg/kg در ترکیب با بفرسیترات و PH 4/5 درون صفاق تزریق شد. مقادیر Bax و Bcl2 سلول‌های بتای پانکراس، بعد از هموژنیزه و سانتریفیوژ به وسیله کیت آزمایشگاهی با روش الیزا اندازه‌گیری شد. داده‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی در سطح $P \leq 0/05$ آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بین سطوح Bax و Bcl2 و نسبت Bax/Bcl2 اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P=0/001$). براساس نتایج آزمون تعقیبی توکی این اختلاف بین گروه دیابت با کنترل و دیابت با تمامی گروه‌ها بوده ولی بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P=0/001$).

استنتاج: به نظر می‌رسد هر کدام از مداخلات، مخصوصاً ترکیب آن‌ها باعث تأثیرافزایی بر روی مقادیر Bcl2 و کاهش مقادیر Bax و نسبت Bcl-2/Bax سلول‌های بتای پانکراس داشته باشد و می‌تواند به‌عنوان یک روش غیردارویی برای کاهش عوارض آپوتوز ناشی از دیابت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی فزاینده، سلول بنیادی بافت چربی، سلول‌های بتای پانکراس، استرپتوزوسین، ویتامین D

مقدمه

بیماری قند خون یا همان دیابت، یکاختلال متابولیکی می‌باشد که به وسیله افزایش سطح گلوکز خون (هیپرگلیسمی) به دنبال نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین، یا هر دو مشخص می‌گردد. این بیماری

E-mail: syedhoseinbabaesadati@gmail.com

مؤلف مسئول: سید حسین بابایی ساداتی - ساری: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

1. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گرایش بیوشیمی و متابولیسم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ایران

2. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/3/18 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/3/25 تاریخ تصویب: 1399/9/16

مرگ سلول‌های بتای پانکراس که در نتیجه افزایش مقادیر پروتئین‌های پیش آپوپتوزی Bax ایجاد می‌شود را می‌توان با اتخاذ تدابیر گسترده‌ای به صورت‌های مختلفی درمان یا پیشگیری کرد که از آن جمله استفاده از روش سلول درمانی می‌باشد و شامل خود سلول‌های بتا، سلول‌های تمایز یافته (سلول‌های کبد، روده، طحال و...) و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی است. همچنین فعالیت‌های ورزشی و ویتامین D نیز می‌توانند در این زمینه مورد استفاده قرار گیرند (۱۲، ۱۳).

امروزه از سلول‌های بنیادی (Stem cell) برای جبران سلول‌های از دست رفته استفاده می‌شود. زیرا به‌عنوان یک روش برای جلوگیری از ایجاد آپوپتوز در بافت‌های مختلف در بین محققین رواج دارد (14). اما در این میان، سلول درمانی و استفاده از سلول‌ها، به‌ویژه سلول‌های بنیادی برای ترمیم بافت‌های از دست رفته، نتایج مفیدی را در بر داشته است. به‌عنوان مثال در انسان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (Adipose tissue-derived Stem Cells)، رشد سریع‌تری نسبت به سلول‌های بنیادی خون بندناف و استخوان دارند، همچنین توانایی تکثیری سلول‌های خون بندناف، نسبت به سلول‌های مغز استخوان بیش‌تر است (۱۵، ۱۶). مهم‌ترین امتیاز سلول‌های بنیادی بافت چربی این است که آن‌ها را می‌توان به راحتی از بیماران به دست آورد و همچنین به سادگی کشت داد. تکثیر سریع، حفظ خصوصیات چند توانی به مدت طولانی و بعد از چندین پاساژ، نشان می‌دهد که این سلول‌ها می‌توانند انتخاب مناسبی برای اهداف درمانی باشند (14). زیرا سلول‌های بنیادی بعد از آماده شدن، در محل ضایعه از طریق داخل وریدی تزریق می‌شوند (14). بعد از تزریق، این سلول‌ها می‌توانند به محل بافت مهاجرت کرده و در محل ضایعه تجمع پیدا کنند (17). این سلول‌ها موجب ایجاد سلول‌های جدید و ایجاد رگ‌های تازه و در کل، موجب بهبود عملکرد می‌شوند (15). روش دیگر برای درمان و پیشگیری، انجام منظم فعالیت ورزشی است. زیرا براساس مطالعات فعالیت

