Investigating the effect of aerobic exercise combined with berberine chloride consumption on liver cell apoptosis in diabetic male Wistar rats with streptozotocin

Mohsen Ghadimi[1], Alireza Elmieh[2*], Farhad Rahmani nia[3], Mohammad Ali Azarbayjani[4]

1. Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht,Iran
2. Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht,Iran
3. Department of Sport Physiology, Physical Education Faculty, Gilan university
4. Department of Physical Education, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran,Iran

Abstract

Aim and Background: Diabetes is a chronic disease that affects the metabolism of sugar or blood glucose. This disease is caused by insulin resistance in the body. Diabetes can lead to various complications in the body, including liver damage. Berberine reduces the amount of damage caused by oxidative stress on mitochondria and increases the antioxidant capacity of liver tissue. exercise training causes mitochondrial biogenesis in diabetic patients. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise with different doses of berberine chloride on the apoptosis of liver cells in diabetic male rats with streptozotocin.

Material and methods: In this experimental study, 64 male Wistar rats were randomly divided into 8 groups of 8. The groups include the control group, diabetic, diabetic and taking berberine chloride with a dose of 15 mg/kg, diabetic and taking berberine chloride with a dose of 30 mg/kg, diabetic with aerobic exercise, taking berberine chloride with a dose of 15 mg/kg, diabetic with aerobic exercise and the consumption of berberine chloride with a dose of 30 mg/kg, diabetics with aerobic exercise and the control group with aerobic exercise were divided. Intraperitoneal injection of streptozotocin 60mg/kg was used to make diabetic groups diabetic. Berberine chloride (15 and 30 mg/Kg) was taken orally by gavage once a day. The exercise groups performed aerobic exercise for 6 weeks with an intensity of 50-55% of maximum oxygen consumption. 48 hours after the last training session, the liver tissue was extracted to check the changes of caspase3 protein. Using the TUNEL method, the amount of apoptosis in the liver tissue was evaluated. Data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's follow-up test.

Results: In the present study, diabetic rats showed a significant increase in liver tissue apoptosis and caspase3 protein expression. Treatment of diabetic animals with berberine in doses of 15 and 30 mg/kg led to a significant reduction of apoptotic cells in diabetic rats. The expression of caspase3 protein in the diabetic group with aerobic exercise and berberine chloride consumption at a dose of 30 mg/kg was significantly decreased compared to the diabetic group and berberine chloride consumption at a dose of 15 mg/kg.

Conclusion: It seems that the treatment of diabetic rats with berberine chloride together with exercise activity was able to prevent the occurrence of apoptosis in the liver tissue and improve the liver damage caused by diabetes.

Keywords: aerobic exercise, berberine chloride, apoptosis, caspase 3, diabetic rats, Iau Science.

Corresponding author:
Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht,Iran
Email: elmieh@iaurasht.ac.ir

بررسی تاثیر توامان تمرین هوازی با مصرف بربرین کلراید بر آپوپتوز سلول‌های کبدی در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

محسن قدیمی [۱]، علیرضا علمیه [۲*]، فرهاد رحمانی نیا [۳] ، محمدعلی آذربایجانی [۴]

۱.گروه تربیت بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲. گروه تربیت بدنی، واحد رشت ، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان
۴. گروه تربیت بدنی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: دیابت یک بیماری مزمن است که بر روی متابولیسم قند یا گلوکز خون تاثیر می‌گذارد. این بیماری در شرایط مقاومت به انسولین در بدن ایجاد می‌شود. دیابت می‌تواند منجر به عوارض گوناگونی در بدن از جمله آسیب کبدی شود. بربرین میزان آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو بر روی میتوکندری را کاهش و توان آنتی اکسیدانی بافت کبد را افزایش می‌دهد. تمرین ورزشی در بیماران دیابتی باعث بیوژنز میتوکندریایی می‌شود . بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین هوازی همراه با مصرف بربرین کلراید با دوز متفاوت بر آپوپتوز سلول‌های کبدی در رت‌های نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۶۴ رت نر ویستار به صورت تصادفی به ۸ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه ها شامل گروه کنترل، دیابتی، دیابتی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۱۵، دیابتی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۳۰، دیابتی با تمرین هوازی مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۱۵، دیابتی با تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۳۰، دیابتی با تمرین هوازی و گروه کنترل با تمرین هوازی تقسیم شدند. برای دیابتی کردن گروه‌های دیابتی از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین mg/Kg ۶۰ در رت‌ها استفاده شد. بربرین کلراید(mg/Kg ۱۵ و ۳۰) یک بار در روز به صورت خوراکی به صورت گاواژ خورانده شد. گروه های تمرین به مدت ۶ هفته تمرین هوازی با شدت ۵۰-۵۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، بافت کبد برای بررسی تغییرات پروتئین caspase3 استخراج گردید. با استفاده از روش TUNEL میزان آپوپتوز در بافت کبد ارزیابی شد. داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر موش‌های دیابتی افزایش معنی‌داری را در آپوپتوز بافت کبد و بیان پروتئین caspase3 نشان دادند. تیمار حیوانات دیابتی با بربرین در دوز mg/Kg ۱۵ و ۳۰ منجر به کاهش معنی‌دار سلول های دچار آپوپتوز در موش‌های دیابتی گردید. بیان پروتیئن caspase3 در گروه دیابتی با تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۳۰ نسبت به گروه دیابتی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۱۵ کاهش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد بربرین کلراید همراه با فعالیت ورزشی توانسته است از بروز آپوپتوز در بافت کبد پیشگیری کند و آسیب کبد ناشی از دیابت را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، بربرین کلراید، آپوپتوز، caspase3، رت های دیابتی ، Iau Science.

