

تأثیر ترکیب تمرین‌های مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر بیان فاکتورهای

آنژیوژنیک در موش‌های صحرایی دیابتی القاء شده با STZ

حدیث جعفری سهی^۱، عیدی علیجانی^{۱*}، امیر سرشین^۱، فریبا آقایی^۱

چکیده

مقدمه: اختلالات آنژیوژنز از سازکارهای شناخته شده ناشی از دیابت است. با هدف کاهش اختلالات آنژیوژنز، تمرینات مقاومتی و هم‌زمانی آن با تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال از راهکارهای جدید است، لذا پژوهش حاضر به منظور تعیین اثر تمرین‌های مقاومتی همراه با تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر بیان فاکتورهای آنژیوژنیک در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی شده انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی به‌طور تصادفی در ۵ گروه: سالم، دیابتی کنترل (D)، دیابتی تمرین کرده (DR)، دیابتی با تزریق سلول اجدادی اندوتلیال (DI)، دیابتی تمرین کرده با تزریق سلول اجدادی اندوتلیال (DRI) تقسیم شدند. برای بررسی تغییرات بیان پروتئین Ang1 و Tie2 به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شدند. داده‌های با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ در سطح معناداری $\alpha \leq 5\%$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در این پژوهش ۶ هفته تمرین مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین‌های Ang1 و Tie2 شد. اما تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال تنها بر میزان پروتئین Tie2 معنی‌دار بود. اثر تعاملی تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال تنها بر میزان Tie2 معنی‌دار بود، به عبارت دیگر ترکیب تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال نسبت به تنها تمرین یا تزریق، در میزان بیان پروتئین Tie2 برتری داشت.

نتیجه‌گیری: می‌توان اظهار داشت تمرین مقاومتی آنژیوژنز را در افراد دیابتی بهبود می‌بخشد. احتمالاً اثر تعاملی تمرینات مقاومتی با تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال می‌تواند باعث تحریک آنژیوژنز در عضله اسکلتی شود و راهبرد جدیدی در درمان اختلالات دیابت باشد.

واژگان کلیدی: تمرین مقاومتی، سلول اجدادی اندوتلیال، آنژیوژنز، دیابت

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

* نشانی: کرج، رجایی شهر، بلوار موزن، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۱۲۶۷۱۱۶، پست الکترونیک:

eidyalijani@yahoo.com

مقدمه

دیابت یک اختلال متابولیک است که به وسیله‌ی افزایش سطح گلوکز خون (هیپرگلیسمی) به‌دنبال نقص در ترشح انسولین، به عمل انسولین یا هر دو مشخص می‌شود. این بیماری با اختلالات غدد درون‌ریز و عوارض متابولیک حاصل از آنها همراه است [۱]. پس از گذشت سالیان زیادی از شناخت بیماری دیابت، امروزه نتایج آماری نشان می‌دهد که ۹/۳٪ از کل جمعیت بزرگسال جهان (۶۶۳ میلیون نفر) در سال ۲۰۱۹ به دیابت مبتلا هستند و چنین برآورد می‌شود این تعداد تا سال ۲۰۴۵ به میزان ۱۰/۹٪ از کل جمعیت جهان که بیش از ۷۰۰ میلیون نفر خواهد بود، برسد [۲]. مطالعات نشان می‌دهد که بیماری دیابت فقط اختلال متابولیسم قند خون را ایجاد نمی‌کند، بلکه عوارض مزمنی را در ساختار و عملکرد عروق خونی در بافت‌های مختلف بدن به همراه دارد که از جمله آنها می‌توان به بیماری عروق درشت (ماکرواسکولار) و بیماری عروق ریز (میکرواسکولار) از جمله رتینوپاتی، نفروپاتی و نروپاتی و آرتروپاتی دیابتی اشاره کرد که اختلال و آسیب آندوتلیالی، انسداد موضعی مویرگ‌ها، التهاب، تغییر در جریان خون و اختلالات پلاکمی را نیز در بر می‌گیرد [۳]. رگ‌زایی فرآیندی است که عملکرد آندوتلیوم را به‌سوی تولید عروق خونی جدید یا شاخه زدن به عروق خونی قلبی سوق می‌دهد. رگ‌زایی، نوعی سازگاری به تحریکات فیزیولوژیایی مانند تمرین‌های ورزشی است که افزایش نیازهای متابولیکی بافت را جبران می‌کند. رگ‌زایی ارتباط تنگاتنگی با دیابت دارد [۴].

آنژیوپوئیتین-۱ یک فاکتور رشد پروتئین بوده و جزء خانواده آنژیوپوئیتین‌ها است که باعث افزایش آنژیوژنز و تشکیل عروق جدید می‌شوند. این خانواده چهار عضو به نام‌های آنژیوپوئیتین-۱، آنژیوپوئیتین-۲، آنژیوپوئیتین-۳ و آنژیوپوئیتین-۴ دارد، به‌طوری که آنژیوپوئیتین ۱ و ۴ برای گیرنده‌ی Tie2 که یک گیرنده‌ی تیروزین کینازی است دارای اثر آگونیست و فعال‌کننده هستند [۵].