با اختلالات غدد درون ریز و عوارض متابولیکی حاصل از آن همراه است (1). سلول‌های بتای بالغ که در جزایر لانگرهانس پانکراس قرار دارند مسئول ترشح انسولین هستند (۲، ۳). اختلال در گیرنده‌های بتای انسولین یا گلوکوزی روی غشای سلول و یا به عبارتی افزایش مقاومت به انسولین، مشکل اصلی بیماران دیابتی نوع دو می‌باشد (4). همچنین در دیابت نوع دو، کاهش جرم سلولی سلول‌های بتا، منجر به پدیده آپوپتوتیک و در نهایت مرگ سلول‌های بتای پانکراس را خواهد شد (5). بعضی از محققین نیز معتقدند که واکنش‌های ایمنی و التهابی در دیابت نوع دو در درازمدت باعث ناهنجاری‌هایی از قبیل نوروپاتی، نفروپاتی، رتینوپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی می‌شوند (6). اما مکانیسم تخریب سلول‌های بتا در دیابت نوع یک، نتیجه بیماری، خودایمنی و خود التهابی می‌باشد (5). از آنجایی که حفظ توده سلول‌های بتای پانکراس، از تعادل بین نئوژنز، تکثیر و آپوپتوز ناشی می‌شود، آپوپتوز می‌تواند یک فرآیند سلولی محافظت کننده برای تکامل و ترمیم بافت‌ها باشد. زیرا هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، باعث کاهش یا افزایش نامتعارف مرگ سلولی می‌شود (7-9). رویدادهای مولکولی که منجر به فعالسازی و اجرای برنامه آپوپتوتیکی می‌شوند، اغلب به واسطه تعادل بین پروتئین‌های پیش و ضد آپوپتوزی در غشای میتوکنندری درالقا، شکل‌گیری، تنظیم و مهار آپوپتوز میتوکندریایی سلول‌های پانکراس نقش دارند (۱۰، ۱۱). به‌طور اختصاصی تر پروتئین‌های Bcl2 موجود در دیواره میتوکنندری‌ها به واسطه جلوگیری از رهاسدن سیتوکروم c و یا با اتصال به Apaf-1 مانع از تشکیل آپوپتوز می‌شود. جابه‌جایی پروتئین Bax به طرف میتوکنندری و جاسازی آن در داخل غشای بیرونی، سبب رهاسش سایر عوامل آپوپتوزی (مانند سیتوکروم c) از فضای بین غشایی میتوکنندری شده و در نهایت پیام‌های آپوپتوزی در فعالسازی کاسپازهای اثرکننده متداول از جمله کاسپاز-3 همگرا شده و باعث تخریب احتمالی سلول می‌گردند (10).

بتای پانکراس توسط محقق مشاهده نشده است، پژوهش حاضر به دنبال پاسخ به این سوال است که آیا این روش درمانی می تواند چشم انداز روشن تری در درمان آپوپتوز حاصل از بیماری دیابت در سلول های بتای پانکراس ایجاد کند یا خیر.

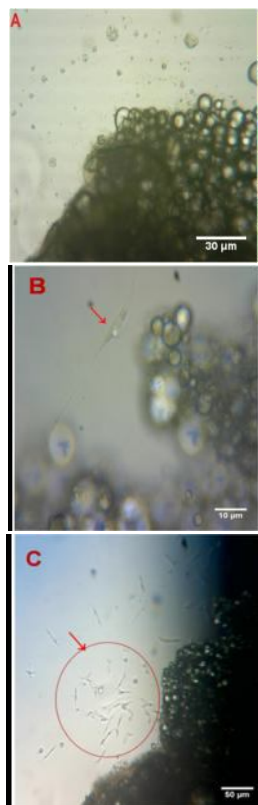
مواد و روش ها

در پژوهش حاضر، با تصویب کمیته ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی با شناسه اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1398.206 و با رعایت استانداردهای اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، 80 سر رت های نر بالغ 8 هفته ای نژاد ویستار با وزن تقریبی 220-240 گرم تهیه شد. رت ها توسط محقق در آزمایشگاه جوندگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به مدت یک هفته به منظور سازگاری با محیط نگهداری شدند. این حیوانات در 9 هفتهگی پس از آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان (ساخت ایران) به طور تصادفی به 10 گروه کنترل، دیابت، شم (جهت کنترل اثر استرس ناشی از تزریق)، سلول بنیادی، تمرین، ویتامین، سلول بنیادی+تمرین، سلول بنیادی+ویتامین، تمرین+ویتامین، سلول بنیادی+تمرین+ویتامین تقسیم شدند. جهت تطابق با محیط جدید، حیوانات به صورت گروه های 4 سر رت در قفس پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای 20 تا 25 درجه سانتی گراد در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی با رطوبت نسبی 55-45 درصد نگهداری شدند. جهت القای دیابت در موش ها، از محلول استرپتوزوسین (ساخت کشور چین) با دوز 60 میلی گرم در کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی (Intraperitoneal:IP) به حیوانات استفاده شد. 72 ساعت بعد از القای دیابت، از دم حیوان خون گیری شد. میزان قندخون با دستگاه گلوکومتر (Bionime مدل Gml 10 ساخت سوئیس) اندازه گیری شد. حیوانات با قندخون ناشتا بیش تر از 250 mg/dl دیابتی تلقی شدند. ویتامین D₃ از شرکت شیمیایی و دارویی کایمن (آلمان) تهیه شد. برای تهیه

