

## *Histological Evaluation of Pancreas Following Early Life Stress in Exposure to Pubertal Stress in Male Rats*

Homeira Zardooz<sup>1</sup>,  
Forouzan Sadeghimahalli<sup>2,3</sup>,  
Mina Salimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Neurophysiology Research Center, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 11, 2019 ; Accepted January 29, 2020)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Stressful events in early-life induce metabolic disorders in adolescence. The aim of this study was to investigate the effect of early-life stress on number or area of Langerhans islets in exposure to foot-shock and psychological stress in male rats.

**Materials and methods:** The rats were divided into six groups: control (without stress), early-stress (stress at 2 weeks of age), pubertal-foot shock (at 8-10 weeks of age), pubertal-psychological stress (psychological stress at 8-10 weeks of age), early-stress + pubertal-foot shock (stress at 2 weeks and foot-shock at 8-10 weeks of age), early-stress + pubertal-psychological stress (early-stress at 2 weeks and psychological stress at 8-10 weeks of age). Stress was induced for five consecutive days (twice daily). At the end of the experiment, following anesthesia with pentobarbital, the rats were decapitated and dissected to remove pancreas tissue to measure the number and area of islets.

**Results:** Early-life and pubertal stresses alone did not change the number or area of islets. Compared to other interventions, early-life psychological-stress could considerably change the number or area of pancreatic islets.

**Conclusion:** Early life stress predisposes the organism to morphological changes in endocrine pancreas as an increase in Langerhans islets number or area in exposure to stress later in life.

**Keywords:** early life stress, psychological stress, physical stress, Langerhans islets

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(182): 91-98 (Persian).

\* Corresponding Author: Forouzan Sadeghimahalli - Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: sadeghi.f.ph@gmail.com)

# ارزیابی هیستولوژی پانکراس به دنبال استرس دوران شیرخوارگی در مواجهه با استرس دوران بلوغ در موش های صحرایی نر

حمیرا زردوز<sup>1</sup>فروزان صادقی محلی<sup>۲،۳</sup>مینا سلیمی<sup>1</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** وقایع استرس زا در دوران شیرخوارگی، اختلالات متابولیکی در دوران بلوغ را ایجاد می کند. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر استرس دوران شیرخوارگی بر تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس پانکراس در مواجهه با استرس شوک الکتریکی و روانی دوران بلوغ در موش های صحرایی نر بالغ بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نر به 6 گروه کنترل (بدون استرس)، early-stress (استرس فقط در 2 هفتگی)، pubertal-foot-shock (شوک الکتریکی در 10-8 هفتگی)، pubertal-psychological (استرس روانی در 10-8 هفتگی)، early+pubertal-foot-shock (استرس در 2 هفتگی و شوک الکتریکی در 10-8 هفتگی) و early+pubertal-psychological (استرس در 2 هفتگی و استرس روانی در 10-8 هفتگی) تقسیم شدند. استرس روزی 2 بار به مدت 5 روز متوالی القا گردید. در پایان آزمایش، حیوانات بالغ پس از بیهوشی با پنتوباریتال، سرهایشان جدا و بافت پانکراس آن ها برای اندازه گیری تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس تحت بررسی بافتی قرار گرفت.

**یافته ها:** استرس های دوران شیرخوارگی و بلوغ به تنهایی تغییرات چشمگیری در تعداد و مساحت جزایر ایجاد نکردند. اما استرس روانی بیش از استرس فیزیکی توانست در مواجهه با استرس شیرخوارگی تعداد و مساحت جزایر را به طور قابل ملاحظه ای نسبت به سایر گروه ها تغییر دهد.

**استنتاج:** موجود زنده در صورت استرس دوران شیرخوارگی، زمانی که در دوران بعدی حیات در معرض استرس قرار می گیرد، مستعد تغییرات مورفولوژیکی در بافت اندوکرین پانکراس به صورت افزایش در تعداد و مساحت جزایر می کند.