آنژیوپوئیتین-۱ به‌عنوان لیگاند محرک باعث فسفوریلاسیون رسپتور می‌گردد و تشکیل مویرگ‌ها را القاء و از طریق میان‌کنش با سلول‌های آندوتلیال و سلول‌های پشتیبان آنها را پایدار می‌کند، این لیگاند توسط سلول‌های فیبروبلاستی و سلول‌های حمایت‌کننده‌ی عروق بیان می‌شود [۶]. در هر حال سیستم سیگنالینگ آنژیوپوئیتین-۱ و

Tie2 برای توسعه‌ی عروق و پدیده‌ی آنژیوژنز ضروری است. هر چند این مسیر طی تحقیقات ورزشی چندان مورد بررسی قرار نگرفته است و با وجود اهمیت این مسیر در پدیده‌ی آنژیوژنز به‌ویژه در موارد پاتولوژیکی مانند دیابت هنوز ابهامات زیادی در رابطه با تأثیر تمرین‌های ورزشی و تزریق سلول‌های اجدادی آندوتلیال بر میزان فعالیت این مسیر مشخص نیست. فعالیت‌های فیزیولوژیکی همچون تمرین‌های ورزشی با شدت مناسب می‌تواند موجب تحریک آنژیوژنز برای از بین بردن ضایعات متابولیکی ناشی از بیماری‌ها به منظور حفظ وضعیت پایدار سلولی شود و باعث افزایش چگالی مویرگی در عضله‌ی اسکلتی و عضله‌ی قلبی شود [۷]. فعالیت ورزشی، همواره عامل مؤثری در سلامتی جسمی و روانی است و مورد توجه متخصصان علم سلامت است. در حقیقت تمرین‌های ورزشی، یکی از سه پایه‌ی اصلی درمان دیابت (علاوه بر رژیم غذایی و دارو) به‌شمار می‌آید [۴]. شواهد متعددی از اثر بخشی تمرین‌های ورزشی در روند کنترل و درمان بیماری‌های مختلف نظیر دیابت حمایت می‌کنند و تعدیل شیوه‌ی زندگی به‌وسیله‌ی افزایش فعالیت بدنی یکی از روش‌های مؤثر در مدیریت دیابت است [۸]. فعالیت بدنی منظم برای بیماران دیابتی فواید بسیاری دارد. با وجود اثرات سودمند فعالیت هوازی بر پارامترهای قلبی عروقی و متابولیکی، برخی از بیماران مبتلا به دیابت به‌ویژه افراد مسن و چاق در انجام این تمرین‌ها با مشکل مواجه هستند. در دهه‌ی اخیر نقش تمرین مقاومتی به عنوان ابزاری جهت بهبود مقاومت انسولینی مورد توجه محققین قرار گرفته است [۹].

با توجه به این که تمرین مقاومتی یک محرک جهت سنتز پروتئین عضله است و نهایتاً به‌هایپرتروفی افزایش قدرت و حجم در عضله می‌انجامد. بنابراین در پاسخ به افزایش نیاز به اکسیژن‌رسانی و خون‌رسانی در نهایت احتمالاً افزایش تراکم مویرگی در گروه کنترل می‌تواند ناشی از این باشد. تمرین مقاومتی به‌دلیل اثری که بر میزان مصرف گلوکز دارد، برای کنترل تعدادی از بیماری‌ها ابزاری درمانی به‌شمار می‌آید [۱۰]. تمرین مقاومتی مناسب مانند تمرین‌های استقامتی سبب افزایش حساسیت انسولینی و بهبود کیفیت زندگی می‌شود [۱۱]. به‌دلیل افزایش حساسیت انسولینی و توده‌ی عضلانی ناشی از انقباض عضلانی، انجام تمرین‌های مقاومتی را در درمان بیماری دیابت مؤثر می‌دانند و همچنین نشان داده شده که برای افراد

فعالیت بافتی و آنژیوژنز را در بافت‌های ایسکمیک شده، در افراد دیابتی بهبود بخشد [۲۱]. به‌علاوه Caomhán و همکاران (۲۰۲۰) عنوان نمودند سلول‌های کلونی‌ساز اندوتلیال جمعیتی از سلول‌های مولد هستند که پتانسیل آنژیوژنیک امیدوار کننده‌ای را نشان می‌دهند. سلول‌های کلونی‌ساز اندوتلیال در افراد دیابتی عملکردی ندارند و باید ترمیم شوند. بنابراین این پیشنهاد می‌تواند امکان ایجاد یک رویکرد درمانی بدون دارو را فراهم کند و در درمان عوارض دیابت مؤثر باشد [۲۲]. تا به امروز برای درمان با سلول‌های کلونی‌ساز اندوتلیال به آزمایشات بالینی بیشتری ادامه نداده‌اند، بنابراین برای درمان عوارض دیابت با این سلول‌ها به تحقیقات بیشتری نیاز است.

روش‌ها

روش مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی بود. تعداد ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۶ هفته با میانگین وزنی 20 ± 20 گرم از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. این حیوانات پس از انتقال به حیوان‌خانه‌ی آزمایشگاه سورن و آشنایی با محیط جدید به‌طور تصادفی به ۶ گروه: ۱- گروه سالم پایه ۲- گروه دیابتی پایه ۳- گروه دیابتی کنترل ۴- گروه دیابتی+تمرین مقاومتی ۵- گروه دیابتی+تزریق سلول اجدادی اندوتلیال ۶- گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق سلول اجدادی اندوتلیال تقسیم شدند. آزمودنی‌ها در قفس‌های مجزا در شرایط کنترل شده محیطی دمای ۲۲ درجه و رطوبت ۵۰ و چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه‌ی موش، نگهداری شدند. اصول کدهای اخلاق و موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (IR.IAU.K.REC.1399.079).