مقدمه

دیابت یک اختلال متابولیکی رو به افزایش است که در نتیجه نقص در ترشح یا سیگنالینگ انسولین منجر به هیپرگلیسمی مزمن همراه با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین ها می‌شود(۱). در این بیماری پلی ژنتیک و چند

نویسنده مسئول:
گروه تربیت بدنی ، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
پست الکترونیکی: elmieh@iaurasht.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷

عاملی علاوه بر عوامل ژنتیکی و محیطی، چاقی و عدم فعالیت جسمانی نیز در ایجاد آن نقش دارد و منجر به اختلالاتی از جمله نفروپاتی، رتینوپاتی، آترواسکلروز و هپاتوپاتی می-شود(۲،۳). بسیاری از بیماری‌های ناشی از دیابت مانند بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری های کبدی، کیفیت زندگی و امید به زندگی این بیماران را تحت تأثیر قرار می-دهند(۴). کبد اندامی موثر در متابولیسم می‌باشد و در حفظ و برقراری سطح گلوکز خون در محدوده طبیعی موثر است. افزایش قند خون منجر به عدم تعادل در واکنش‌های اکسیداسیون- احیاء در درون هپاتوسیت‌ها می‌شود که در نهایت منجر به آسیب سلول‌های کبد می شود(۵). دو فرآیند در ایجاد ضایعات کبدی نقش دارد. یک حالت نقص متابولیکی است که در تمام بیماران اتفاق می‌افتد و احتمالا مربوط به محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته است که مسئول افزایش فیبروز کبدی می‌باشد و دیگری افزایش استرس اکسیداتیو است که مهم ترین عامل مرگ سلولی می‌باشد(۶). اعتقاد پژوهشگران بر این است که تولید ROS[1] و رادیکال های آزاد، منجر به تشدید آسیب بافت کبد و تحریک مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز در بیماران مبتلا به دیابت می‌شود. استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث فعال شدن انواع پاسخ‌های سلولی مانند بیان غیرطبیعی پروتئین ها و اختلال در میتوکندری شود که در نهایت منجر به آپوپتوز یا مرگ سلولی می‌گردد(۷،۸). فاکتورهای پروآپوپتوز مانند Bax باعث نفوذپذیری غشای بیرونی میتوکندری و به دنبال آن، انتشار سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌شوند که در نهایت باعث فعال شدن caspase9 و سپس caspase3 می‌گردد(۹). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که caspase3 از هر دو طریق مسیر داخلی و مسیر خارجی منجر به تخریب DNA می-شود(۱۰،۱۱). هپاتوپاتی دیابتی به‌عنوان یک ضایعه بسیار مهم، توسط محققان متعددی مورد بررسی قرار گرفته به طوری که سعی در کاهش ضایعات بافت کبد بیماران مبتلا به دیابت از دیرباز آرزوی تمام پژوهشگران سراسر جهان بوده است. محققان تا به حال نتوانسته اند به شکل مناسبی عوارض جانبی برخی از داروها که برای جلوگیری و کنترل اختلالات کبدی حاصله از دیابت استفاده می‌شوند را در بافت کبد کاهش دهند، تا اینکه اخیرا نقش تمرینات ورزشی منظم در پیشگیری از آن مطرح شده است(۱۲). تمرین هوازی می-تواند یک روش غیردارویی موثر برای کنترل و بهبود بیماری-های کبد ناشی از دیابت باشد (۱۳). بعضی از تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین هوازی التهاب، فشار اکسیداتیو و آپوپتوز را کاهش و همچنین در بیماران کبدی باعث بیوژنز میتوکندریایی می‌گردد(۱۴).

