

تأثیر تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال بر بتا-اکتین، AKT تام و فسفریله در عضله اسکلتی رت‌های دیابتی نوع یک

الهام مختاری^۱، امیر سرشین*^۲، فواد فیض الهی^۱، عیدی علیجانی^۱

چکیده

مقدمه: دیابت نوع یک با کاهش مویرگی عضله اسکلتی و تنظیم نامناسب مسیرهای آنژیوژنز در عضله اسکلتی همراه است. هدف این پژوهش بررسی تأثیر تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال بر بتا-اکتین، AKT تام و فسفریله در عضله اسکلتی رت‌های دیابتی نوع یک بود.

روش‌ها: در این تحقیق تجربی، ۳۶ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار (میانگین سن ۶ هفته) به شش گروه کنترل (سالم)، کنترل دیابتی پایه، کنترل دیابتی، دیابت+تزریق سلول بنیادی، دیابت+تمرین مقاومتی و دیابت+تزریق سلول بنیادی+تمرین مقاومتی تقسیم شدند. در این مطالعه رت‌ها با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت درون صفاقی دیابتی شدند. تمرینات مقاومتی شامل بالا رفتن از یک نردبان یک متری با وزنه آویزان به دم به مدت ۱۷ جلسه اجرا گردید. تعداد ۵۰۰ هزار سلول بنیادی مشتق از استخوان توسط دستگاه سل کانتر تزریق شد. میزان بتا-اکتین، AKT تام و فسفریله بافت عضله اسکلتی رت‌ها به روش وسترن بلاتینگ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تمرین مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT، β -actin و نسبت Pho-AKT/AKT و کاهش معنی‌دار AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع ۱ شد ($P < 0/001$). تزریق سلول‌های بنیادی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT و نسبت Pho-AKT/AKT و تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT، β -actin و کاهش معنی‌دار AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، احتمالاً مداخله تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی می‌تواند به تنظیم مسیرهای آنژیوژنز عضله اسکلتی در دیابت نوع یک کمک کند.

واژگان کلیدی: تمرین مقاومتی، سلول‌های بنیادی، آنژیوژنز، دیابت نوع یک

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

۲- مرکز تحقیقات مراقبت‌های بالینی و ارتقای سلامت، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

***نشانی:** کرج، رجایی شهر، بلوار مؤذن، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۷۶۷۵۱۹۳، پست الکترونیک:

Amsarshin@gmail.com

مقدمه

دیابت نوع یک ناشی از تخریب سلول‌های β پانکراس با واسطه ایمنی بدن است که منجر به کاهش سطح انسولین، تولید گلوکز سرکوب نشده و افزایش قند خون می‌شود [۱]. اگرچه استعداد ژنتیکی دلیل اصلی بروز دیابت نوع یک است، اما داده‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که بسیاری از عوامل محیطی از جمله عفونت ویروسی، استرس اکسیداتیو، قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی و التهاب در شروع و پیشرفت دیابت نوع ۱ نقش دارند [۲]. بیماران دیابت نوع یک دارای عوارض بسیاری از جمله اختلالات قلبی عروقی، کلیوی و شبکه هستند [۳]. در این میان، عضله اسکلتی یک بافت هدف اصلی آسیب دیابتی است [۴]. عضله اسکلتی یکی از بزرگترین اندام‌های بدن انسان است و از لحاظ کمی مهم‌ترین بافتی است که در حفظ هموستاز گلوکز تحت شرایط تحریک انسولین دخیل است. افراد دیابتی نوع یک بدون درمان انسولین از دست دادن چشمگیر عضله را نشان می‌دهند که منجر به غلظت گلوکز خون بالاتر و در نتیجه یک چرخه معیوب می‌شود [۵]. همچنین دیابت نوع یک با کاهش مویرگی عضله اسکلتی و تنظیم نامناسب مسیرهای آنژیوژنز در عضله اسکلتی همراه است [۶]. آنژیوژنز شامل فرآیندهای چند عاملی بین فاکتورهای ضد آنژیوژنز و پیش آنژیوژنیک است که با سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عضلانی صاف و ماتریکس خارج سلول در تعامل است [۷]. آنژیوژنز به روشی کاملاً تنظیم شده اتفاق می‌افتد و بین بافت‌ها و محرک‌های مختلف متفاوت است. مطالعات سازکارهایی را که دیابت بر آنژیوژنز در عضلات اسکلتی تأثیر می‌گذارد ارزیابی کرده‌اند. بیشتر مطالعات کاهش بیان شاخص‌های آنژیوژنیک را در دیابت گزارش کرده‌اند [۶]. پروتئین کیناز B (Akt)^۱ یک پروتئین سرین/ترونین کیناز خاص است که نقش کلیدی در فرآیندهای سلولی متعدد از جمله رشد و بقا سلول، تکثیر و سوخت‌وساز بدن ایفا می‌کند [۸]. بیان بالای پروتئین کیناز B (Akt) در عضلات اسکلتی در داخل بدن باعث هیپرتروفی عضله اسکلتی، تولید موضعی VEGF و آنژیوژنز می‌شود [۹]. پیشنهاد شده است