ورزشی به عنوان یک درمان غیر دارویی نقش بسزایی در تنظیم و کاهش سیتوکین التهابی مرتبط با عملکرد سلول های بتای تولیدکننده انسولین، ایفا می کند (18، 19). همچنین تمرینات هوازی به عنوان یک روش درمانی مناسب، سطوح حامل های گلوکز در عضلات اسکلتی و همچنین سطوح سنتز گلیکوژن عضلات و هگزو کیناز را افزایش داده و باعث پیشرفت جذب گلوکز می شود و فسفوریلاز شدن را در پاسخ به تحریک انسولین و همچنین مقاومت به انسولین را بهبود و حساسیت به انسولین را افزایش می دهد و در پیشگیری از تخریب سلول های بتای پانکراس مؤثر می باشد. در نتیجه حجم و توده سلول های بتا از طریق فرایند های پلازمازی افزایش می یابد و این فرایند ناشی از افزایش و تکثیر سلول های بتای پانکراس و کاهش آپوپتوز سلولی می باشد (20). روش دیگری که امروزه محققان برای درمان و پیشگیری از آن استفاده می کنند، تجویز ویتامین D است. چرا که تحقیقات نشان داده است ویتامین D به طور مستقیم می تواند بر عملکرد انسولین به واسطه تحریک بیان گیرنده های انسولین و تنظیم فرایندهای درون سلولی میانجی شده از انسولین، از طریق تنظیم ذخیره کلسیم و افزایش آن بر روی سلول های بتای پانکراس، اثرگذار باشد. همچنین گزارش شده که 1 و 25 هیدروکسی ویتامین D می تواند با اتصال به گیرنده هسته ای موجود بر ژن سنتزکننده رسپتورهای غشایی انسولین، سبب افزایش سنتز این رسپتورها و در نتیجه حضور بیش تر ناقل های وابسته به انسولین در سطح سلول شود. کمبود ویتامین D موجب اختلال در ترشح انسولین، کاهش فعالیت GLUT4 و افزایش مقاومت به انسولین می گردد (21).

با توجه به این که اکثر تحقیقات انجام شده به اثر جداگانه ورزش و سلول بنیادی و ویتامین D پرداخته شده و اثر تعاملی مصرف ویتامین D و تمرینات هوازی به همراه تزریق درون وریدی سلول بنیادی مشتق از بافت چربی در رت های دیابتی شده با استرپتوزوسین (STZ:Streptozotocin) بر سطوح Bax و Bcl-2 سلول

دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند و محیط کشت سلول‌ها با فواصل زمانی دو روز یک‌بار تعویض شد. زمانی که تراکم سلول به میزان 80 حجم پلاسکو رسید با استفاده از آنزیم Trypsin-EDTA سلول‌های چسبیده به کف ظرف جدا شدند و به نسبت 1 به 3 در محیط کشت حاوی FBS رقیق گردیدند. سپس با توجه به تعداد سلول‌های جدا شده، آن‌ها به فلاسک‌های کشت جدید با محیط کشت حاوی 10 درصد FBS و با 1 درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استرپتومایسین) انتقال داده شدند و مجدداً به داخل انکوباتور با شرایط دمایی 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد دی‌اکسیدکربن باز گردانده شدند. اولین مشاهدات ما 24 ساعت بعد از کشت و خروج سلول‌ها به وسیله دوربین عکس برداری متصل به میکروسکوپ نوری تصویربرداری و ضبط شد (تصویر شماره 1) (۲۲، ۲۳).



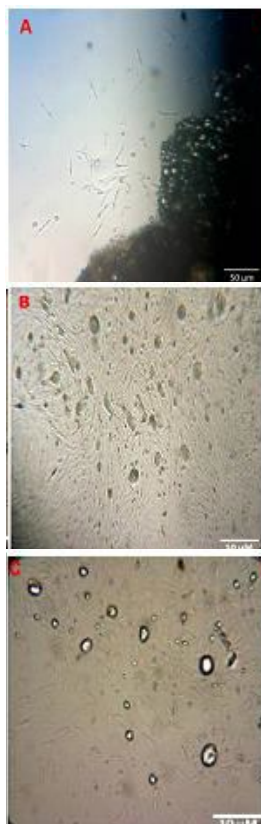
تصویر شماره 1: تصاویر بافت چربی کشت شده به روش آنزیمی. (A) بافت چربی بلافاصله بعد از کشت (B) بافت چربی 48 ساعت بعد از کشت که اولین سلول‌ها در حال خارج شدن از بافت می‌باشند.

مکمل، 100 میکروگرم کلسیتریول در یک میلی‌لیتر از حلال پروپیلن گلیکولترکیب و سپس در سالیان 9 درصد حل شد. ویتامین D3 با دوز یک میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن برای دو هفته اول هفته ای دوبار و چهار هفته آخر هفته‌ای یک‌بار، در مجموع هشت مرحله، برای هر رت گروه دریافت‌کننده مکمل به صورت صفاقی تزریق شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی

برای تهیه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، قطعات چربی از ناحیه اطراف شکم بیماران (30 تا 40 سال) مراجعه‌کننده به بخش جراحی جهت عمل لیپوساکشن گرفته شد. بافت مورد نظر بعد از عمل لیپوساکشن درون محفظه استریل در دمای محیط به آزمایشگاه و به پتری دیش استریلی که بر روی یخ قرار داشت منتقل شده و به آرامی و با استفاده از قیچی و تیغ بیستوری به قطعات ریز به اندازه تقریبی 1 تا 2 میلی‌متر مکعب تبدیل شد و جهت زدودن سلول‌های خونی و قطعات بافتی دیگر، چندین مرتبه توسط PBS شستشو داده شد و سپس این قطعات، به فالکون حاوی آنزیم Trypsin-EDTA با غلظت 25 درصد منتقل شدند.