**واژه های کلیدی:** استرس دوران شیرخوارگی، استرس روانی، استرس فیزیکی، جزایر لانگرهانس

## مقدمه

به اثرات مخرب استرس در دوره های بعدی زندگی را افزایش می دهد. این آسیب پذیری می تواند به صورت اختلالاتی نظیر اختلالات متابولیک از جمله دیابت و سندرم متابولیک بروز نماید (3-8). مطالعات متعدد نشان

استرس حالتی است که شرایط هموستاز بدن را تهدید می کند و در درازمدت خطر ابتلا به بسیاری از اختلالات را افزایش می دهد (1،2).  
وقایع استرس زا در مراحل اولیه زندگی آسیب پذیری

E-mail: sadeghi.f.ph@gmail.com

**مؤلف مسئول: فروزان صادقی محلی - ساری:** کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

1. دانشیار، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. استادیار، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

☞ تاریخ دریافت: 1398/8/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/8/27 تاریخ تصویب: 1398/10/29

گروه pubertal-psychological: حیوانات در سن بلوغ استرس روانی گرفتند.

گروه early-stress: حیوانات فقط در سن 2 هفتگی شوک دریافت کردند.

گروه early+pubertal-foot shock: حیوانات در سن 2 هفتگی و بلوغ شوک الکتریکی گرفتند.

گروه early+pubertal-psychological: حیوانات در سن 2 هفتگی شوک و در هنگام بلوغ استرس روانی گرفتند.

یک روز پس از پایان استرس دوران بلوغ، حیوانات کلیه گروه‌ها پس از بیهوشی با ایزوفلوران سرشان جدا شده و پانکراس آن‌ها برای مطالعه بافتی که شامل اندازه‌گیری تعداد و مساحت جزایر بود، جدا گردید.

#### القاء استرس

استرس فیزیکی (شوک الکتریکی) و روانی از طریق communication box القاء گردید (23). در روز چهاردهم پس از تولد، حیوانات به مدت 5 روز روزی دو بار (9-7 صبح و 13-11 عصر) هر بار شوک الکتریکی با شدت 0/8 میلی آمپر و فرکانس یک هرتز را به مدت 5 ثانیه که هر 60 ثانیه یک بار به مدت 30 دقیقه تکرار می‌شد، دریافت کردند (24). در زمان بلوغ نیز، شوک الکتریکی روزی 2 بار (9-7 صبح و 13-11 عصر) با شدت یک میلی آمپر و فرکانس یک هرتز به مدت 10 ثانیه که هر 60 ثانیه یک بار به مدت یک ساعت تکرار می‌شد، طی 5 روز القاء شد (25,26). استرس روانی در زمان بلوغ نیز طی 5 روز روزی دو بار القاء شد. حیوانات گروه بدون استرس در همان مدت زمان بدون دریافت استرس در communication box قرار داده شدند.

#### بررسی تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس

برش‌های 5 میکرونی بعد از فیکس و پردازش بافت‌های پانکراس از قالب‌های پارافینی تهیه و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین (H & E) و اتوزین رنگ شدند (27). جهت اندازه‌گیری تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس، از برش‌های مختلف با استفاده از

داد که استرس در ابتدای زندگی تغییرات قابل ملاحظه‌ای را در غلظت‌های گلوکز و انسولین در دوران بلوغ ایجاد کرد (9-13). اختلافات متابولیکی می‌تواند به صورت نقص در ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس در بافت اندوکراین پانکراس باشد (14). سازماندهی مجدد و تکامل بافت اندوکراین پانکراس بعد از تولد ادامه دارد، از این رو این دوره یک زمان بحرانی محسوب شده و اعمال هرگونه مداخله منفی از جمله استرس در این دوره آسیب‌پذیری به استرس در مراحل بعدی زندگی را افزایش می‌دهد (15-18). در مطالعه قبلی، نشان دادیم که ترشح انسولین از جزایر جدا شده پانکراس در پاسخ به گلوکز در حضور استرس دوران شیرخوارگی و استرس دوران بلوغ افزایش یافت و مقاومت به انسولین نیز القاء گردید (19,20). در پاسخ به مقاومت به انسولین ایجاد شده مکانیسم‌های جبرانی پانکراس نظیر القای تغییرات مورفولوژیکی در بافت اندوکراین پانکراس به صورت هایپرپلازی و هایپرترفی سلول‌های بتای پانکراس و افزایش در توده بتاسل‌ها و نهایتاً افزایش در سایز و تعداد جزایر لانگرهانس فعال می‌شوند (21,22). بنابراین در ادامه مطالعه قبلی اثر تعامل استرس دوران شیرخوارگی با استرس فیزیکی و روانی دوران بلوغ بر تغییرات هیستولوژی پانکراس (تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس) مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

در این تحقیق تجربی، تعداد 18 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که در شرایط استاندارد نگهداری شدند، مورد بررسی قرار گرفت. 10 روز پس از تولد و پس از تعیین جنسیت، زاده‌های نر به‌طور تصادفی از زایمان‌های متفاوت انتخاب و در 6 گروه 3 تایی وارد مطالعه شدند:

گروه control: حیوانات نه در سن 2 هفتگی و نه در سن بلوغ (8-10 هفتگی) استرسی دریافت نکردند.