که Akt از طریق IKK به روش وابسته به فعال‌سازی NF- κ B به آنژیوژنز کمک می‌کند [۱۰]. همچنین پیشنهاد شده است که β -اکتین ممکن است در سلول‌های اندوتلیال نقش‌های متفاوتی داشته باشد و به‌طور متفاوتی به آنژیوژنز کمک کند [۱۱]. در مهره داران، ۶ ژن اکتین عملکردی وجود دارد و بیان شش ایزوفرم اکتین به دو روش مکانی و زمانی به روشی خاص بافت تنظیم می‌شود. چهار مورد از این ایزوفرم‌ها (یعنی اکتین عضله α قلبی، اکتین عضله اسکلتی α ، اکتین عضله صاف α و اکتین عضله صاف γ) به‌طور عمده در سلول‌های عضلانی بیان می‌شوند، درحالی‌که ایزوفرم‌های سیتوپلاسمی β - و γ -اکتین در همه بافت‌ها به‌ویژه عضلات اسکلتی وجود دارند [۱۲]. β اکتین نیز برای بقای سلول‌های اندوتلیال ضروری است و از طریق سازکارهای وابسته به کیناز متصل به Rho^۲ (ROCK) نقش مهمی در آنژیوژنز دارد، بنابراین ممکن است بینش جدیدی در مورد نقش اکتین در آنژیوژنز عضله اسکلتی فراهم کند و ممکن است راه‌های درمانی جدید را برای درمان اختلالات مرتبط ایجاد کند [۱۱].

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای استفاده از روش پیوند سلول‌های بنیادی در درمان دیابت نوع یک شده است [۱۳]. سلول‌های بنیادی می‌توانند به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین تبدیل شوند. این سلول‌ها، سلول‌های نابالغی هستند که قابلیت تبدیل به سلول‌ها و بافت‌های مختلف را دارند. سلول‌های بنیادی در حضور محرک و فاکتورهای القاکننده تمایز می‌توانند به بسیاری از سلول‌های اختصاصی دیگر تبدیل و متمایز شوند این سلول‌ها توانایی تمایز به بافت‌های مختلف مزانشیمی از قبیل استخوان، غضروف و چربی و ماهیچه را دارا هستند، منشاء این سلول‌ها لایه مزودرم است. سلول‌های بنیادی را می‌توان از بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، بافت چربی، مایع آمنیوتیک، خون محیطی، خون بند ناف، مایع سینوویال و بسیاری دیگر از بافت‌های جنینی و بالغ جدا کرد [۱۴]. در آزمایشات متعدد سلول‌های بنیادی که از مغز استخوان و از بافت چربی برداشت شده‌اند برای آنژیوژنز درمانی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند [۱۵-۱۷]. از طرفی،

^۱ Protein kinase B^۲ Rho-related kinase

بر بتا-اکتین، AKT تام و فسفریله در عضله اسکلتی رت‌های دیابتی نوع یک پردازد.

روش‌ها

پژوهش حاضر، یک مطالعه تجربی است. نمونه‌های پژوهش حاضر را ۳۶ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور با سن ۶ هفته تشکیل دادند. حجم نمونه مطالعه حاضر براساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵٪ (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 (۶ سر در هر گروه) تعیین شد. آزمودنی‌ها پس از یک هفته آشنایی با محیط به‌طور تصادفی به شش گروه شامل کنترل (سالم)، کنترل دیابتی پایه، کنترل دیابتی، دیابت+تزریق سلول بنیادی، دیابت+تمرین مقاومتی و دیابت+تزریق سلول بنیادی+تمرین مقاومتی (هر گروه ۶ سر رت) تقسیم شدند. در این تحقیق اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبار در تمرینات مد نظر قرار گرفت. همه آزمایش‌ها براساس خط مشی‌های قرارداد هلسینکی اجرا شد. جهت دیابتی کردن موش‌ها مقدار استرپتوزوتوسین با دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به‌صورت تزریق درون صفاقی انجام شد. بعد از ۷۲ ساعت با کمک گلوکومتر (مدل Active، شرکت Accu-Chek ساخت آلمان) و نمونه خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی موش‌ها، قند خون اندازه‌گیری شد و موش‌هایی که قند خون آنها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود دیابتی نوع یک شدند [۲۳]. در این تحقیق گروه‌های تمرینی به اجرای ۱۷ جلسه تمرین مقاومتی پرداختند و گروه‌های کنترل نیز در قفس نگهداری شدند و در هیچ تمرینی شرکت داده نشدند.

جداسازی و کشت سلول‌های اجدادی اندوتلیال مغز استخوان موش

برای این منظور رت‌ها را پس از بیهوشی با استفاده از کتامین و زایلازین، با روش جابجای کردن یوتانایز شدند، سپس استخوان