القای دیابت

القای دیابت با یکبار تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوتوسین تهیه شده از شرکت SIGMA ساخت کشور آلمان حل شده در بافر سیترات با دوز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را در سرم فیزیولوژی با PH=3.5-4.5 (برای فعال شدن آنها) در محیطی با دمای

چاق و سالمند این نوع تمرین مؤثر و ایمن است [۱۳، ۱۲]. در راستای این مفهوم در مطالعه‌ای که نصیری و همکاران انجام داده بودند، سیگنال‌های دخیل در پدیده‌ی آنژیوژنز به‌دنبال تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش (rMSCs) در تغییر بیان سیگنال‌های مرتبط با فرایند رگ‌زایی در سه ناحیه‌ی قلب بررسی شد، نتایج این بررسی نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارای توان بالقوه در تحریک و تولید فاکتورهای رگ‌زا هستند. این سلول‌ها به‌عنوان یک روش مداخله‌ای درمانی می‌توانند از اثرات سوء انفارکت و باز شکل‌گیری بافت قلب جلوگیری نمایند [۱۴].

همچنین در مطالعه‌ای که توسط Eva Dohli و همکاران در سال ۲۰۱۰ به چاپ رسیده اثرات Shh^۲ بر تشکیل ساختارهای شبه رگ در سیستم هم‌کشتی سلول‌های استئوبلاست اولیه و سلول‌های اندوتلیال مورد بررسی قرار گرفت. طبق مشاهدات ۲۴ ساعت پس از افزودن این ماده افزایش معنی‌داری در تشکیل ساختارهای شبه رگ پدیدار شد. و مطالعات mRNA (RT-PCR) و پروتئین (Western Blotting) حاکی از آن بود که رابطه‌ی معنی‌داری بین این افزایش و افزایش بیش از حد Ang-1، VEGF، و Ang-2 وجود دارد [۱۵].

یکی از روش‌های درمانی که امروزه به‌طور شایع در بین پژوهشگران رواج دارد، سلول درمانی است [۱۶]. در سال‌های اخیر، از سلول درمانی برای جبران سلول‌های از دست رفته استفاده می‌کنند. پژوهش‌ها چشم‌انداز وسیعی را در علم ایجاد کرده‌اند؛ اما همواره کاربرد آنها به‌صورت علمی با چالش‌هایی همراه بوده است [۱۷]. این راهکارهای درمانی در مطالعات زیادی بر روی نمونه‌های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مثبتی نیز نشان داده است و قدم بعدی برای این مطالعات، طراحی مطالعات انسانی با پیدا کردن بهترین نوع سلول برای تزریق است [۱۸]. سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (Epc^s) جمعیت کاملاً کمیابی از سلول‌ها هستند که می‌توانند توسط محرک‌های مختلف از ایسکمی، ورزش، سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، هورمون‌ها و داروها برای کمک به حفظ سلامت اندوتلیال، جلوگیری از اختلال عملکرد اندوتلیال و افزایش فرآیند نو رگ‌زایی از مغز استخوان به طرف گردش خون سیستمی حرکت کنند [۲۰، ۱۹]. همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های درمانی می‌تواند

² sonic hedgehog

³ Endothelial progenitor cells

۷-۹ وزنه ۸۰٪ وزن بدن، در جلسات ۱۰-۱۴ وزنه ۱۰۰٪ وزن بدن است. در جلسات ۱۵-۱۷ رت‌ها وزنه‌ی ۱۲۰٪ وزن بدن را بالای نردبان حمل می‌کردند [۲۴].

روش‌های آماری

ابتدا متغیرهای تحقیق با استفاده از آمار توصیفی از طریق میانگین و انحراف استاندارد توصیف گردید. برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کلموگروف اسمیرنوف استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن توزیع داده‌ها برای مقایسه فاکتورها در گروه‌های سالم و دیابتی پایه و دیابتی کنترل از آزمون پارامتریک t-مستقل استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها با در نظر گرفتن دو مداخله (تمرین مقاومتی- تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال) از آزمون آماری تحلیل واریانس دو عاملی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری spss نسخه‌ی ۱۹ انجام گردید و سطح معناداری آزمون‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات مقادیر بیان فاکتور رگ‌زایی Ang1 و Tie2 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های گروه‌های سالم، دیابتی با تزریق سلول‌های بنیادی، دیابتی با تزریق و تمرین مقاومتی و دیابتی کنترل در جدول ۱ به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه شده است.

۴ درجه‌ی ساتی‌گرا حل کرده و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتری به‌صورت تزریق داخل صفاقی به آنها تزریق شد. افزایش قند خون به میزان بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر نشان دهنده‌ی دیابتی شدن حیوان در نظر گرفته شد [۲۳]. قبل از انجام آزمایش تمامی موش‌ها با استفاده از دستگاه گلوکومتر مدل Accu-Chek performa ساخت کشور آمریکا و با اخذ یک قطره خون از طریق قاعده‌ی دم، گلوکز خون آنها اندازه‌گیری شد.

تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال

توسط دستگاه سل کانتر (Nihon Kohden, Model: MEK-6450k) ۵ هزار سلول اجدادی کشت داده شده را شمارش و از طریق ورید دمی تزریق صورت گرفت.

پروتکل تمرینی

موش‌ها به‌مدت یک هفته با نحوه‌ی فعالیت بر روی نردبان آشنایی پیدا کردند. تمرین به‌وسیله‌ی یک نردبان با ارتفاع ۱ متر و با ۲۶ پله انجام شد. گروه DR و DRI در مجموع ۱۷ جلسه تمرین مقاومتی را اجرا کردند. استراحت بین جلسات تمرینی ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. هر جلسه تمرین شامل ۵ ست با ۴ تکرار در هر ست با یک دقیقه استراحت بین تکرارها و ۳ دقیقه استراحت بین ست‌ها بود. شدت تمرین به گونه‌ای بود که در ۳ جلسه‌ی اول میزان وزنه ۳۰٪ وزن بدن موش‌ها، در جلسات ۴-۶ وزنه ۵۰٪ وزن بدن، در جلسات

جدول ۱- توصیف متغیرهای تحقیق

گروه	Tie2		Ang1	
	SD	M	SD	M
پایه سالم	۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۰۷	۰/۰۷
دیابتی-تزریق-تمرین	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۷	۰/۰۷
دیابتی-کنترل	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۰۵
دیابتی-تزریق	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۴
دیابتی-تمرین	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۳

$t(10) = 11/3$. همچنین بین بیان فاکتور آنژیوژنیک Ang1 رت‌های سالم ($M = 0/379$) و دیابتی پایه ($M = 0/249$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($t(10) = 3/40$, $P = 0/007$). به عبارت دیگر، میانگین

نتایج تحلیل t مستقل نشان می‌دهد که بین فاکتور آنژیوژنیک Tie2 رت‌های سالم ($M = 0/402$) و دیابتی کنترل ($M = 0/073$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/00$).

سلول‌های اجدادی اندوتلیال ($SD=0/102$ ، $M=0/1745$) و کنترل ($SD=0/105$ ، $M=0/1206$) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($\eta^2=0/10$ ، $P=0/142$ ، $F_{(1, 20)}=2/34$). به عبارت دیگر، تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی اثر معنی‌داری نداشت (شکل ۱).

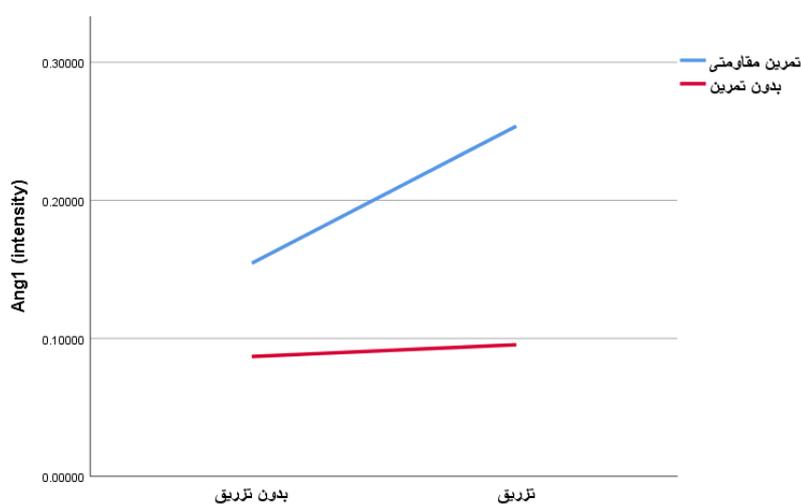
اثر تعاملی تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار نیست ($\eta^2=0/07$ ، $P=0/212$ ، $F_{(1, 20)}=1/66$). به زبان ساده تر، تمرین مقاومتی و تزریق همزمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال (در مقایسه با تمرین مقاومتی یا تزریق) اثر معنی‌داری بر میزان بیان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی نداشت.

بیان فاکتورهای آنژیوژنیک Ang1 و Tie2 رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از رت‌های سالم است.

نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × تزریق) در جدول ۲ نشان داد که اثر اصلی تمرین بر بیان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار است؛ یعنی، بین میانگین بیان Ang1 رت‌های گروه تمرین ($SD=0/118$ ، $M=0/2041$) و کنترل ($SD=0/047$ ، $M=0/0911$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($\eta^2=0/34$ ، $P=0/004$ ، $F_{(1, 20)}=10/2$). به عبارت دیگر، شش هفته تمرینات مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار میزان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی شد (در شکل یک مشاهده کنید). اما اثر اصلی تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان Ang1 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار نیست؛ یعنی، بین میانگین میزان Ang1 رت‌های گروه تزریق

جدول ۲- نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × تزریق) برای Ang1

منبع	SS	df	MS	F	Sig.	η^2
تمرین	0/077	1	0/077	10/2	0/004	0/34
تزریق	0/017	1	0/017	2/34	0/142	0/10
تزریق × تمرین	0/012	1	0/012	1/66	0/212	0/07
خطا	0/149	20	0/007			