گروه pubertal-foot shock: حیوانات فقط در سن بلوغ شوک الکتریکی گرفتند.

معیار استاندارد بیان شد. برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی استفاده شد.  $P < 0/05$  سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

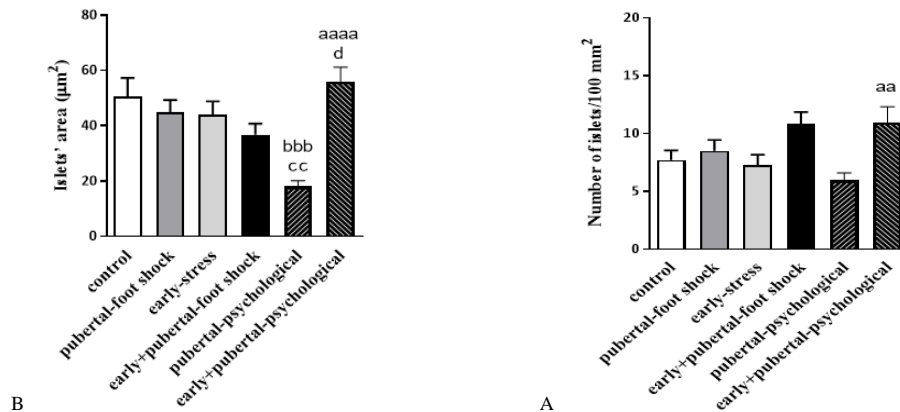
## یافته‌ها و بحث

القای استرس دوران شیرخوارگی به تنهایی در موش‌های بالغ، تغییر معنی‌داری در تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس نسبت به گروه control ایجاد نکرد (نمودار شماره 1).

میکروسکوپ نوری عکس گرفته شد (تصویر شماره 1) و به صورت تصادفی 9 میدان از هر برش انتخاب و جزایر آن‌ها شمارش گردید. با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Motic (Nikon, Japan, 2001) مساحت جزایر بر حسب میکرومتر مربع تعیین شد (28).

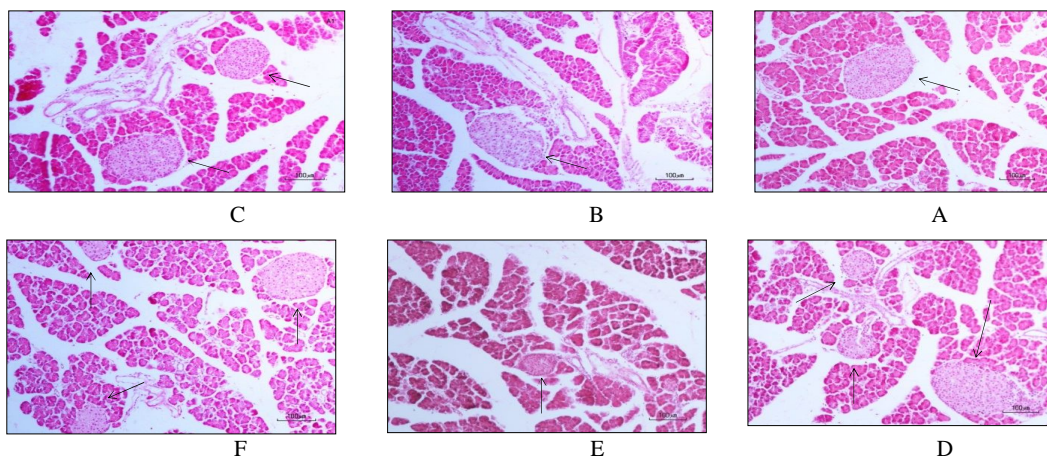
## آنالیز آماری

از نرم افزار آماری GraphPad Prism version 5 (GraphPad, California USA) برای بررسی آماری نتایج استفاده شد. اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف



نمودار شماره 1: بررسی اثر استرس القاء شده در دوران شیرخوارگی بر تعداد (A) و مساحت (B) جزایر لانگرهانس پس از مواجهه با استرس فیزیکی و روانی دوران بلوغ. هر ستون بیانگر Mean  $\pm$  SEM برای 3 سر حیوان می‌باشد.