مطالعات بالینی در بیماران مبتلا به دیابت نشان می‌دهند که تمرینات مقاومتی درصد هموگلوبین گلیکوزیله را کاهش می‌دهد، گلوکز مصرفی را افزایش می‌دهد و حتی نیمرخ خطر بیماری‌های قلبی عروقی را بهبود می‌بخشد [۱۸]. همچنین، گزارش شده است که ورزش مقاومتی باعث افزایش فاکتورهای آنژیوژنز عضله اسکلتی می‌شود [۱۹]. برخی مطالعات اثر تنظیم افزایشی شاخص درگیر در آنژیوژنز در عضله اسکلتی را گزارش کرده‌اند. در همین زمینه، در تحقیقی Kwon و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی هفت هفته فعالیت ورزشی مقاومتی مرتبط با هیپرتروفی عضلانی با مدولاسیون اتوفاژی در موش‌ها پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که انجام تمرینات مقاومتی منجر به افزایش AKT می‌شود [۲۰]. نتایج Qi و همکاران (۲۰۲۰) نشان می‌دهد که ورزش ممکن است باعث کاهش مقاومت به انسولین از طریق افزایش انتقال سیگنال AKT در موش‌های مبتلا به مقاومت به انسولین دارای رژیم غذایی پرچرب شود [۲۱]. با این حال، در تحقیقی دیگر Brook و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی سازگاری هیپرتروفی عضله اسکلتی در ۳ و ۶ هفته تمرین مقاومتی برای سنتز پروتئین عضله پرداختند. نتایج این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را در مقادیر AKT نشان نداد [۲۲]. بررسی تأثیر تمرینات مقاومتی بر شاخص‌های فیزیولوژیک مرتبط با تندرستی در دیابت نوع یک مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. کلید محبوبیت تمرین مقاومتی در بین افراد به این دلیل است که در هر سن و با هر سطح آمادگی جسمانی و حتی با هدف‌های اختصاصی برنامه‌ریزی می‌شود. با این حال، مزایای تمرینات مقاومتی و تأثیر آنها بر مسیرهای سیگنالینگ دخیل در آنژیوژنز عضله اسکلتی در دیابت نوع یک به درستی مشخص نشده است. از طرفی در زمینه تغییرات مسیرهای سیگنالینگ دخیل در آنژیوژنز عضله اسکلتی در پاسخ به تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال می‌توان گفت که تاکنون پژوهشی انجام نشده است بدین ترتیب دانش ما درباره پاسخ این مسیر سیگنال‌دهی به فعالیت ورزشی مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بسیار اندک است. بنابراین تحقیق حاضر قصد دارد به تأثیر تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال

پروتکل تمرین مقاومتی

استراحت بین جلسات تمرینی ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. تمرین به وسیله یک نردبان با ارتفاع ۱ متر و با ۲۶ پله انجام شد. یک تکرار در این روش مستلزم ۲۶ بار بالا رفتن از پله توسط موش است. دوره آشنایی موش صحرایی با این تمرین ۳ روز بود که ۴۸ ساعت قبل از تزریق STZ صورت گرفت. هر جلسه تمرین شامل ۵ ست با ۴ تکرار در هر ست با ۶۰ ثانیه استراحت بین تکرارها و ۳ دقیقه استراحت بین ست‌ها بود. شدت تمرین برای گروه T در ۳ جلسه اول ۵۰٪ وزن بدن موش‌های صحرایی، در جلسات ۴-۶ وزنه ۸۰٪ وزن بدن، در جلسات ۷-۹ وزنه ۱۰۰٪ وزن بدن، در جلسات ۱۰-۱۲ وزنه ۱۲۰٪ وزن بدن بود. موش‌های صحرایی در جلسات ۱۳-۱۴ یک دوره کاهش بار تمرینی با وزنه ۱۲۰٪ وزن بدن با ۳ ست و ۵ تکرار داشتند. در جلسات ۱۵-۱۷ موش‌ها وزنه ۱۵۰٪ وزن بدن را بالای نردبان حمل کردند. موش‌های صحرایی در گروه DT در جلسات تمرینی مشابه وزنه‌های ۳۰٪، ۵۰٪، ۸۰٪، ۱۰۰٪، ۱۲۰٪ وزن بدن در ۳ ست و ۵ تکرار اجرا کردند [۲۵].

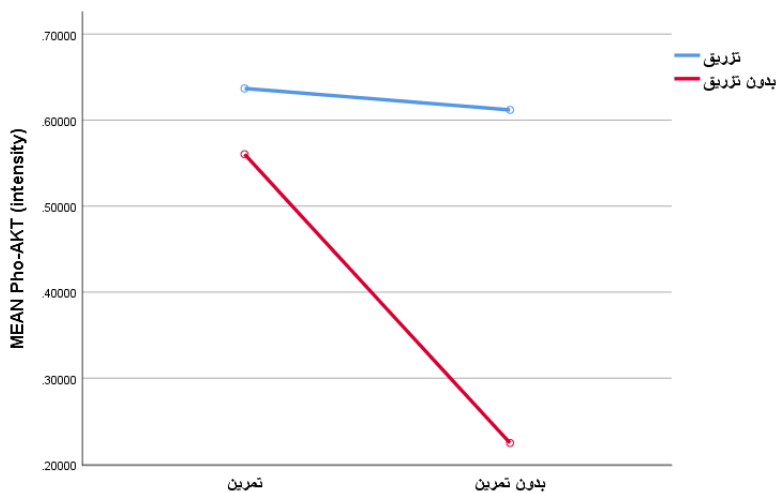
۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا)، رت‌های مورد مطالعه در هر گروه با تزریق درون صفاقی کتامین (30-50 mg/kg) و زایلازین (3-5 mg/kg) بیهوش شدند. سپس بافت عضله اسکلتی نعلی رت‌ها نمونه‌برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlater™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و جهت آنالیز داده‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد. به منظور اندازه‌گیری مقادیر AKT، AKT-Pho و β -actin در موش‌های دیابتی از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. به منظور استخراج پروتئین، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول لیز سلولی ریپا بافر را بر روی سلول‌های ریخته و عمل لیز سلول‌ها با کمک هموژنیزاتور دستی دونس (Ultrasonic Processor UP50H, Germany) در روی یخ انجام شد. برای جلوگیری از اثر مخرب دما بر روی ساختار پروتئین‌ها، ظروف حاوی سلول‌ها در حین استخراج پروتئین‌ها بر روی کیسه یخ قرار داده شد. سپس طبق دستور مندرج در دستورالعمل محلول لیز سلولی، تعلیق سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سرانجام، عصاره