شکل ۱- نمودار میانگین میزان Ang1 در رت‌های دیابتی

Tie2 در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار است؛ یعنی، بین میانگین میزان *Tie2* رت‌های گروه تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال ($SD=0/094$, $M=0/1746$) و کنترل ($SD=0/050$, $M=0/1096$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F_{(1,20)}=12/3$, $P=0/002$, $\eta^2=0/38$) به عبارت دیگر، تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال منجر به افزایش معنی‌دار میزان *Tie2* در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی شد. در نهایت اثر تعاملی تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان *Tie2* در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار است ($F_{(1,20)}=4/78$, $P=0/041$, $\eta^2=0/19$). به زبان ساده تر، تمرین مقاومتی و تزریق هم‌زمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال، نسبت به تنها تمرین مقاومتی (یا تزریق) منجر به افزایش معنی‌دار میزان بیان *Tie2* در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی شد (شکل ۲).

همانگونه که مشاهده می‌کنید، میانگین *Ang1* گروه تمرین (خط آبی) بالاتر از گروه کنترل (خط قرمز) است. همچنین، میانگین *Ang1* در گروه تمرین مقاومتی در شرایط تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال بالاتر از شرایط بدون تزریق است و در گروه بدون تمرین تغییرات در دو شرایط تزریق و بدون تزریق اندک است. اما این تغییرات تعاملی معنی‌دار نیستند. نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین \times تزریق) در جدول ۳ نشان داد که اثر اصلی تمرین بر بیان *Tie2* در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی معنی‌دار است؛ یعنی، بین میانگین بیان *Tie2* رت‌های گروه تمرین ($SD=0/057$, $M=0/1984$) و کنترل ($SD=0/060$, $M=0/0858$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F_{(1,20)}=37/02$, $P=0/000$, $\eta^2=0/76$) به عبارت دیگر، شش هفته تمرینات مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار میزان *Tie2* در بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی شد (شکل ۲). همچنین اثر اصلی تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان

جدول ۳- نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین \times تزریق) برای *Tie2*

منبع	SS	df	MS	F	Sig.	η^2
تمرین	0/076	1	0/076	37/02	0/000	0/76
تزریق	0/025	1	0/025	12/36	0/002	0/38
تزریق \times تمرین	0/010	1	0/010	4/78	0/041	0/19
خطا	0/041	20	0/002			



شکل ۲- نمودار میانگین بیان فاکتور *Tie2* در رت‌های دیابتی

Kraus و همکاران همسو است، چراکه در هر دو تحقیق آنژیوزنز فیزیولوژیک بوده و در جهت سازگاری در تأمین اکسیژن و مواد غذایی برای عضلات فعال است [۲۸].

احمدیان و همکاران به بررسی تأثیر ده هفته تمرین تداومی استقامتی بر تغییرات بیان ژن‌های آنژیوپروتئین-۱ و Tie2 به‌عنوان عوامل درگیر در آنژیوزنز در موش‌های مبتلا به سرطان پستان پرداختند و نشان دادند که تمرینات تداومی استقامتی موجب کاهش آنژیوزنز از طریق سیستم آنژیوپروتئین-۱ و Tie2 می‌شود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق احمدیان و همکاران متناقض بود. به‌نظر می‌رسد شرایط موجود موجب این اختلافات شده باشد، چرا که در تحقیق احمدیان و همکاران آنژیوزنز در شرایط پاتولوژیکی مهار شده و این می‌تواند در جهت بهبود شرایط باشد [۲۹].

در همین راستا و همسو با پژوهش حاضر، Zheng و همکاران در بررسی تأثیر تمرینات هوازی بر میزان ریکاوری در موش‌های مبتلا به آسیب ناشی از ایسکمی مغزی گزارش دادند که در هفته ی تمرینات هوازی به‌صورت ۳۰ دقیقه در روز و با شدت ۱۲ متر در دقیقه موجب افزایش بیان پروتئین‌های آنژیوپروتئین-۱ و Tie2 گردید و این سازکار سرعت ریکاوری را بهبود بخشید [۳۰].

همچنین اردکانی زاده و همکاران (۱۴۰۰) به مقایسه‌ی اثر دو پروتکل شنای متوسط (یک ساعت) و طولانی مدت (سه ساعت) به مدت ۱۰ هفته بر رگ‌زایی بطن چپ موش‌های صحرایی نر پرداختند. مقادیر بیان ژن‌های عامل رشد اندوتلیال عروقی B، آنژیوپروتئین ۱ و ۲ در گروه طولانی مدت در مقایسه با هر دو گروه کنترل و متوسط، و در گروه متوسط نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت [۳۱]. تیمونز و همکاران نیز همسو با تحقیق حاضر نشان دادند که ۶ هفته رکاب زدن با شدت بالا موجب افزایش بیان ژن tie2 در آزمودنی‌هایی شد که افزایش اکسیژن مصرفی را تجربه کرده بودند و در آزمودنی‌هایی که اکسیژن مصرفی آنها افزایش نیافته بود تغییری مشاهده نشد [۳۲]. یکی از هدف‌های مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی در بهبود عوارض دیابت بود و نشان داد این سلول‌ها می‌توانند در بهبود دیابت مؤثر واقع شوند. در راستای این مفهوم sun و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای به بررسی اثر استفاده از سلول