به طور سنتی، از گیاهان دارویی برای کاهش قند خون و بهبود اختلالات کبدی، استفاده شده است. این داروهای گیاهی به خاطرکم بودن اثرات جانبی، در دسترس بودن و موثر بودنشان نسبت به داروهای شیمیایی، به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۵). بربرین به عنوان یک نمک آلکالوئیدی می‌باشد که به خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی(۱۶)، آنتی باکتریال(۱۷)، ضد التهابی(۱۶)، ضد تومور(۱۸)، ضد چربی خون(۱۹) و ضد دیابت(۲۰) آن شناخته می‌شود بربرین کلراید یکی از مکمل‌های مفید می‌باشد که از گیاه زرشک به دست می‌آید(۲۱). مطالعات نشان داده که بربرین از طریق کاهش التهاب و فشار اکسایشی باعث محافظت کبد در برابر سمیت ناشی از استرپتوزوسین که یک داروی القا کننده دیابت است، می‌گردد(۲۲). همچنین پژوهش‌ها نشان داده اند که بربرین، آنیون های سوپر اسید و اکسید نیتریک را دفع کرده و باعث از بین رفتن رادیکال آزاد می شود(۱۶،۲۳). به نظر می رسد بربرین کلراید و تمرینات ورزشی هوازی به دلیل داشتن مسیرها و مکانیسم‌های مشترک می‌توانند هر کدام به عنوان یک مکمل کمک درمانی در اختلالات کبدی ناشی از دیابت مورد استفاده شوند. در این راستا با توجه به اینکه تا کنون اثرات توامان بربرین کلراید وتمرینات هوازی با همدیگر در زمینه بهبود استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در پاتوفیزیولوژی آسیب-های ناشی از بیماری دیابت شناخته نشده است، تحقیق حاضر در صدد آن است که اثر توامان تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید بر آپوپتوز سلول های کبدی در رت‌های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (STZ) را بررسی کند .

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع مداخله‌ای- تجربی و از نوع آزمایشگاهی می‌باشد. همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات براساس خط مشی‌های قرارداد هلسینکی انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. تمامی حیوانات با چرخه روشنایی–تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. جامعه آماری عبارت از ۶۴ رت نر ویستار خریداری شده از انستیتو

[1] Reactive Oxygen Species

پاستور ایران بود. حجم نمونه، در سطح معنی داری ۵ درصد و توان آماری ۹۵ درصد و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 به تعداد ۸ سر رت در هر گروه تعیین شد گروه ها شامل موارد ذیل بودند:

۱-گروه کنترل(C): در این گروه هیچ مداخله‌ای انجام نشد.

۲- گروه دیابتی (D): در این گروه به رت ها داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم تزریق شد.

۳- گروه دیابتی + بربرین کلراید *با دوز* ۱۵mg/kg] [D+Br(15): در این گروه رت های دیابتی، بربرین کلراید به میزان ۱۵میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته به صورت گاواژ دریافت کردند. (۱۵)

۴- گروه دیابتی + بربرین کلراید *با دوز* ۳۰ mg/kg [D+Br(30)] : در این گروه رت‌های دیابتی، بربرین کلراید به میزان ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته به صورت گاواژ دریافت کردند.(30)

۵- گروه دیابتی + تمرین هوازی (D+AT): حیوانات پس از القای دیابت، یک برنامه شش هفته ای تمرین هوازی را اجرا کردند.

۶- گروه دیابتی+بربرین کلراید بادوز ۱۵ mg/kg+ تمرین هوازی[D+ Br(15)+ AT]: حیوانات پس از القای دیابت، بربرین به میزان ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته به صورت گاواژ دریافت کردند و در یک برنامه شش هفته ای، تمرین هوازی را اجرا کردند.

۷- گروه دیابتی + بربرین کلراید با دوز ۳۰ mg/kg+ تمرین هوازی[D+ Br(30)+ AT]: حیوانات پس از القای دیابت، بربرین به میزان 30میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته به صورت گاواژ دریافت کردند و در یک برنامه شش هفته‌ای، تمرین هوازی را اجرا کردند.

۸- گروه کنترل + تمرین هوازی(C+AT): این گروه در یک برنامه شش هفته ای ، تمرین هوازی را اجرا کردند .

به دو گروه از گروه‌هایی که دیابتی نبودند به منظور وارد کردن استرس ناشی از تزریق به همه حیوانات، حجمی معادل با STZ تزریقی در گروه‌های تجربی، محلول نرمال سالین تزریق شد.

روش القای دیابت

در این مطالعه موش‌های صحرایی با استفاده از داروی STZ (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم) حل شده در بافرسیترات به صورت داخل صفاقی، دیابتی شدند(۲۴). بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق STZ ، غلظت گلوکز خون پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه با ایجاد جراحت کوچک بوسیله لانست در ناحیه دم موش و با استفاده از دستگاه گلوکومتر (ساخت ژاپن) قرائت و قندخون بالای ۳۰۰ میلی گرم در دسی لیتر، به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گر فته شد. ارزیابی گلوکز خون در هر هفته به همان تکنیک توضیح داده شده عمل گردید.