فمور آنها به صورت استریل جدا گردید و پس از برداشت بافت‌های عضلانی و پیوندی اضافی، دو سر استخوان (اپی فیز) به وسیله پنس استخوان‌بر قطع شد. در ادامه با استفاده از سوزن شماره ۱۸ متصل به سرنگ که حاوی محیط کشت M199 از یک سر استخوان وارد شده و سر دیگر آن درون یک عدد پتری دیش ۳۵ میلی‌متری (Greiner Bio-one, USA) قرار داده و محتویات مدولای استخوان را با محیط کشت شستشو داده شد. سپس محیط کشت M199 حاوی مغز استخوان بر روی حجم مساوی از فایکول-هایپیک (Sigma-aldrich, USA) درون یک فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰ سانتریفوژ (Model # 5702 R, Eppendorf) شدند. بعد از سانتریفوژ سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان (BMMNCs) که در محل تلاقی دو فاز به صورت لایه شیری رنگ متمایز بودند، به آرامی توسط سمپلر برداشته شد و دو بار با PBS شستشو داده شدند و سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای پوشیده شده با فیبرونکتین (Cat No: 3043050, promocell, Germany) و در محیط کشت سلول‌های اندوتلیال (M199) همراه با فاکتور رشد (EGM-2 (Cat No: C-39211, Promocell, Germany) شامل EGF, VEGF, bFGF, IGF, هیدوکورتیزول و اسید آسکوربیک به همراه ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۳٪ سرم جنین گاوی در انکوباتور با دمای ۳۷°C و رطوبت نسبی ۹۵٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند. محیط کشت در ۲۴ ساعت اول به منظور حذف سلول‌های مرده، و هماتوپویتیکی تعویض شدند. در نهایت محیط کشت در روز ۳ و ۷ تعویض شده و سلول‌ها برای مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و توسط میکروسکوپ معکوس (Nikon Eclips TS100, Japan) متصل به دستگاه تصویربرداری دیجیتالی (Sight DS-L2, Nikon, Japan) تصویربرداری شدند. بعد از ۷ روز سلول‌ها تریپسینه شده و جهت تزریق آماده شدند. ۵۰۰ هزار سلول توسط دستگاه سل کانتر (Model: MEK-6450k, Nihon Kohden) شمارش شده و از طریق ورید دمی تزریق گردید [۲۴].

معنی‌داری در همه موارد $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۵ به اجرا درآمد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که میانگین سطح *Pho-AKT* رت‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر از رت‌های دیابتی بود ($t_{(8)}=18/10, P=0/000$). نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین×تزریق) نشان داد که سطح *Pho-AKT* بافت عضلانی رت‌های گروه تمرینات مقاومتی ($\eta^2=0/90, P=0/000$)، $F_{(1, 16)}=152/2$ ، تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال ($\eta^2=0/94, F_{(1, 16)}=251/8, P=0/000$) و گروه تمرین مقاومتی به همراه تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال ($\eta^2=0/87, P=0/000, F_{(1, 16)}=113/08$) نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار میانگین سطح *Pho-AKT* بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک

میانگین *Pho-AKT* گروه تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال (خط آبی) بالاتر از گروه بدون تزریق (خط قرمز) است. همچنین، میانگین *Pho-AKT* در گروه تمرین مقاومتی (سمت چپ نمودار) بالاتر از بدون تمرین (سمت راست نمودار) است. در نهایت، میانگین *Pho-AKT* در گروه تمرین-تزریق از گروه تمرین بالاتر است.

کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود ($\eta^2=0/88, P=0/000$)، $F_{(1, 16)}=127/6$ ، تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر سطح *AKT* بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک تأثیر معنی‌داری نداشت ($\eta^2=0/10, P=0/197, F_{(1, 16)}=1/8$). تمرینات مقاومتی

را با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (Hettich universal 320R, Germany) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ساتریفیوژ کرده و محلول بالایی یکدست هموژن را برداشت گردید. محلول فوقانی توسط روش پروتئین سنجی با استفاده از روش پروتئین سنجی (iNtRON Biotechnology, Korea) و دستگاه اسپکتروفوتومتری (Smartspec Plus spectrophotometer, Bio-Rad) اندازه‌گیری شد. برای انجام وسترن بلاتینگ در این مطالعه از سیستم عمودی-Scie-TV100 (Plas Ltd, UK) با یونیت‌های ژلی 10×10 سانتی‌متری و دستگاه مولد برق Consort-EV202 (Sigma) استفاده شد.