ظرف حاوی قطعات ریز چربی همراه با آنزیم Trypsin-EDTA و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد دی‌اکسیدکربن به مدت حداقل 60 دقیقه به دستگاه انکوباتور منتقل شد. پس از طی زمان لازم برای هضم بافت، برای مهار فعالیت آنزیم هضم‌کننده، به میزان دو برابر حجم آنزیم، محیط کشت DMEM حاوی FBS افزوده شد. پس از مهار فعالیت آنزیم، فالکون حاوی نمونه، به مدت 5 دقیقه با دور 2000 rpm سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ سطح رویی فالکون جدا و دور ریخته شده و سطح زیری آن که فاز مایع می‌باشد، به فلاسک کشت انتقال داده شد و محیط کشت حاوی 10 درصد FBS و یک آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استرپتومایسین) به فلاسک کشت افزوده شد. سلول‌های درون انکوباتور در شرایط دمایی 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد



تصویر شماره 2: نمای میکروسکوپی بافت چربی کشت شده به روش آنزیمی. (A) جمعیت اولیه سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی (B) پاساژ اول سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی که کاملاً دوکی شکل بوده و با سرعت تکثیر می شوند (C) پاساژ سوم که جمعیت یکنواختی از سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی رویت می شوند. (تصویر A با بزرگ نامی 40x تصویر B با بزرگنمایی 100x و تصویر C با بزرگ نامی 100x).

گروه های تمرینی روی نوارگردان به مدت 6 هفته به تمرین هوازی پرداختند. در پژوهش حاضر از سرعت تمرینی 18 تا 10 متر در دقیقه معادل 70-60 درصد VO_{2max} استفاده شد (جدول شماره 1) (23).

جدول شماره 1: جزئیات پروتکل تمرین هوازی شش هفته ای مورد استفاده در پژوهش

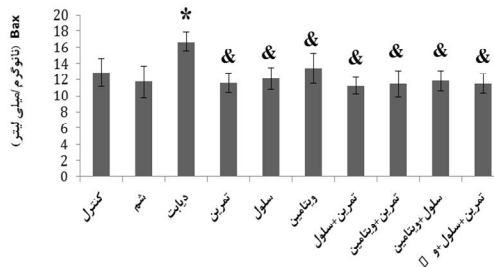
شماره هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
متغیرهای تمرین	10	10	14-15	14-15	17-18	17-18
سرعت به متر در دقیقه	10	20	20	30	30	30
مدت فعالیت به دقیقه	5	5	5	5	5	5
تعداد جلسات تمرین در هفته	5	5	5	5	5	5

(C) خروج، تکثیر، و رشد سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی 72 ساعت بعد از کشت قطعات بافت چربی. (تصویر A با بزرگ نامی 40x تصویر B با بزرگنمایی 200x و تصویر C با بزرگ نامی 100x).

آنالیز فلوسایتومتری

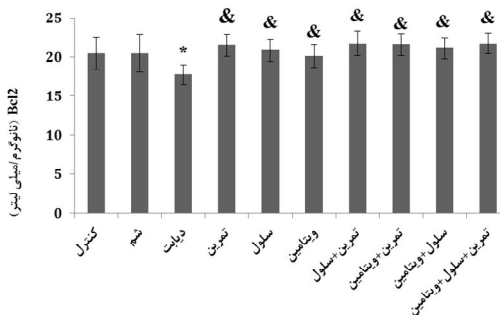
برای تعیین هویت و اثبات بنیادی بودن سلول های جدا شده از بافت های چربی، روش های متنوعی وجود دارد که مرسوم ترین روش برای تایید بنیادی بودن سلول های مزانشیمی، بررسی نشانگرهای سطحی این سلول ها به وسیله تکنیک فلوسایتومتری است. در این پژوهش، آنتی بادی های کوئزوگه FITC Mouse Anti-Rat CD90 و PE Mouse Anti-Rat CD29 و همچنین آنتی بادی کنترل مورد استفاده قرار گرفت. بعد از پاساژهای متوالی، در پاساژ سوم که سلول ها به طور کامل همگن شدند از آنزیم Trypsin-EDTA برای جدا کردن سلول های چسبیده به کف ظرف استفاده شد. سپس شمارش سلولی با کمک لام نتوبار انجام گرفت و تعداد $1/5 \times 10^6$ عدد سلول بنیادی شمارش شد. در مرحله بعدی آنتی بادی های نشان دار شده در یک محیط تاریک با غلظت مناسب (نسبت 1:10) اضافه شد و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و به دنبال آن میزان بیان مارکرهای سطحی و درصد جمعیت های سلولی بیان کننده این مارکرها با دستگاه فلوسایتومتری becton Dickinson و نرم افزار FLOWJ/6 ارزیابی شد (۲۳، ۲۲). در نهایت بعد از تعیین هویت جهت تزریق به مدل حیوانی آماده شده و پس از القای بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین 10 درصد و با دوز 50 میلی گرم در کیلوگرم و زایلازین 2 درصد با دوز 10 میلی گرم در کیلوگرم، دم موش را به مدت یک دقیقه در آب گرم نگه داشته تا عروق دم متسع شوند و بدین سان سیاهرگ دمی نمایان شود. سپس به کمک سرنگ انسولینی بعد از شستشو سلول ها با PBS و پیپتاژ کردن در محیط کشت، با استفاده از لام نتوبار، حدود $1/5 \times 10^6$ عدد سلول بنیادی استخراج شده از بافت چربی انسانی به سیاهرگ دم موش های دیابتی تزریق شد (تصویر شماره 2) (22).