همانگونه که مشاهده می‌کنید، میانگین Tie2 گروه تمرین (خط آبی) بالاتر از گروه کنترل (خط قرمز) است. همچنین، میانگین Tie2 در گروه تمرین مقاومتی در شرایط تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال به‌طور قابل توجهی بالاتر از شرایط بدون تزریق است. اما در گروه بدون تمرین تغییرات در دو شرایط تزریق و بدون تزریق اندک است.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فاکتور آنژیوژنیک Ang1 فقط در اثر تمرین مقاومتی افزایش معنی‌دار داشت. این درحالی است که فاکتور آنژیوژنیک Tie2 هم در اثر تمرین مقاومتی و یا تزریق سلول اجدادی اندوتلیال و هم در اثر ترکیب تمرین و تزریق سلول اجدادی اندوتلیال افزایش معنی‌داری داشت. به‌عبارت دیگر در مطالعه‌ی حاضر این سؤال مطرح بود که آیا اجرای برنامه‌ی تمرین و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال با هم، می‌تواند موجب بارزتر شدن تغییرات سطوح فاکتورهای آنژیوژنیک Ang1 و Tie2 شوند؟

Ang1 می‌تواند گیرنده‌ی Tie2 را فعال کند و منجر به فعال شدن مسیرهای پایین دست فسفو اینوزیتول کیناز ۳ و AKT در سلول‌های اندوتلیال شود. فاکتور VEGF و سیستم Ang1/Tie2 به‌عنوان مکمل همدیگر عمل می‌کنند. سیستم VEGF کلید جوانه زنی و تشکیل رگ بوده درحالی که سیستم Ang1/Tie2 به‌عنوان فاز بازسازی و بلوغ نقش تأثیرگذاری دارند [۵].

با وجود تحقیقات نسبتاً گسترده در زمینه‌ی تأثیر فعالیت بدنی بر بسیاری از عوامل پیش برنده‌ی آنژیوزنز، مسیر سیستم آنژیوپروتئین-۱ و Tie2 چندان مورد مطالعه قرار نگرفته است. به‌طور مثال Kraus و همکاران در تحقیقی با اندازه‌گیری فاکتور رشد اندوتلیال عروقی پس از ۲ تا ۴ ساعت فعالیت هوازی در افراد فعال و غیر فعال گزارش کردند که سطح این فاکتور افزایش یافت [۲۵]. گزارش شده است که آنژیوپروتئین-۱ اثرات فیزیولوژیکی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی را تعدیل می‌کند [۲۷-۲۶]. در صورتی که بپذیریم فاکتور رشد اندوتلیال عروقی تحت تأثیر آنژیوپروتئین-۱ تعدیل می‌شود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج

زمینه‌ی پژوهش‌های علوم ورزشی و هم در درمان بیماری‌ها ایجاد شده است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی دست‌آوردهای این مطالعه نشان می‌دهد که شش هفته تمرین مقاومتی و تزریق هم‌زمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال موجب افزایش معنی‌دار فاکتور Tie2 در اثر تمرین یا تزریق شد و این افزایش در اثر تعاملی تمرین و تزریق نیز افزایش معنی‌دار داشت و همچنین موجب افزایش معنی‌دار فاکتور Ang1 در اثر تمرین مقاومتی شد اما این افزایش در اثر تعاملی تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر میزان Ang1 معنی‌دار نبود. یافته‌های به‌دست آمده، دانش ما را در مورد سازکارهای آنژیوژنز در بیماری دیابت در اثر تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال افزایش داده و نشان می‌دهد این مداخلات یک هدف درمانی احتمالی برای شرایط پاتولوژیکی درگیر در آنژیوژنز است. با توجه به کم بودن اطلاعات در زمینه‌ی تمرین‌های مقاومتی و سلول‌درمانی در بیماری دیابت، انجام پژوهش‌های کامل‌تری می‌تواند به برخی ابهامات در این زمینه پاسخ دهد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مدیریت دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و همچنین مدیریت آزمایشگاه تحقیقاتی سورن بابت همکاری و کمک به اجرای این پژوهش قدردانی می‌شود.

های بنیادی مزانشیمی در مدل دیابتی رت‌هایی که از طریق رژیم غذایی پُرچرب و STZ به دیابت نوع دو دچار بودند، پرداختند و مشاهده کردند که تزریق وریدی این سلول‌ها سطح گلوکز خون را کاهش داده و مقاومت به انسولین را در دیابت نوع دو معکوس می‌نماید و بدین‌وسیله می‌تواند یک روش درمانی جایگزین برای درمان دیابت باشد [۳۳].