بربرین کلراید

مکمل مورد استفاده پودر بربرین کلراید هیدرات شده از گیاه زرشک با درجه خلوص ۹۰ ٪ بود. این پودر به اندازه‌ی مورد نیاز در محلول نرمالین سالین حل می‌شد. سپس محلول آماده شده با دوزهای ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در تمام روزهای هفته و به مدت شش هفته به صورت خوراکی (گاواژ) قبل از تمرین به گروه‌های مورد نظر خورانده می‌شد(۲۵).

پروتکل تمرینی

در پژوهش حاضر، از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک استفاده گردید(جدول ۱). بدین صورت که گروه-های تمرینی به مدت شش هفته در معرض تمرین نوارگردان (ساخت شرکت برج صنعت آزما مدل T.S8000) با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و با تواتر سه روز تمرین و یک روز استراحت قرار گرفتند. در هرجلسه تمرین، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن با سرعت ۵-۴ متر بر دقیقه در نظر گرفته شد که این مدت به زمان اصلی تمرین اضافه گردید. سرعت و مدت زمان تمرین به تدریج مطابق با جدول ۱ افزایش یافت. همچنین حین برنامه تمرینی از هیچ نوع شوک الکتریکی استفاده نشد و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش نوارگردان، حیوانات وادار به ادامه تمرین گردیدند. توان هوازی بیشینه

(VO2max[1]) فقط در ابتدای برنامه تمرین و پس از ۶ هفته مورد اندازه گیری قرار گرفت .برنامه گرم کردن هر رت به مدت ۱۵دقیقه با شدت ۴۰ تا ۵۰ در صد ازVO2max قبل از اجرای برنامه تردمیل بود. سرعت تردمیل هر ۲ دقیقه یک بار به میزان ۱/۸متر بر دقیقه تا زمان رسیدن به خستگی افزایش یافت. با توجه به سرعت نهایی به دست آمده در انتهای آزمون بیشینه، سرعت موردنظر در شدت‌های برنامه تمرینی به دست آمد وVO2max با در نظر گرفتن یک نسبت تبادل تنفسی[2] بزرگتر از ۱ برای هر رت محاسبه شد(۲۶).

جدول ۱: برنامه تمرین استقامتی

متغیرهای تمرین	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۴-۱۵	۱۴-۱۵	۱۷-۱۸	۱۷-۱۸
مدت (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۴۰

نمونه‌گیری از بافت کبد

تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی)، با ترکیبی از داروی کتامین[3] (۳۰-۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین[4] (۳-۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی بی هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فورا در تیوب‌های حاویRNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده سپس بافت مربوط به نیتروژن مایع و سپس فریزر ۸۰- جهت انجام مطالعات مولکولی منتقل می کنیم. تغییرات سطح پروتئین Caspase-3 توسط تکنیک وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تغییرات سطح پروتئین caspase3 توسط تکنیک وسترن بلات

مرحله‌ی اول در انجام تکنیک وسترن بلات هموژنیزاسیون بافت توسط بافر لیز و تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد است. سپس جداسازی پروتئین است که توسط الکتروفورز با ژل اکریل‌آمید (SDS-PAGE) انجام گرفت. پس از آن فراکشن‌های جدا شده از ژل را به کاغذهای نیتروسلولز انتقال دادیم. سپس صفحات نیتروسلولز را در محلول ۵ درصد BSA دربافر مخصوص بلوکه شد. در مرحله بعد صفحات نیتروسلولز را به مدت یک شبانه روز در بافر حاوی آنتی‌بادی مخصوص پروتئین caspase3 نگهداری شدو پس از گذشت زمان مذکور صفحات را با بافر شستشو داده شد در آنتی بادی ثانویه انکوبه گردید. در انتها طبق دستورالعمل، کیت مخصوص سوبسترا افزوده ودر نهایت باندهای پروتئینی به کمک دستگاه gel document قابل مشاهده و عکسبرداری شدند. سپس دانسیته باندهای حاصله توسط نرم افزار Image J تعیین و آنالیز گردید(۲۷).