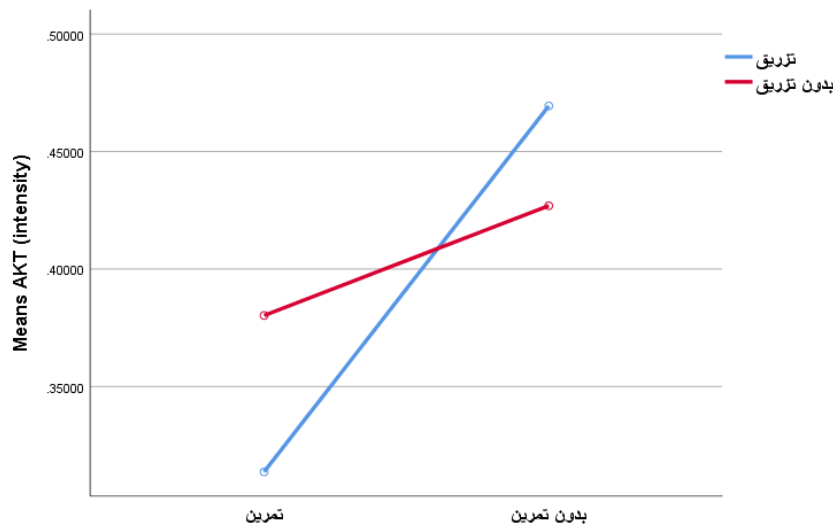
برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. بعد از این که طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید، جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای تحقیق از آزمون تی مستقل و تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین×تزریق) و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. سطح

نتایج نشان داد که بین سطح *AKT* رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($t_{(8)}=1/38, P=0/240$). نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین×تزریق) نشان داد که سطح *AKT* بافت عضلانی رت‌های گروه تمرینات مقاومتی نسبت به گروه

گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($\eta^2=0/94$ ، $P=0/000$ ، $F_{(1,16)}=255/9$). تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر سطح β -actin بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک تأثیر معنی‌داری نداشت ($\eta^2=0/18$ ، $P=0/078$ ، $F_{(1,16)}=3/54$). تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال، نسبت به تنها تمرین مقاومتی، به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش سطح β -actin بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد ($\eta^2=0/93$ ، $P=0/000$ ، $F_{(1,16)}=211/001$) (شکل ۳).

با تزریق هم‌زمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال، نسبت به تنها تمرین مقاومتی، به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش بیشتر سطح AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد ($\eta^2=0/69$ ، $P=0/000$ ، $F_{(1,16)}=37/04$) (شکل ۲).

نتایج نشان داد که بین سطح β -actin رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($t_{(8)}=0/987$ ، $P=0/353$). نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین \times تزریق) نشان داد که سطح β -actin بافت عضلانی رت‌های گروه تمرینات مقاومتی نسبت به



شکل ۲- نمودار میانگین سطح AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک

میانگین AKT در گروه تمرین مقاومتی (سمت چپ نمودار) پایین‌تر از بدون تمرین (سمت راست نمودار) است. همچنین، میانگین AKT در گروه تمرین تزریق (خط آبی) نسبت به گروه بدون تزریق (خط قرمز) در نوسان است. در نهایت، میانگین AKT در گروه تمرین-تزریق از گروه تمرین پایین‌تر است.

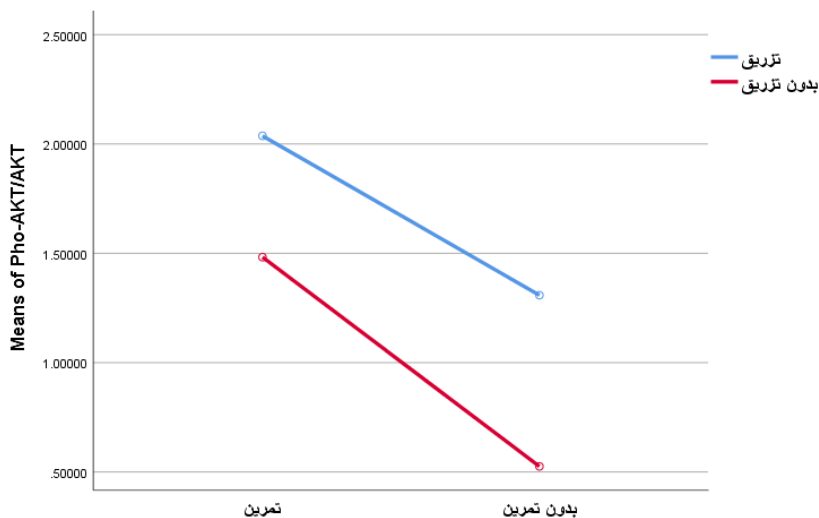


شکل ۳- نمودار میانگین سطح *B-ACTIN* بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک

میانگین *B-ACTIN* در گروه‌های تمرین مقاومتی (سمت چپ نمودار) بالاتر از بدون تمرین (سمت راست نمودار) است. همچنین، میانگین *B-ACTIN* در گروه تزریق (خط آبی) بالاتر از گروه بدون تمرین (خط قرمز) است در نهایت، میانگین *B-ACTIN* در گروه تمرین-تزریق از گروه تمرین بالاتر است.

نتایج نشان داد که میانگین سطح *Pho-AKT/AKT* رت‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر از رت‌های دیابتی بود ($P=0/000$)، نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × تزریق) نشان داد که نسبت *Pho-AKT/AKT* بافت عضلانی رت‌های گروه تمرینات مقاومتی ($F_{(1,16)}=167/4$ ، $P=0/000$ ، $\eta^2=0/91$) و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال ($F_{(1,16)}=3/07$ ، $P=0/099$ ، $\eta^2=0/16$) داشت (شکل ۴).

نتایج نشان داد که میانگین سطح *Pho-AKT/AKT* رت‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر از رت‌های دیابتی بود ($P=0/000$)، نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × تزریق) نشان داد که نسبت *Pho-AKT/AKT* بافت عضلانی رت‌های گروه تمرینات مقاومتی ($F_{(1,16)}=167/4$ ، $P=0/000$ ، $\eta^2=0/91$) و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال ($F_{(1,16)}=3/07$ ، $P=0/099$ ، $\eta^2=0/16$) داشت (شکل ۴).