control با گروه pubertal-psychological  $P < 0/001$  اختلاف معنی‌دار با گروه early+pubertal-foot shock  $P < 0/05^d$  اختلاف معنی‌دار با گروه pubertal-foot shock  $P < 0/001^{cc}$  اختلاف معنی‌دار با گروه pubertal-psychological  $P < 0/0001^{aaaa}$  و  $P < 0/01^{aa}$



تصویر شماره 1: جزایر پانکراس بافت پانکراس گروه‌های مورد مطالعه. بزرگنمایی  $100 \times$ . فلش‌ها جزایر لانگرهانس را نشان می‌دهند.  
 A: گروه control. B: گروه early-stress. C: گروه pubertal-foot shock. D: گروه early+pubertal-foot shock.  
 E: گروه pubertal-psychological. F: گروه early+pubertal-psychological.

القای استرس و نوع و گونه حیوانات مورد مطالعه بستگی دارد. مطالعات نشان داده که استرس روانی مزمن در موش‌های صحرایی سبب القاء سیتوکین‌هایی نظیر IL- $\beta$  شده (30) که می‌تواند موجب آپتوزیس سلول‌های بتای پانکراس گردد (31) افزایش گلوکو کورتیکوئیدها به دنبال استرس از یک سو سبب مقاومت به انسولین و از سوی دیگر طی مکانیسم‌های جبرانی با افزایش هایپرپلازی و هایپر تروفی جزایر لانگرهانس سبب افزایش ترشح انسولین می‌شوند تا مانع اختلال در هومئوستاز گلوکز گردند که در واقع یک پاسخ سازشی در برابر مقاومت به انسولین محسوب می‌شود (31). مطالعات نشان داد که جزایر جدید می‌تواند از سلول‌های پیش‌ساز در نواحی مجرای پانکراس تولید شوند (32). این سلول‌های پیش‌ساز بسته به شرایطی نظیر مقاومت به انسولین می‌توانند پس از مهاجرت، تجمع پیدا کرده و تبدیل به جزایر جدید شوند (33). دوتایی شدن بتاسل‌های از قبل موجود و تولید بتاسل‌های جدید می‌تواند سبب افزایش مساحت جزایر گردد (34-36).

در نتیجه شاید بتوان گفت افزایش در تعداد و مساحت جزایر به صورت تغییرات مورفولوژیکی در بافت اندوکرین پانکراس به دنبال ترکیب دو استرس شیرخوارگی و استرس بلوغ به‌خصوص نوع استرس روانی یک مکانیسم جبرانی پانکراس در برابر مقاومت به انسولین برای ترشح بیش‌تر انسولین جهت برقراری هومئوستاز گلوکز باشد. در واقع می‌توان گفت استرس دوران شیرخوارگی استعداد این تغییرات بافتی در مواجهه با استرس دوران بعدی زندگی را افزایش می‌دهد.

### سپاسگزاری

پژوهشگران لازم می‌دانند از کلیه همکاران که در راستای انجام این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی نمایند. همچنین این پژوهش برگرفته از طرح تحقیقاتی تصویب شده مورخ 1397/09/28 با کد اخلاق IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1397.3069

مقایسه استرس‌های روانی با فیزیکی در زمان بلوغ و کنترل نشان داد که مساحت جزایر و نه تعداد، در گروه استرس روانی نسبت به فیزیکی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ( $P<0/01$ ) و ( $P<0/001$ ) (نمودار شماره 1). تعداد و مساحت جزایر در گروه early+pubertal-psychological در مقایسه با گروه pubertal-psychological به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ( $P<0/01$ ) و ( $P<0/0001$ ) (نمودار شماره 1). همچنین مساحت جزایر امانه تعداد در گروه early+pubertal-psychological نسبت به گروه early+pubertal-foot shock بالاتر بوده است ( $P<0/05$ ) (نمودار شماره 1). مطالعات معدودی تاکنون در زمینه اثر استرس بر تعداد و مساحت جزایر لانگرهانس صورت گرفته است. به عنوان مثال، به دنبال 15 روز استرس روانی مزمن (القاء شده به وسیله communication box) در موش‌های صحرایی، تعداد جزایر افزایش اما مساحت آن‌ها بدون تغییر باقی ماند (27). در حالی که در مطالعه حاضر، استرس روانی مساحت جزایر امانه تعداد را نسبت به کنترل کاهش داد. علاوه بر این استرس روانی نسبت به استرس فیزیکی مساحت جزایر را بیشتر افزایش داد، در حالی که در تعداد جزایر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. استرس روانی در مواجهه با استرس شیرخوارگی توانست هم تعداد و هم مساحت جزایر را نسبت به استرس روانی بلوغ افزایش دهد. در این ارتباط Nichols و همکاران نشان دادند که پس از 14 روز استرس روانی مزمن (Hind Limb Suspension) در موش‌های صحرایی جوان، تعداد و مساحت جزایر تغییر معنی‌داری نشان نداد اما در حضور استرس مشابه در بلوغ، تعداد جزایر افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (28، 29). از سوی دیگر در این مطالعه، استرس روانی در مقایسه با استرس فیزیکی در موش‌هایی که استرس دوران شیرخوارگی دریافت کردند، توانست مساحت جزایر را افزایش دهد. شاید علت اثرات متفاوت استرس مزمن بر جزایر لانگرهانس به نوع استرسور، مدت زمان