مطالعات بافت شناسی

نیمی از حیوانات هر گروه با دوز ترکیبی کتامین (۵۰-۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵-۳ میلی گرم بر کیلوگرم) به طور عمیق بیهوش شدند. بلافاصله با برش میانی پوست جدار قدامی شکم، دیافراگم و کناره خارجی دنده‌ها، قلب نمایان شد. با کنار زدن ریه چپ، شریان آئورت نزولی مسدود گردید. بطن چپ، در طرف نوک قلب برش داده و از این طریق لوله مخصوص پرفیوژن وارد ابتدای شریان آئورت صعودی شد. ابتدا حدود ۲۰۰-۱۵۰ میلی لیتر محلول نرمال سالین برای خارج کردن خون از درون رگ ها در مدت زمان حدود ۱۰ دقیقه و سپس ۲ میلی لیتر از محلول فرمالین ۱۰٪ با استفاده از نیروی جاذبه و در مدت زمان ۱۵-۱۰دقیقه از رگ ها عبور داده شد. پس از اتمام عملیات پرفیوژن، بافت کبد خارج

[1] Maximum Oxygen Consumption
[2] Respiratory exchange ratio
[3] Ketamine
[4] Xylazine

گردید. تمامی نمونه‌های مورد نظر بلافاصله بعد از خارج شدن از بدن حیوان در ظروف نگه‌داری نمونه محتوی همان ثابت کننده‌ای که جهت پرفیوژن استفاده می‌شود منتقل شد. پس از آماده سازی بافتی، بلوک‌های پارافینی به منظور بررسی آپوپتوز سلولی برش داده شد.

بررسی آپوپتوز

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های کبدی با استفاده از کیت تانل (TUNEL، شرکت Roche آلمان) که قطعه قطعه شدن DNA هسته ای در نتیجه مرگ برنامه ریزی شده سلولی را نشان می‌دهد (مطابق دستورالعمل کیت) مورد بررسی قرار گرفت. از بافت های کبد موجود در پارافین مقاطع ۷ میکرومتر تهیه شد و به آنها پروتئین کیناز K (۲ میکرو گرم در میلی لیتر در PBS، شرکت Roche آلمان) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس نمونه ها به PBS منتقل و ۵ دقیقه در آن نگهداری شدند. آنگاه به برش‌ها ۵۰ میکرومتر از محلول مخلوط کیت تانل (TUNEL Label Mix) اضافه گردید و در اتاقک مرطوب ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت در تاریکی قرار گرفتند. سپس برش ها در PBS فرو برده شدند که این عمل ۴ بار با محلول-های PBS تازه تکرار شد. و در نهایت با استفاده از چسب انتلان، مونته کردن انجام گردید و لام‌ها پس از خشک شدن با میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۴۰۰ بررسی شدند.

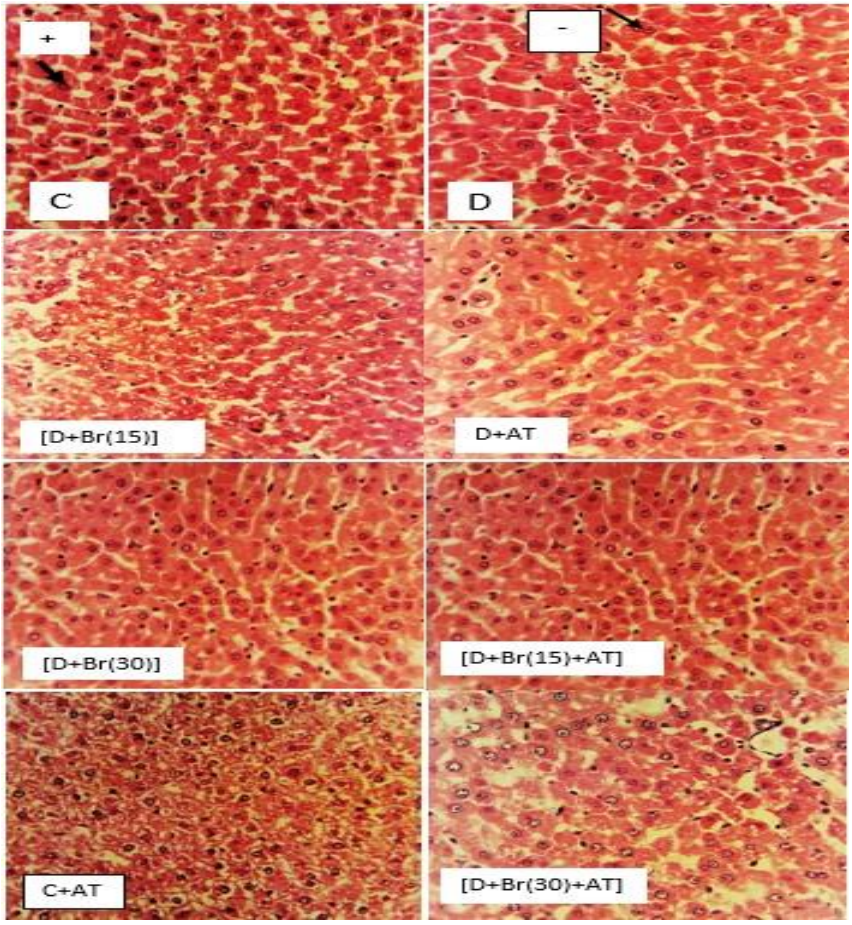
تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین نرمال بودن توزیع نمونه‌ها از آزمون کولموگراف – اسمیرنوف استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمامی داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. محاسبات با استفاده از نرم افزار *prism* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P<0/05$ ملاک معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی آپوپتوز با تست تانل

شکل ۱ میزان آپوپتوز در بافت کبد گروه‌های مورد بررسی در طی ۶ هفته آزمون نشان می‌دهد.