تمرین و تمرین + سلول، ویتامین، تمرین + ویتامین، سلول + ویتامین افزایش معنی داری نسبت به گروه دیابت داشته است ($P < 0/0001$) که این افزایش در گروه تمرین + سلول و تمرین + سلول + ویتامین مشهودتر بود (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 1: میانگین و انحراف استاندارد مقادیر Bax در گروه های مختلف پژوهش

*؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه کنترل
&؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه دیابت



نمودار شماره 2: میانگین و انحراف استاندارد مقادیر Bcl2 در گروه های مختلف پژوهش

*؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه کنترل
&؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه دیابت

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که نسبت سطوح Bax/Bcl2 گروه دیابت، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری دارد ($P < 0/0001$). همچنین سطوح Bax/Bcl2 در گروه های مختلف پژوهش نسبت به گروه دیابت کاهش معنی داری داشته است ($P < 0/0001$) که این کاهش در گروه تمرین + سلول مشهودتر بود (نمودار شماره 3).

به منظور تهیه بافت پانکراس، ابتدا موش ها با ترکیب کتامین زایلازین به نسبت 60 به 40 بیهوش شدند. بلافاصله پس از شکافتن قفسه سینه و شکم، پانکراس جدا و در نیتروژن مایع قرار گرفت. پس از منجمد شدن، بافت در یخچال مخصوص در دمای 80- درجه نگهداری شد. بعد از هموژنیزه و سانتریفیوژ، میزان غلظت شاخص ها به وسیله کیت آزمایشگاهی شرکت HANGZHOU چین با روش الیزا ریدر با طول موج 540 نانومتر خوانده شده و با 88 درصد حساسیت اندازه گیری شد. در این مطالعه به منظور بررسی تفاوت های موجود بین گروه ها از آنالیز واریانس یکطرفه (ONE-WAY ANOVA) استفاده شد. همچنین از آزمون تعقیبی توکی (TUKEY) برای تعیین تفاوت بین گروه ها و برای بررسی نرمال بودن از آزمون کولمگروف اسمیرنوف استفاده شد. در این بررسی ها سطح معنی داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد. همه تجزیه و تحلیل های آماری به وسیله نرم افزار SPSS نسخه 20 انجام شد.

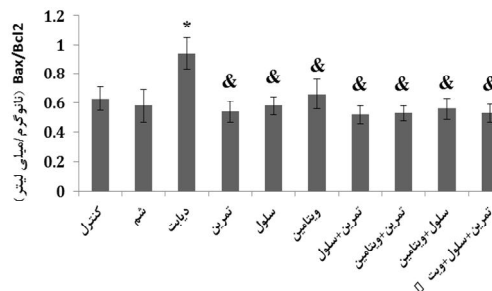
یافته ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه، اختلاف معنی داری بین سطوح Bax، Bcl2 و نسبت Bax/Bcl2 سلول های بتای پانکراس رت های دیابتی در بین گروه های مختلف را نشان داد ($P = 0/001$). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح Bax در گروه دیابت، افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($P < 0/0001$). در گروه های سلول، تمرین، تمرین + سلول، ویتامین، تمرین + ویتامین، سلول + ویتامین و همچنین گروه ترکیبی (تمرین + سلول + ویتامین) کاهش معنی داری نسبت به گروه دیابت مشاهده شد ($P < 0/0001$) که این کاهش در گروه تمرین + سلول مشهودتر بود (نمودار شماره 1).

همچنین، نشان داده شده که سطوح Bcl2 در گروه دیابت، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P < 0/0001$). سطوح Bcl2 در گروه های سلول،