همچنین vrtovec و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی ارتباط دیابت در پاسخ به سلول درمانی پرداختند و در گروه مقاومت به انسولین خود، بهبود بسیج سلول‌های بنیادی و پاسخ بالینی حفظ شده به سلول درمانی را نشان دادند [۳۴]. Perchikolaei و همکاران ۲۰۱۹ در راستای این مفهوم بیان داشتند که تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به همراه تمرین‌های ورزشی دارای آثار مفیدتری در درمان عوارض دیابت هستند و مقادیر VEGF در گروه تمرین، سلول اجدادی و همچنین در گروه تعاملی در مقایسه با گروه کنترل دیابت افزایش معنی‌دار یافته است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که هر کدام از مداخله‌ها به‌خصوص ترکیب آنها می‌تواند به واسطه‌ی تأثیر افزایشی بر عوامل نروتروفیک و عروقی، یک عامل حفاظت عصبی مرکزی در برابر بیماری دیابت باشد [۳۵]. در خصوص سازکارهای اثر تعاملی متغیرهای وابسته‌ی پژوهش، مشخص شده است افزایش معناداری در بیان فاکتور Ang1 وجود نداشت اما افزایش فاکتور Tie2 می‌تواند در نهایت باعث بهبود عوارض دیابت و سبب ایجاد عروق جدید شود. بنابراین می‌توان گفت تعامل تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال همراه با انجام تمرین‌های مقاومتی می‌تواند یک راهکار حفاظتی و درمانی برای کاهش اختلالات در بیماری دیابت باشد. با توجه به آثار مثبت در حوزه‌ی سلول‌درمانی در پژوهش حاضر و معرفی آن به‌عنوان یک روش درمان غیر دارویی، چشم‌انداز روشی در

مآخذ

- Havilah P, Pandit Vinodh B, Durga Prasad K. Adenosine deaminase activity in type2 diabetes mellitus: An independent marker of glycemic status and stimulator of lipid peroxidation. *Int J Chem* 2013;2(6):1175-8.
- Gebel Berg E, Darsow T, Petersen MP, Uelmen S, Cefalu WT. Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl. 1):S3
- Kantharidis P, Wong B, Carew RM, Lan HY. Diabetes complications: The microRNA perspective. *Diabetes* 2011; 60(7):1832–1837.
- Mahrou M, Gaeini A, Javidi M, Chobbin S. Changes in stimulating factors of angiogenesis, induced by progressive resistance training in diabetic

- rats. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders* 2014;14(1):1-8
5. Staton C A, Hoh L, Baldwin A, Shaw L, Globe J, Cross S S, et al. Angiopoietins 1 and 2 and Tie-2 receptor expression in human ductal breast disease. *Histopathology* 2011; 59: 256-263.
 6. Molla Hasanzadeh F, Bizheh N, Moazami M, Nourshahi M. The Effects of Eight Weeks Aerobic Training On Angiogenesis Factor And Body Composition In Overweight Women. *Physiology of sport and physical activity* 2016; 9(2):1365-1374.
 7. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol* 2012;124(6):763-75.
 8. Smith GA, Fearnley GM, Harrison MA, Tomlinson DC, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. Vascular endothelial growth factors: multitasking functionality in metabolism, health and disease. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38(4):753-63.
 9. Safarzade A, Gharakhanlou R, Hedayati M, Talebi Garakani E. Effects of 3 Resistance Training Programs on Serum Vaspin, hs-CRP and TNF- α Concentrations in the Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Journal of Applied Exercise Physiology* 2014; 8(16):87-100
 10. Irvine C, Taylor NF. Progressive resistance exercise improves glycaemic control in people with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Aust J Physiother* 2009; 55(4):237-46.
 11. Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract* 2010; 4(4):259-69.
 12. Flack KD, Davy KP, Hulver MW, Winett RA, Frisard MI, Davy BM. Aging, resistance training and diabetes prevention. *Journal of Aging Research* 2010; 2011:1-12.
 13. Ibanez J, Izquierdo M, Arguelles I, Forga L, Larrion JL, Garcia-Unciti M, et al. Twice weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28(3):662-667
 14. Xi Y, Hao M, Liang Q, Li Y, Gong DW, Tian Z. Dynamic resistance exercise increases skeletal muscle-derived FSTL1 inducing cardiac angiogenesis via DIP2ASmad2/3 in rats following myocardial infarction, *Journal of Sport and Health Science* 2020; S2095-2546(20)30161-7
 15. Shekarchizadeh Esfahani P, Gharakhanlou R, Karimain J. Changes of plasma angiogenic factor during chronic resistance exercise in type 1 diabetic Rats. *Pakistan journal of medical sciences* 2012; 28(2):328 – 332.
 16. Rahbarghazi R, Nassiri SM. et al. Juxtacrine and paracrine interactions of rat marrow derived mesenchymal stem cells, muscle derived satellite cells and neonatal cardiomyocytes with endothelial cells in angiogenesis dynamics. *Stem Cells Dev* 2013 15;22(6):855-65.
 17. Eva Dohle et al., Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis and Osteogenesis in a Coculture System Consisting of Primary Osteoblasts and Outgrowth Endothelial Cells. *Tissue Engineering: Part A* 2010; 16(4):1235-1246.
 18. Pourheydar B, Shahi M, Farjah GH. Evaluation of apoptosis in hippocampal cells of rat following intravenous injection of bone marrow stromal cells in ischemiareperfusion. *Urmia Med J* 2014; 25(7):584-97. (In Persian).
 19. 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):717-26. (In Persian).
 20. Naseri F, Ahmad-Zadeh A, Sahab Negah S. Potential roles of Neurogenesis in Alzheimer's disease. *Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences* 2017; 60(3): 549 -566.
 21. Bai B, Liang Y, Xu C, Lee MY, Xu A, Wu D, et al. Cyclin-dependent kinase 5-mediated hyperphosphorylation of sirtuin-1 contributes to the development of endothelial senescence and atherosclerosis. *Circulation* 2012; 126(6):729-40
 22. Wang Y, Xu C, Liang Y, Vanhoutte PM. SIRT1 in metabolic syndrome: where to target matters. *Pharmacol Therapeut* 2012; 136(3):305-18.
 23. Mohamadzade L, keshavarzi A, Samdanifard H, SHojaeefard A. The effect of autologous stem cells with peripheral blood monocyte cell (CD34) origin in healing diabetic foot ulcers and preventing limb amputation. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders* 2010;10(3):273 -281
 24. Caomhán J. Lyons and Timothy O'Brien. The Functionality of Endothelial-Colony-Forming Cells from Patients with Diabetes Mellitus. *Cells* 2020; 9:1731.
 25. Calcutt NA, Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Pain Research: springer* 2004: 55-65
 26. Molanouri Shamsi M, Mohammad Hassan Z, Mahdavi M, Gharakhanlou R, Baghersad L, Azadmanesh K, Edalat R. Influence of resistance training on il-15 mrna expression and the protein content in slow and fast twitch muscles of diabetic rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism (ijem)* 2012; 14(2 (sn 62)), 185-192.
 27. Kraus RM, Stallings HW, III, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol* 2004; 96(4): 1445-50.
 28. Olsson A K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling—in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359-371.
 29. Lobov I B, Brooks P C, Lang R A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:11205-11210.
 30. Bloor C M. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* 2005 8(3): 263-271.