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض  
منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

در معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم  
پزشکی مازندران می‌باشد.

## References

1. Folli F, La Rosa S, Finzi G, Davalli AM, Galli A, Dick Jr EJ, Perego C, Mendoza RG. Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20(suppl 2): 137-144.
2. De Oliveira CM, De Oliveira C, Scarabelot VL, Ströher R, Macedo IC, Souza A, Lopes BC, Caumo W, Torres IL. Hypercaloric diet and chronic stress desynchronizes the temporal pattern of rats' insulin release. *Biol Rhythm Res* 2018; 49(4): 643-653.
3. Zeugmann S, Quante A, Popova-Zeugmann L, Kössler W, Heuser I, Anghelescu I. Pathways Linking Early Life Stress, Metabolic Syndrome, and the Inflammatory Marker Fibrinogen in Depressed Inpatients. *Psychiat Danub* 2012; 24(1): 57-65.
4. Trombini M, Hulshof H, Graiani G, Carnevali L, Meerlo P, Quaini F, et al. Early Maternal Separation Has Mild Effects on Cardiac Autonomic Balance and Heart Structure in Adult Male Rats. *Stress* 2012; 15(4): 457-470.
5. Marais L, Van Rensburg SJ, Van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM. Maternal Separation of Rat Pups Increases the Risk of Developing Depressive-Like Behavior after Subsequent Chronic Stress by Altering Corticosterone and Neurotrophin Levels in the Hippocampus. *Neurosci Res* 2008; 61(1):106-112.
6. Chida Y, Sudo N, Sonoda J, Hiramoto T, Kubo C. Early-Life Psychological Stress Exacerbates Adult Mouse Asthma via The Hypothalamus–Pituitary–Adrenal Axis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(4): 316-322.
7. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in Utero And Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N Engl J Med* 2008; 359(1): 61-73.
8. Veenema AH, Reber SO, Selch S, Obermeier F, Neumann ID. Early Life Stress Enhances the Vulnerability to Chronic Psychosocial Stress and Experimental Colitis in Adult Mice. *Endocrinology* 2008; 149(6): 2727-2736.
9. Fóscolo DRC, Fóscolo RB, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Neonatal Maternal Separation Affects Endocrine and Metabolic Stress Responses to Ether Exposure but not to Restraint Exposure in Adult Rats. *Metab Brain Dis* 2008; 23(4): 375-385.
10. Nováková M, Bruderová V, Sulova Z, Kopacek J, Lacinova L, Kvetnansky R, et al. Modulation of Expression of the Sigma Receptors in the Heart of Rat and Mouse in Normal and Pathological Conditions. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26(2): 110-117.
11. McPherson RJ, Gleason C, Mascher-Denen M, Chan M, Kellert B, Juul SE. A New Model of Neonatal Stress which Produces Lasting Neurobehavioral Effects in Adult Rats. *Neonatology* 2007; 92(1): 33-41.
12. Kaufman D, Banerji MA, Shorman I, Smith EL, Coplan JD, Rosenblum LA, et al. Early-Life Stress and the Development of Obesity and Insulin Resistance in Juvenile Bonnet Macaques. *Diabetes* 2007; 56(5): 1382-1386.
13. Lee C, Tsenkova V, Carr D. Childhood Trauma and Metabolic Syndrome in Men and Women. *Soc Sci Med* 2014; 105: 122-130.

14. Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet (of Langerhans) revisited. *Histolo Histopathol* 2019; 34(9): 985-993.
15. Srinivasan M, Patel MS. Metabolic programming in the immediate postnatal period. *TEM* 2008; 19(4): 146-152.
16. Fowden AL, Hill DJ. Intra-Uterine Programming of the Endocrine Pancreas. *Br Med Bull* 2001; 60:123-142.
17. Hill D, Strutt B, Arany E, Zaina S, Coukell S, Graham C. Increased and Persistent Circulating Insulin-Like Growth Factor II in Neonatal Transgenic Mice Suppresses Developmental Apoptosis in the Pancreatic Islets. *Endocrinology* 2000; 141(3): 1151-1157.
18. Hellerström C, Swenne I. Functional Maturation and Proliferation of Fetal Pancreatic B-Cells. *Diabetes* 1991; 40(Suppl 2): 89-93.
19. Sadeghimahalli F, Karbaschi R, Zardooz H, Khodagholi F, Rostamkhani F. Effect of early life stress on pancreatic isolated islets' insulin secretion in young adult male rats subjected to chronic stress. *Endocrine* 2015; 48(2): 493-503.
20. Ekpenyong CE. Relationship between Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Clusters: Current Knowledge. *Acta Scientific Medical Sceinces* 2019; 3: 99-104.
21. Ali A. Identification of Key Genes and Pathways Involved in Compensatory Pancreatic Beta Cell Hyperplasia During Insulin Resistance. *Advances in Computational Science and Computing* 2018; 877: 423-427.
22. Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Takahashi K, Omori K, et al. The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice. *Metabolism* 2018; 85: 48-58.
23. Endo Y, Yamauchi K, Fueta Y, Irie M. Changes of Body Temperature And Plasma Corticosterone Level in Rats During Psychological Stress Induced by the Communication Box. *Med Sci Monit* 2000; 7(6): 1161-1165.
24. Matsumoto M, Higuchi K, Togashi H, Koseki H, Yamaguchi T, Kanno M, et al. Early Postnatal Stress Alters the 5Htergic Modulation to Emotional Stress at Postadolescent Periods of Rats. *Hippocampus* 2005; 15(6): 775-781.
25. Andersen M, Bignotto M, Machado R, Tufik S. Different Stress Modalities Result in Distinct Steroid Hormone Responses by Male Rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(6): 791-797.
26. Chida Y, Sudo N, Motomura Y, Kubo C. Electric Foot-Shock Stress Drives TNF- $\alpha$  Production in the Liver of IL-6-Deficient Mice. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11(6): 419-424.
27. Zardooz H, Zahediasl S, Rostamkhani F, Farrokhi B, Nasiraei S, Kazeminezhad B, et al. Effects of Acute and Chronic Psychological Stress on Isolated Islets'insulin Release. *Excli J* 2012; 11: 163-175.
28. Adam SH, Giribabu N, Kassim N, Kumar KE, Brahmayya M, Arya A, Salleh N. Protective effect of aqueous seed extract of *Vitis Vinifera* against oxidative stress, inflammation and apoptosis in the pancreas of adult male rats with diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 2016; 81: 439-452.
29. Nichols KR, Chowdhury P, Dupont-Vestegden E. Pancreatic Response to Hind Limb Suspension in Rats Is Affected by Age. *Open Clin Chem J* 2008; 1:69-74.
30. Kim YK, Maes M. The Role of the Cytokine Network in Psychological Stress. *Acta Neuropsychiatr* 2003; 15(3):148-155.

31. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free Fatty Acids and Cytokines Induce Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis by Different Mechanisms: Role of Nuclear Factor-Kb and Endoplasmic Reticulum Stress. *Endocrinology* 2004; 145 (11):5087-5096.
32. Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do Early-Life Events Permanently Alter Behavioral and Hormonal Responses to Stressors? *Int J Dev Neurosci* 1998; 16(3-4): 149-164.
33. Bell GI, Broughton HC, Levac KD, Allan DA, Xenocostas A, Hess DA. Transplanted human bone marrow progenitor subtypes stimulate endogenous islet regeneration and revascularization. *Stem Cells Dev* 2011; 21(1): 97-109.
34. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, et al. Mechanisms of compensatory  $\beta$ -cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 2005; 54(8): 2294-2304.
35. Bonner-Weir S, Sharma A. Are there pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? *Nature Reviews Endocrinology* 2006; 2: 240-241.
36. Bock T, Pakkenberg B, Buschard K. Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice. *Diabetes* 2003; 52(7): 1716-1722.