سلولی از نوع آپوتوز در سلول های قلبی شده است (24). همچنین نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیقات Krüger و همکاران (2009) (24)، Allen و همکاران (2015) همسو بود (25). در پژوهش حاضر انجام شش هفته تمرین هوازی و مصرف ویتامین D و تزریق سلول های بنیادی بافت چربی باعث افزایش عوامل ضد آپوتوزی (Bcl2) و کاهش عوامل آپوتوزی (Bax) شد. به نظر می رسد استفاده همزمان از این متغیرها می تواند به عنوان یک مکانیسم محافظتی برای سلول در برابر آپوتوز، و همچنین افزایش بیان پروتئین کیناز B باشد، چراکه افزایش بیان و افزایش فعالیت پروتئین کیناز B، از طریق فسفوریلاسیون پروتئین های ضد آپوتوز خانواده Bcl-2 و غیرفعالسازی پروتئین پیشبرنده آپوتوز مانند Bax و یا از طریق مهار مستقیم فعالیت کاسپازی باعث مسدود کردن مسیرهای آپوتوز می گردد (26). همچنین مطالعات گزارش کردند که سطوح پروتئین کیناز B در نمونه های جانوری در اثر دیابت کاهش می یابد (26). اما استرس اکسایشی ناشی از گونه های فعال اکسیژنی به شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است و زمانی که سطوح آنها بیش از ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول باشد، می تواند مرگ سلولی را از طریق مسیرهای مختلف راه اندازی کند (27). در مطالعه حاضر پس از تزریق سلول های بنیادی بافت چربی بر رت های دیابتی، مشاهده شده که سطح Bcl-2 سلول های بتای پانکراس افزایش و سطح Bax کاهش داشته که به دنبال آن، قند خون رت ها کاهش معنی داری داشته که بیانگر جایگزینی سلول های بنیادی و تمایز آنها به سلول های بتا، جهت تولید هورمون انسولین که نشان دهنده عملکرد صحیح سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی بوده که با یافته های تحقیق علی مرادی و همکاران (1394) همسو بود (28).

Capitelli و همکاران (2014)، بیان کردند که می توان از سلول های بنیادی به عنوان یک محصول جدید برای جایگزینی سلول های عصبی مرده، بازسازی انتقال



نمودار شماره 3: میانگین و انحراف استاندارد نسبت Bax/Bcl2 در

گروه های مختلف پژوهش

*؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه کنترل

&؛ نشانه اختلاف معنی دار با گروه دیابت

بحث

داده های حاصل از مطالعه حاضر، افزایش قابل توجه و معنی دار سطوح Bcl2 و همچنین کاهش مقادیر Bax و نسبت Bcl-2/Bax سلول های بتای پانکراس رت های دیابتی که تمرین ورزشی را روی نوارگردان به مدت شش هفته به همراه تزریق سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی و ویتامین D دریافت کرده بودند، نشان داد. لذا به نظر می رسد هر کدام از مداخله ها، مخصوصا ترکیب آنها می تواند به واسطه تاثیر افزایشی روی عوامل ضد آپوتوزی (Bcl2) و کاهش عوامل آپوتوزی (Bax)، به عنوان یک عامل حفاظتی برای سلول های بتای پانکراس در برابر بیماری دیابت باشد. همچنین همسو با این تحقیق، Mauricio و همکاران (2018)، به بررسی اثر تمرین هوازی بر نشانگرهای آپوتوز (Bax) در سلول های عضلانی قلب موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه آنها علت وقوع آپوتوز سلول های قلبی در اثر دیابت، علاوه بر افزایش استرس های اکسیداتیو و وقوع فرآیند التهابی، حضور سایتوکاین های IL-1 β ، TNF. α ، IFN. γ بوده که تأثیر بسزایی در تولید اکسید نیتریک داشته که در نهایت با افزایش Fas لیگاند به وسیله سلول های التهابی و قلبی مواجه شده و باعث افزایش عامل آپوتوزی (Bax) و در نهایت، مرگ

چرا که یافته‌های به‌دست آمده از مطالعه حاضر بیان کرد که تمرین ورزشی آثار به مراتب بیش‌تر و مفیدتری نسبت به تجویز ویتامین D دارد. عدم همسویی مطالعه حاضر با تحقیق فوق را می‌توان با نوع بافت مورد مطالعه (آتورت) و همچنین به رت‌های مسموم شده با آب اکسیژنه نسبت داد که باعث ایجاد نتایج متفاوت شده است. آثار ترکیب ورزش و تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی همراه با مصرف ویتامین D می‌تواند به صورت چند مکانیزم احتمالی توضیح داده شود. اول این که ترکیب و استفاده همزمان از این متغیرها، می‌تواند در مسیر تولید بیان پروتئین مهارگر آپوپتوز Bcl-2 نقش مثبتی داشته باشد که در پژوهش حاضر این پروتئین افزایش معنی‌داری داشت که احتمالاً دلیلی بر بروز واکنش‌های جبرانی ضد آپوپتوزی است. با توجه به این که Bcl-2 مانع افزایش Bax می‌شود، به نظر می‌رسد افزایش Bcl-2 یکی از مکانیسم‌های سرکوب‌کننده Bax بوده است (31). افزایش Bcl-2 با تحکیم دیواره میتوکندری، سرکوب Bax، جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c، تنظیم کلسیم رهاشده از سارکوپلاسمیک و کاهش اثر رادیکال‌های آزاد (Reactive oxygen species: ROS) ناشی از فعالیت ورزشی، ایمنی سلول را بالا برده و از آپوپتوز ناشی از استرس جلوگیری می‌کند (32). از طرف دیگر مکانیسم‌های مطرح شده در مورد اثرات سلول بنیادی مشتق از بافت چربی همراه با تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین D در رت‌های دیابتی نشان می‌دهد این سلول‌ها بعد از ورود به جریان خون از جدار عروق عبور کرده و وارد بافت‌های آسیب دیده می‌شوند و لانه‌گزینی می‌کنند. سپس سلول‌های پیوندی در ارگان آسیب دیده تحت تاثیر محیط جدید خود به سلول‌های بافت مورد نظر تمایز یافته و در نهایت از لحاظ ساختاری و عملکردی جایگزین بافت صدمه دیده می‌شوند (33، 32). در خصوص مکانیسم اثرات تعاملی متغیرهای وابسته پژوهش، مشخص شده است که افزایش سطوح Bcl2 در پژوهش حاضر و همچنین در