31. Ahmadian M, Azizbeigi K, Delfan M, Atashak S. [Effects of 10 week continuous endurance training on angiotensin-1 gene expression and the tie2 protein in mice with breast cancer]. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services* 2019;41(1):7-13. Persian.
32. Zheng Q, Zhu D, Bai Y, Wu Y, Jia J, Hu Y. Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiotensin-1 and Tie-2 in rats. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224(3):221-228. doi: 10.1620/tjem.224.221
33. Ardakani Zade M, Vesali Akbarpour L. comparison of the effects of 10 weeks mid and long-term swimming induced oxidative stress on left ventricular angiogenesis in male rats. *Sport and exercise physiology* 2021; 14(1):119-130.
34. Timmons JA, Jansson E, Fischer H, Gustafsson T, Greenhaff PL, Riddin J, et al. Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans. *BMC Biol* 2005; 3:19.
35. Sun Y, Shi H, Yin S, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β -Cell Destruction. *ACS Nano* 2018; 12(8):7613–7628.
36. Vrtovec B, Sever M, Jensterle M, et al. Efficacy of cd34+ stem cell therapy in nonischemic dilated cardiomyopathy is absent in patients with diabetes but preserved in patients with insulin resistance. *Stem Cells Translational Medicine* 2016; 5(5):632-638.
37. Hamidi Perchikolaei SO, Hashemvarzi SA, Pourghasem M. The Effect of 6 Weeks Progressive Aerobic Training with Injection of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Nerve Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat's Hippocampus. *Sport Physiology* 2019; 11(43): 123-40 (In Persian).

The Effect of Combining Resistance Training and Endothelial Progenitor Cell Injection on the Expression of Angiogenic Factors In Diabetic Male Rats Induced By Stz

Hadis Jafari Sohi¹, Eidy Alijani^{1*}, Amir Sarshin¹, Fariba Aghaei¹

1. Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Karaj Islamic Azad University, Karaj, Iran

ABSTRAC

Background: Angiogenesis disorders are known mechanisms of diabetes. With the aim of reducing angiogenesis disorders, resistance training and its combination with endothelial progenitor cell injection are new strategies. Therefore, the present study was performed to determine the effect of resistance training with endothelial progenitor cell injection on the expression of angiogenic factors in the skeletal muscle of diabetic rats.

Methods: In this study, 30 rats were randomly divided into 5 groups: healthy, control (D) diabetic, trained diabetic (DR), endothelial progenitor cell (DI) diabetic, trained endothelial progenitor cell (DRI) diabetic) Were divided. Ang1 and Tie2 protein expression changes were measured by Western blotting. Data were analyzed using two-factor analysis of variance with SPSS software version 19 at a significance level of 5% $\alpha \leq$.

Results: In this study, 6 weeks of resistance training led to a significant increase in Ang1 and Tie2 proteins. But injection of endothelial progenitor cells was significant only on the amount of Tie2 protein. The interactive effect of resistance training and endothelial progenitor cell injection was significant only on the amount of Tie 2 protein. In other words, the combination of resistance training and endothelial progenitor cell injection was superior to Tie2 protein expression than training or injection alone.

Conclusion: It can be said that resistance training improves angiogenesis in diabetics. Combining resistance training with endothelial progenitor cell injections could possibly stimulate angiogenesis in skeletal muscle and be a new strategy in the treatment of diabetic disorders.

Keywords: Resistance training, Endothelial progenitor cells, Angiogenesis, Diabetes

* Intersection of Moazen and Esteghlal Blvd, end of Rajai Shahr, Amir Almonin University Complex, Karaj, Iran. Tel: +989121267116, Email: eidyalijani@yahoo.com