شکل ۴- نمودار میانگین نسبت *Pho-AKT/AKT* بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک

میانگین نسبت *Pho-AKT/AKT* در گروه‌های تمرین مقاومتی (سمت چپ نمودار) بالاتر از بدون تمرین (سمت راست نمودار) است. همچنین، میانگین نسبت *Pho-AKT/AKT* در گروه تزریق (خط آبی) بالاتر از گروه بدون تمرین (خط قرمز) است در نهایت، میانگین نسبت *Pho-AKT/AKT* در گروه تمرین-تزریق از گروه تمرین بالاتر است، هرچند از نظر آماری معنی‌دار نیست.

بحث و نتیجه گیری

است، این احتمال وجود دارد که پروتکل تمرین مقاومتی در مطالعه ما بیان TRB3 را کاهش داده و به افزایش فسفوریلاسیون Akt پس از ورزش کمک کرده باشد. پروتئین‌های تنظیم کننده و اتصال دهنده اکتین نیز برای نشان دادن اهداف جذاب برای توسعه درمان‌های نوآورانه آنژیوژنز پیشنهاد شده‌اند [۲۸]. با این حال، نقش اسکلت سلولی اکتین در آنژیوژنز به طور کامل مشخص نشده است. مطالعات سلولی پایه برای ترسیم نقش خاصی که هر جزء از اسکلت سلولی اکتین ایفا می‌کند به منظور یافتن راه‌های جدیدی برای هدف قرار دادن آنژیوژنز در پاتولوژی‌هایی مانند دیابت ضروری است. در مطالعه حاضر، ما مقادیر β اکتین را در عضله اسکلتی طی دیابت بررسی کردیم و نشان دادیم که تمرین مقاومتی به افزایش مقادیر این پروتئین کمک می‌کند. با این حال مخالف با یافته‌های تحقیق ما، Brook و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی سازگاری هیپرتروفی عضله اسکلتی در ۳ و ۶ هفته تمرین مقاومتی برای سترز پروتئین عضله پرداختند. نتایج این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را در مقادیر Akt نشان نداد [۲۲]. به نظر می‌رسد تناقض با یافته‌های فوق علت شرایط بیماری نمونه‌های مورد بررسی باشد. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، یک دوره تمرینی مقاومتی می‌تواند به تنظیم شاخص‌های آنژیوژنز عضله اسکلتی رت‌های دیابتی کمک کند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های بنیادی تزریق سلول‌های بنیادی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT و نسبت Pho-AKT/AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی کاهش غلظت گلوکز و بهبود ترشح انسولین را دارند [۲۹]. نشان داده شده است که تزریق سلول‌های بنیادی منجر به کاهش غلظت گلوکز خون در موش‌های دیابتی می‌شود که پس از مدت زمان ۶ هفته تحت درمان قرار گرفتند [۳۰]. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی، قادر به تمایز به سلول‌های اندوتلیال هستند و می‌توانند پری‌سیت‌ها را ایجاد کنند، که داربست مورد نیاز عروق تازه تشکیل شده هستند،

یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تمرین مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT، β -actin و نسبت Pho-AKT/AKT و کاهش معنی‌دار Akt بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های برخی مطالعات قبلی هم راستاست [۲۰، ۲۱]. نتایج Kwon و همکاران (۲۰۱۸) نشان می‌دهد که انجام تمرینات مقاومتی با افزایش هیپرتروفی عضلانی در موش‌ها منجر به افزایش Akt می‌شود [۲۰]. بنابراین از آنجا که هر دو مطالعه از تمرینات مقاومتی بهره برده‌اند به نظر می‌رسد این نوع تمرین می‌تواند سازگاری‌هایی در عضله اسکلتی به همراه داشته باشد و به بهبود آنژیوژنز در عضله اسکلتی طی دیابت کمک نماید. سازکار تغییرات آنژیوژنز در عضله اسکلتی مورد بررسی قرار گرفته است. مشخص شده است که برخی از پروتئین‌های کینازها قادر به اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین هستند، به‌ویژه روی پروتئین‌های پروگزیمال مسیر سیگنالینگ انسولین عمل می‌کنند. در میان این پروتئین‌ها، کیناز سرین^۱ JNK و^۲ IKK می‌توانند در سرین^{۳۰۷} از گیرنده انسولین^۳ (INSR) و سوبسترای گیرنده انسولین^۴ (به ترتیب IR و IRS) را فسفریله کنند و سیگنال انسولین را مختل کنند که منجر به فسفوریلاسیون پایین Akt می‌شود. نشان داده شده است که ورزش باعث کاهش فعالیت این پروتئین‌ها و بازگرداندن عملکرد انسولین می‌شود [۲۶]. اخیراً نشان داده شده است پروتئین Tribbles 3 (TRB3) که توانایی اتصال فیزیکی به Akt را دارد، از فعال شدن Akt جلوگیری می‌کند و در نتیجه اثرات بیولوژیکی این فعالیت مانند ناقل گلوکز نوع ۴ (GLUT4) به غشای سلول عضلانی را مختل می‌کند [۲۷]. مطالعه‌ای که توسط Matos و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد نشان داد که ورزش می‌تواند بیان TRB3 را کاهش دهد و فسفوریلاسیون Akt را در عضله اسکلتی در نمونه‌های مدل حیوانی بازیابی کند. این مولکول سازکار دیگری است که ورزش می‌تواند از طریق آن فسفوریلاسیون Akt را افزایش دهد [۲۷]. اگرچه مطالعه ما بیان TRB3 را تجزیه و تحلیل نکرده