دهنده‌ها، و تحریکات یا ایمپالس‌های عصبی و فراهم کردن آثار نوروتروفیک استفاده کرد. همچنین به نظر می‌رسد پیوند این سلول‌ها همراه با مصرف ویتامین D می‌تواند به عنوان یکی از راهکارهای درمانی مناسب و جدید برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری دیابت، آلزایمر، پارکینسون و نوروپاتی‌ها مورد توجه قرار گیرد (22). همچنین در پژوهش‌های مختلف نشان داده شد که احتمالاً سلول‌های بنیادی تزریق شده همراه با مصرف ویتامین D تحت تأثیر محیط اطرافشان و همچنین فاکتورهای رشد از جمله VEGF، BDNF و NGF قرار گرفته و سایتوکین‌ها را ترشح می‌کنند که با مکانیسم‌های اتوکراین و یا پاراکراین بر خود و سلول‌های میزبان اثر گذار بوده و این اثرگذاری نه تنها میزان بقا و تمایز سلولی را افزایش می‌دهند، بلکه منجر به عصب‌دهی مجدد و برقراری ارتباط عصبی نیز می‌شوند (23). همچنین همسو با مطالعه حاضر در پژوهش هاشم‌ورزی و همکاران (1395)، عنوان شده پیوند سلول‌های بنیادی می‌تواند باعث بازسازی و ترمیم بافت‌های مختلف آسیب دیده شود که مکانیزم پیشنهادی این پژوهش به واسطه افزایش در سطوح VEGF و عوامل رشد عروقی و فرایند آنژیوژنز در بافت مغزی می‌باشد (29). در پژوهش حاضر گروه ترکیبی تمرین و ویتامین باعث افزایش سطوح Bcl2 و کاهش Bax شد در همین راستا پژوهشی که توسط مهتابی علمداری و همکاران (1398)، در مورد اثر ویتامین D و تمرین تداومی بر نشانگرهای آپوپتوز بافت آتورت در رت‌های مسموم شده با آب اکسیژنه انجام شد، نشان داد که هرچند تمرین ورزشی سبب افزایش پروتئین Bcl-2 شد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود، اما سبب کاهش معنی‌دار Bax شد، که با پژوهش حاضر همخوانی ندارد، همچنین عنوان شده است که تجویز ویتامین D به تنهایی سبب مهار عوامل منجر به آپوپتوز شده و آثار به مراتب قوی‌تری در مقایسه با تمرین ورزشی تداومی بر ضد آپوپتوز از خود نشان داد که با یافته‌های تحقیق حاضر همسو نیست (30).

عنوان یک روش غیردارویی برای کاهش عوارض آپوتوز در سلول های بتای پانکراس ناشی از دیابت استفاده شود.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی با گرایش بیوشیمی و متابولیسم در ورزش است که با رعایت کامل اصول اخلاقی هلسینگی با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1398.206 در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تصویب شده است، لذا از مساعدت و همکاری تمام کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند بخصوص اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی ساری که موجب تسهیل اجرای پژوهش شدند، تقدیر و تشکر می گردد.

گروه های تحت درمان، تاثیر بسزایی در کاهش پروتئین های پیش آپوتوزی Bax، از طریق به حداقل رساندن نفوذپذیری میتو کندری، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش ایمنی سلول و تعدیل استرس اکسایشی و کاهش ژن های پیش آپوتوزی داشت. این نکته ضروری است که اندازه گیری شاخص هایی از قبیل سیتوکروم c و ROS، شاخص های مربوط به ظرفیت آنتی اکسیدانی جزو محدودیت های مطالعه حاضر بودند. در نهایت نتیجه گیری می شود، با توجه به نقش مثبت Bcl2 در سلول های بتای پانکراس در کاهش اثرات منفی ناشی از بیماری دیابت، پیشنهاد می شود، از ترکیب تزریق سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی با مصرف ویتامین D همراه با انجام تمرینات ورزشی هوازی بعنوان یک راهکار حفاظتی و درمانی در جهت کاهش آسیب ها ناشی از این بیماری و همچنین به