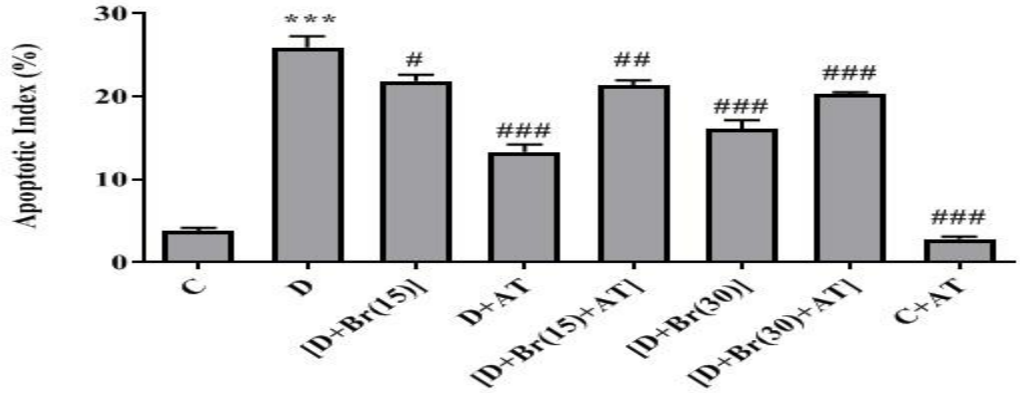


شکل ۱- میزان آپوپتوز در بافت کبد گروه‌های ارزیابی شده با تست تانل

+ هسته سلول سالم، - هسته سلول آپوپتوز شده

در این تحقیق درصد سلول‌های آپوپتوتیک به کل سلول‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. درصد سلول‌های آپوپتوز در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌دار نشان داد(P>۰/۰۰۱).در گروه دیابتی با مصرف دوز mg/kg ۱۵و گروه دیابتی با مصرف دوز mg/kg ۳۰ نسبت به گروه دیابتی تغییر معنی‌داری در کاهش سلول‌های آپوپتوز دیده شد (به ترتیب P> ۰/۰۵و P>۰/۰۰۱). در گروه دیابتی با تمرین هوازی (AT+D)کاهش معنی داری در درصد سلول-های آپوپتوز در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده شد (P>۰/۰۰۱). همچنین در گروه‌های دیابتی با تمرین هوازی و مصرف بربرین با دوزهای mg/kg ۱۵ , ۳۰ درصد سلول‌های آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب P>۰/۰۵ و P>۰/۰۰۱). میزان درصد سلول‌های آپوپتوز در گروه دیابتی با تمرین هوازی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی نیز از نظر آماری کاهش معنی دار یافته است (P>۰/۰۰۱).

در نمودار ۱ درصد سلول‌های آپوپتوز بافت کبد نشان داده شده است.

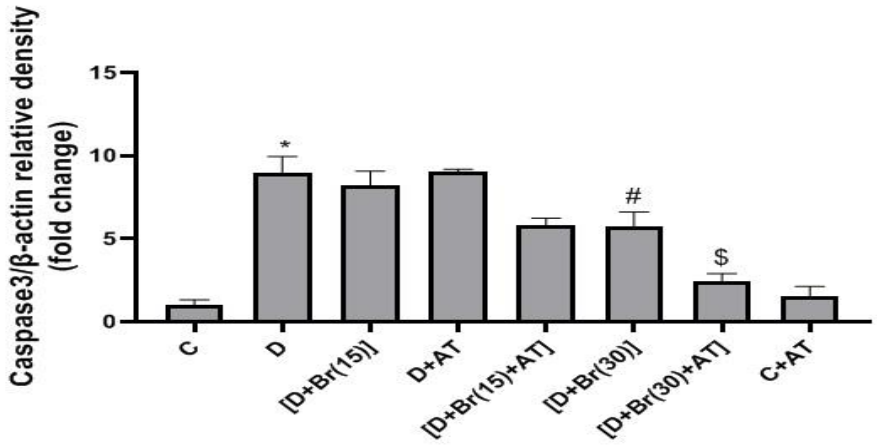


نمودار۱- درصد آپوپتوز سلول ها در بافت کبد در گروه های ارزیابی شده با تست تانل .
* در مقایسه با گروه کنترل (C)، # در مقایسه با گروه دیابت (D)

نتایج بیان پروتئین کاسپاز-۳ (caspase3)

بیان پروتئین caspase3 با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ در گروه‌های مورد آزمون طی ۶ هفته آزمون مورد بررسی قرار گرفتند.