⁴ Insulin receptor substrate 1-2 (IRS-1-2)

¹ c-Jun N-terminal kinase

² I κ B kinase

³ insulin receptor

بیشتری در جهت تنظیم شاخص‌های آنژیوژنری برای عضله اسکلتی موش‌های دیابتی نوع یک در بر داشته باشد. در مجموع، با توجه مطالعات اندک انجام شده در این رابطه، تحقیق روی تأثیر فعالیت ورزشی و سلول‌های بنیادی اندوتلیال بر آنژیوژنری عضله اسکلتی در آزمودنی‌های دیابتی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. محدودیت‌هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به عدم اندازه‌گیری دیگر شاخص‌های آنژیوژنری در عضله اسکلتی رت‌های دیابتی اشاره کرد. همچنین پیشنهاد می‌شود اثر تمرینات هوازی و سلول‌های بنیادی اندوتلیال روی شاخص‌های آنژیوژنری در عضله اسکلتی آزمودنی‌های دیابتی نوع یک در مطالعات آینده بررسی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مداخله تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی می‌تواند به تنظیم شاخص‌های آنژیوژنری عضله اسکلتی در دیابت نوع یک کمک کند. لذا پیشنهاد می‌شود تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های بنیادی اندوتلیال می‌تواند جهت درمان عوارض عضله اسکلتی در دیابت نوع یک مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

علاوه بر این، قادر به ترشح فاکتورهای پاراکرینی هستند که محیط درون سلولی را برای آنژیوژنری فراهم می‌کنند [۳۱]. Asahara و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا کنند و می‌توانند آنژیوژنری را در افراد بالغ حفظ کنند [۳۲]. مغز استخوان همچنین حاوی جمعیتی از سلول‌های بنیادی غیرخون‌ساز است که ساختاری دوکی شکل دارند و می‌توانند بافت‌های مزانشیمی بالغ (غضروف، استخوان، بافت چربی، بافت همبند) را در شرایط کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعریف شده ایجاد کنند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از چندین بافت بالغ، از جمله مغز استخوان و بافت چربی جدا شده‌اند [۳۳] و به‌عنوان یک جمعیت سلولی با ویژگی‌های جالب، از جمله وضعیت ایمنی، توانایی عوامل پاراکرین با خواص آنژیوژنری، تعدیل‌کننده ایمنی و ضد التهابی ترشح می‌کنند [۳۴]. علاوه بر این، به‌نظر می‌رسد که آنها می‌توانند هم به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا کنند و هم به‌طور غیرمستقیم آنژیوژنری را از طریق دو سازکار ترویج کنند: تحریک پاراکرین سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال و مشارکت مستقیم در تشکیل داربست مزانشیمی مورد نیاز برای تشکیل عروق مؤثر [۳۵]. می‌توان تصور کرد که درمان با سلول‌های بنیادی ممکن است از طریق سازکارهای فوق به تنظیم شاخص‌های آنژیوژنری در عضله اسکلتی در دیابت نوع یک کمک کند. علاوه بر این، یافته‌های مطالعه ما نشان می‌دهد که تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی منجر به افزایش معنی‌دار Pho-AKT ، $\beta\text{-actin}$ و کاهش معنی‌دار AKT بافت عضلانی رت‌های دیابتی نوع یک شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مداخله تمرینات مقاومتی با تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی می‌تواند اثرات

مآخذ

1. Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology* 2010; 10(7):501-13.
2. Howard SG. Exposure to environmental chemicals and type 1 diabetes: an update. *BioMed research international* 2019; 73:483-488.
3. Stem MS, Dunbar GE, Jackson GR, Farsiu S, Popbusui R, Gardner TW. Glucose variability and inner retinal sensory neuropathy in persons with type 1 diabetes mellitus. *Eye* 2016; 30(6):825-32.
4. Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric diabetes* 2011; 12:345-64.
5. Sala D, Zorzano A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus.