References

- Havilah P, Pandit Vinodh B, Durga Prasad K. Adenosine Deaminase Activity in Type-2 Diabetes Mellitus-An Independent Marker of Glycemic Status and Stimulator of Lipid Peroxidation. *Int J Chem and Life Sciences* 2013; 02(06): 1175-1178.
- Eickhoff H, Guimaraes A, Louro TM, Seica RM, Sousa FC. Insulin resistance and beta cell function before and after sleeve gastrectomy in obese patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes. *Surg Endosc* 2015; 29(2): 438-443.
- Zhang T, He H, Yang HL, Huang HJ, Zhang MF, An ZM, et al. Study of glycosylated albumin cut-off point in diabetes mellitus and impaired glucose regulation. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2014; 45(2): 274-277.
- Krishna KA, Rao GV, Rao KS. Stem cell-based therapy for the treatment of Type 1 diabetes mellitus. *Regenerative Med* 2007; 2(2): 171-177.
- Yiu KH, Tse HF. Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(6): 1136-1143.
- Sharma A, Ezekowitz JA. Diabetes, impaired fasting glucose, and heart failure: it's not all about the sugar. *Eur J Heart Fail* 2014; 16(11): 1153-1156.
- Hu MJ, Ruan GP, Yao X, Ruan GH, Wang JX, Pang RQ, et al. Induced autologous stem cell transplantation for treatment of rabbit type 1 diabetes. *Cell Biol Int* 2013; 37(6): 624-632.
- Quadriatero J, Bombardier E, Norris SM, Talanian JL, Palmer MS, Logan H, et al. Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA

- fragmentation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2010; 298(3): E534-E547.
9. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Dillio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(5): 330-349.
 10. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol* 2008; 102(5): 515-524.
 11. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; 18(10): 1150-1152.
 12. Noguchi H. Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes. *World J Stem Cells* 2009; 1(1): 36-42.
 13. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. *Gut* 2008; 57(10): 1456-1468.
 14. Moradi A, Mohammadi S, Hamidi Alamdari D. Effect of adipose tissue-derived stem cells on the control of the blood glucose level in diabetic rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2015; 23(8): 717-726 (Persian).
 15. Krishna KA, Rao GV, Rao KS. Stem cell-based therapy for the treatment of Type 1 diabetes mellitus. *Regenerative Med* 2007; 2(2): 171-177.
 16. Lock LT, Tzanakakis ES. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Engineering* 2007; 13(7): 1399-1412.
 17. Guo F, Lv S, Lou Y, Tu W, Liao W, Wang Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell Biol Int* 2012; 36(11):997-1004.
 18. De Salles Bf, Simão R, Fleck SJ, Dias I, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. Effects of resistance training on cytokines. *Int J Sports Med* 2010; 31(7):441-450.
 19. Tang Z, Yuan L, Gu C, Liu Y, Zhu L. Effect of exercise on the expression of adiponectin mRNA and GLUT 4 mRNA in type 2 diabetic rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25(2):191-193.
 20. Eizadi Mojtaba, Laleh Behboudi. Effect of Acute and Chronic Exercise on Beta-Cell Function in Diabetic Patients. *Knowledge & Health* 2012; 6(4): 15-19 (Persian).
 21. Bonakdaran S, Varasteh A, Khaajeh-Dalouie M. Serum 25 Hydroxy Vitamin D3 and Laboratory Risk Markers of Cardiovascular Diseases in Type 2 Diabetic Patients. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2010; 11(5): 504-509.
 22. Kang X, Huadong X, Sasa T, Xiaoyu Z, Zijun D, Li Z. Dopamine release from transplanted neural stem cells in Parkinsonian rat striatum in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(44): 1504-1509.
 23. Hashemvarzi SA, Heidarianpour A. Preconditioning Effect of Aerobic Exercise with D3 Vitamin Consumption on VEGF Levels in the 6-OHDA Lesioned Parkinson's Disease Rat Model. *Sport Physiology* 2016; 8(30): 129-142 (Persian).
 24. Krüger K, Frost S, Most E, Völker K, Pallauf J, Mooren FC. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296(5): R1518-R1527.

25. Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2015; 16(12):705-713.
26. Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2014; 340(1-2): 107-115.
27. Moradi A, Mohammadi S, Hamidi Alamdari D. Effect of adipose tissue-derived stem cells on the control of the blood glucose level in diabetic rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2015; 23(8): 717-726 (Persian).
28. Capitelli CS, Lopes CS, Alves AC, Barbiero J, Oliveira LF, Silva VJ, et al. Opposite Effects of Bone Marrow-Derived Cells Transplantation in MPTP-rat Model of Parkinson's Disease: A Comparison Study of Mononuclear and Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Medical Sciences* 2014; 11(10): 1049-1064.
29. Mahtabi Alamdari J, Matin Homaei H, Farzaneghi P. The Effects of Vitamin D and Continuous Training on Apoptosis Markers in Aorta Tissue of Rats Exposed to Hydrogen Peroxide (H₂O₂). *Sport Physiology* 2019; 10(40): 163-178 (Persian).
30. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* (2008); 105(6): 1934-1943.
31. Lock LT, Tzanakakis ES. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng* 2017; 13(7): 1399-1412.
32. Zhao Y, Lin B, Dingeldein M, Guo C, Hwang D, Holterman MJ. New type of human blood stem cell: a double-edged sword for the treatment of type 1 diabetes. *Transl Res* 2010; 155(5): 211-216.