.

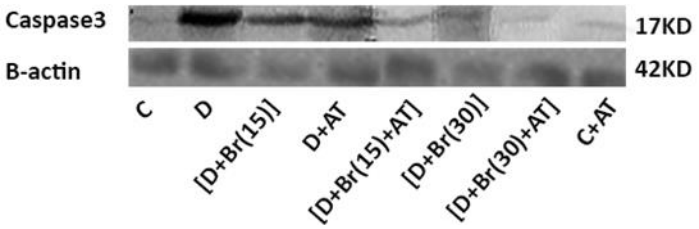


نمودار۲: بیان پروتئین کاسپاز-۳ نسبت به بیان پروتئین بتا اکتین در بافت کبد گروه های تحقیق
* در مقایسه با گروه کنترل (C)، # در مقایسه با گروه دیابت (D) و $ در مقایسه با گروه D+Br(15)+AT

نتایج بررسی نشان داد که بیان پروتئین کاسپاز ۳ در گروه‌های کنترل دیابتی (D)نسبت به گروه کنترل سالم (C) افزایش معنی داری (P>۰/۰۵) دارد. بیان پروتئین caspase3 در گروه دیابتی با مصرف بربرین با دوز mg/kg ۳۰ نسبت به گروه دیابت کاهش معنی داری (P>۰/۰۵) نشان داد. همچنین بیان این پروتئین در گروه دیابتی با تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۳۰ نسبت به گروه دیابتی با تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید با دوز mg/kg ۱۵ کاهش معنی داری (P>۰/۰۵)داشت. در سایر گروه‌های

درمان هیچ کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل دیابتی و دیگر گروه‌های درمان مشاهده نشد.

درشکل۲ باندهای حاصل از بیان کاسپاز ۳ با B-actin نشان داه شده است .



شکل ۲ - باندهای حاصل از تست وسترن بلاتینگ در گروه های تحقیق

بحث

یافته‌های های حاصل از این مطالعه حاکی نشان دادکه میزان سلول‌های آپوپتوز با القای دیابت افزایش یافته است و بربرین کلراید در دوز ۱۵ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به تنهایی و همراه با تمرین هوازی می‌تواند منجر به کاهش میزان آپوپتوز در سلول‌های کبدی شد. نتایج فوق با تحقیق صحرایی و همکاران در مورد این که بربرین کلراید همراه با فعالیت ورزشی احتمالاً از طریق تنظیم افزایشی مسیر Nrf2/HO-1 و PPARγ می‌تواند آسیب کبدی ناشی از STZ را مهار کند، مطابقت دارد(۲۸). همچنین با تحقیق Chandirasegaran و همکاران که تجویز بربرین کلراید به طور قابل توجهی کبد را از عدم تعادل آنتی اکسیدانی، التهاب و آپوپتوز ناشی از هیپرگلیسمی بهبود می‌بخشد و همچنین عدم تعادل در آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات را اصلاح می‌کند، همخوانی دارد(۲۹). در مطالعات متعددی گزارش شده است که حضور عوامل آنتی اکسیدانی نقش دفاعی و محافظتی در کاهش مرگ سلول‌های کبدی متعاقب بیماری دیابت دارد. بربرین به عنوان یک نمک آلکالوئیدی می‌باشد که در بسیاری از گیاهان از جمله، زرشک یافت می‌شود. تا به اکنون مطالعات زیادی اثرات درمانی و مؤثر بربرین را نشان داده‌اند. از آن جمله می‌توان به اثرات بسیار قوی آنتی اکسیدانی بربرین اشاره کرد (۳۰). اثرات آنتی اکسیدانی بربرین در آلزایمر (۳۱) و ضد تومور (۳۲) ثابت شده است.

در برخی از مطالعات گزارش شده که بربرین کلراید توانسته استرس اکسیداتیو کاهش داده و باعث افزایش دفاع آنتی اکسیدانی در کبد موش‌های دیابتی گردد(۱۶). از نتایج دیگر این تحقیق تغییر در میزان بیان پروتئین کاسپاز۳ در بافت کبد رت‌های دیابتی بود. نتایج نشان داد بربرین کلراید در دوز ۱۵ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم توامان با تمرین هوازی می‌تواند منجر به کاهش میزان کاسپاز ۳ در سلول‌های کبدی شد که مقدار این کاهش در مصرف بربرین کلراید به همراه تمرین هوازی با دوز mg/kg ۳۰ بیشتر بود. نتایج فوق با تحقیق عزیزی هماهنگ بود. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از کاهش سطوح پروتئین کاسپاز۳ و Bax در بافت کلیه گروه تمرین هوازی + دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بربرین نسبت به گروه های دیگر بود ، هماهنگ بود (۳۳). افزایش بیان کاسپاز۳ در گروه دیابتی می‌تواند آپوپتوز در بافت کبد رت‌های دیابتی را القا کند. هیپرگلیسمی با افزایش رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل موجب بیان بالای پروتئین Bax، سپس جابه‌جایی Bax به میتوکندری که در نهایت منجر به آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن caspase3 می‌شود (۳۴).