- Cellular and molecular life sciences* 2015; 72:3803–17.
6. Kivelä R, Silvennoinen M, Touvra AM, Lehti TM, Kainulainen H, Vihko V. Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal* 2006; 20(9):1570-2.
 7. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *nature medicine* 2003; 9:653–660.
 8. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 2014; 7:55-64.
 9. Takahashi A, Kureishi Y, Yang J, Luo Z, Guo K, Mukhopadhyay D, et al. Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Molecular and cellular biology* 2002; 22: 4803–4814.
 10. Agarwal A, Das K, Lerner N, Sathe S, Cicek M, Casey G, et al. The Akt/IKK pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating NF- κ B and β -catenin. *Oncogene* 2005; 24:1021–1031.
 11. Pasquier E, Tuset MP, Sinnappan S, Carnell M, Macmillan A, Kavallaris M. γ -Actin plays a key role in endothelial cell motility and neovessel maintenance. *Vascular cell* 2015; 7:2.
 12. Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67(10):630-4.
 13. Chen S, Du K, Zou C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Research & Therapy* 2020; 11: 275.
 14. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 2019;10(1):68.
 15. Fang S, Wei J, Pentinminkko N, Leinonen H, Salven P. Generation of functional blood vessels from a single c-kit⁺ adult vascular endothelial. *Stem Cell Research & Therapy volume* 2012; 10(10):e1001407
 16. Chehelcheraghi F, Chien S, Bayat M. Mesenchymal stem cells improve survival in ischemic diabetic random skin flap via increased angiogenesis and VEGF expression. *Journal of cellular biochemistry* 2019; 120(10):17491–17499.
 17. Bian X, Ma K, Zhang C, Fu X. Therapeutic angiogenesis using stem cell-derived extracellular vesicles: an emerging approach for treatment of ischemic diseases. *Stem Cell Research & Therapy* 2019; 10: 158.
 18. Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, Corigliano G, Balducci S. Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence. *Acta diabetologica* 2010; 47(1):15 -22.
 19. Gavin TP, Drew JL, Kubik CJ, Pofahl WE, Hickner RC. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta physiologica* 2007; 191(2):139 -46.
 20. Kwon I, Jang Y, Cho JY, Jang YC, Lee Y. Long-term resistance exercise-induced muscular hypertrophy is associated with autophagy modulation in rats. *The journal of physiological sciences* 2018; 68 (3):269-80.
 21. Qi J, Luo X, Ma Z, Zhang B, Li S, Duan X, et al. Swimming Exercise Protects against Insulin Resistance via Regulating Oxidative Stress through Nox4 and AKT Signaling in High-Fat Diet-Fed Mice. *Journal of Diabetes Research* 2020; 2020:2521590.
 22. Brook MS, Wilkinson DJ, Mitchell WK, Lund JN, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, et al. Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal* 2015; 29 (11):4485-96.
 23. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current protocols in pharmacology* 2015; 70:5.47.1-5.
 24. Siavashi V, Nassiri SM, Rahbarghazi R, Mohseni Z, Sharifi AM. Distinct Tie2 tyrosine phosphorylation sites dictate phenotypic switching in endothelial progenitor cells. *Journal of cellular physiology* 2019; 234(5):6209-6219.
 25. Molanouri Shamsi M, Hassan Z M, Mahdavi M, Gharakhanlou R, Azadmanesh K, Baghersad L et al. 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* 2012; 14 (2):185-192.
 26. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* 2011; 60(3):784–796.
 27. Matos A, Ropelle ER, Pauli JR, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, et al. Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice. *Acta physiologica (Oxf)*. 2010;198(1):61–69.
 28. Thoenes L, Gunther M. Novel approaches in anti-angiogenic treatment targeting endothelial F-actin: a new anti-angiogenic strategy? *Current opinion in molecular therapeutics* 2008; 10:579–590.
 29. Cao M, Pan Q, Dong H, Yuan X, Li Y, Sun Z, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells improve glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Stem cell research & therapy* 2015; 6:208.
 30. El-Said KS, Ezz AA, Mohamed AR. The potential role of male bone marrow mesenchymal stem cells

- of diabetic female rats. *Diabetes management* 2020; 10:10-20.
31. Biscetti F, Bonadia N, Nardella E, Cecchini AL, Landolfi R, Flex A. The Role of the Stem Cells Therapy in the Peripheral Artery Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(9):2233
 32. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964–967
 33. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006;119(11):2204-13.
 34. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori É, et al. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes. *Stem Cells*. 2008, 26, 244–253
 35. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110: 349–355.

The Effect of Resistance Training and Endothelial Stem Cell Injection on Beta-Actin, Phosphorylated and Total AKT of Skeletal Muscle in Type 1 Diabetic Rats

Elham Mokhtari¹, Amir Sarshin*², Foad Feizolahi¹, Eidi Alijani¹

1. Department of Physical Education and Sport Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2. Clinical Care and Health promotion Research Center, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes is associated with decreased skeletal muscle capillary and improper regulation of angiogenesis pathways in skeletal muscle. This research intended to study the effect of resistance training and endothelial stem cell injection on beta-actin, phosphorylated and total AKT of skeletal muscle in type 1 diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 36 male Wistar rats (age 6 weeks) were divided into six groups of control (healthy), basal diabetic control, diabetic control, diabetes + stem cell injection, diabetes + resistance training and diabetes + stem cell injection + resistance training. In this study, rats became diabetic intraperitoneally using streptozotocin as a single dose of 40 mg/kg. Resistance exercises including climbing a one-meter ladder with weights hanging from the tail were performed for 17 sessions. 500,000 bone-derived stem cells were injected by a cell counter. The levels of beta-actin, phosphorylated and total AKT in skeletal muscle tissue of rat were measured by using the Western blotting method.

Results: The results showed that resistance training led to significant increase in Pho-AKT, beta-actin and Pho-AKT/AKT ratio and significant decrease in AKT of muscle tissue in type 1 diabetic rats ($P < 0.001$). Injection of stem cells leads to significant increase in Pho-AKT and Pho-AKT/AKT ratio and resistance training with simultaneous injection of stem cells leads to significant increase in Pho-AKT, beta-actin and significant decrease in Akt of muscle tissue in type 1 diabetic rats ($P < 0.001$).

Conclusion: According to the results, it is possible that the intervention of resistance training with injection of stem cells can help regulate the pathways of skeletal muscle angiogenesis in type 1 diabetes.

Keywords: Resistance training, Stem cells, Angiogenesis, Type 1 diabetes

* Amir Almonin University Complex, end of Rajai Shahr, Intersection of Moazen and Esteghlal Blvd, Karaj, Iran. Tel: +989127675193, Email: Amsarshin@gmail.com