مطالعات نشان دادند که دیابت و افزایش قند خون در رت‌ها باعث القا کاهش گلوتاتیون در میتوکندری سلول‌های کبدی و افزایش تولید میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن، شکل‌گیری کانال‌های غشایی در میتوکندری، فعال شدن کاسپاز ۳ و۹ و در نهایت آپوپتوز سلول‌های کبدی می‌گردد (۳۵). تمرین هوازی منظم یک رویکرد سالم و موثر غیر دارویی در جهت

مدیریت دیابت نوع دو می باشد و کمک به کنترل بهتر گلوکز و کاهش وزن بدن می‌گردد. Nrf2 (یک فاکتور رونویسی متعلق به خانواده زیپ لوسین بازی) یک عامل رونویسی است که رونویسی ژن‌های مختلفی را برای حفظ هومئوستاز و فشارهای مضر سلولی تنظیم می‌کند. استرس اکسیداتیو باعث انتقال Nrf2 به هسته شده، جایی که در آن آنزیم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی و هم اکسیژناز (HO-1) تنظیم افزایشی دارد. گزارش شده است که افزایش فشار اکسایشی در شرایطی نظیر دیابت، می‌تواند باعث تنظیم کاهشیNrf2 شده و استفاده ازبربرین کلراید می‌تواند با اثرات آنتی اکسیدانی وضدالتهابی که دارد، باعث افزایش بیانNrf2 شود (۳۶). به نظر می‌رسد بربرین می‌تواند باعث سرکوب بیان NF-κB و واسطه‌های التهابی از طریقPPARγ شود (۳۷). مطالعات متعددی نشان داده که فعال شدن PPARγ باعث محافظت کبد در برا بر آسیب‌های کبدی از طریق کاهش فشار اکسایشی، التهاب وآپوپتوز شود. به احتمال زیاد به نظر می‌رسد که کاهش بیان پروتئین caspase3 در بافت کبد در مطالعه مان در دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم می‌تواند به علت فعال شدن Nrf2 و PPARγ توسط بربرین باشد. شواهد تجربی نشان داده است که فعال شدن PPARγ می‌تواند بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (۳۸). مطالعه Sahraei M و همکارانش نشان دادند که مسیر Nrf2/HO-1 می‌تواند تحت تاثیر فعالیت ورزشی هوازی قرار بگیرد. گزارش شده است که که تمرین منظم هوازی با افزایش فعالیت مسیر Nrf2/HO-1 در کبد، کلیه و قلب نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسایشی سلولی و آپوپتوز دارد. افزایش بیانNrf2 و HO-1 کبدی در نتیجه تمرین هوازی، پاسخ جبرانی به افزایش فشار اکسایشی ناشی از استرپتوزوتوسین می‌باشد (۳۹). به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی هوازی با کنترل فشار اکسایشی و بهبود وضعیت التهابی از طریق افزایش بیان Nrf2 و NF-κB، آسیبهای ناشی از دیابت را در بافت های بدن کاهش می دهد(۳۸). به نظر می‌رسد در این تحقیق مصرف بربرین کلراید توامان با تمرین هوازی از طریق افزایش بیان Nrf2 و NF-κB، با اثرات هم افزایی که داشتند، باعث کاهش میزان بیان پروتئین caspase-3 در بافت کبد موش های دیابتی شده است. یافتن مکانیسم‌های دقیقتر اثرات بربرین کلراید و تمرین هوازی مستلزم آزمایشات گسترده‌تر و دقیق‌تری می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بربرین کلراید و نمرین هوازی یک روش کمک درمانی مناسب برای محافظت از بافت کبد در برابر آپوپتوز ناشی از دیابت می باشد. همچنین بربرین کلراید در دوز ۱۵و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم توامان با تمرین هوازی می تواند منجر به کاهش میزان کاسپاز ۳ در سلول های کبدی شد که مقدار این کاهش در مصرف بربرین کلراید به همراه تمرین هوازی با دوز ۳۰ mg/kg بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی عزیزانی که در به ثمر نشستن این پژوهش بنده را یاری و راهنمایی نمودند نهایت سپاس و قدردانی را دارم. این پژوهش استخراج شده از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد رشت می‌باشد.

منابع

1. Nithya R, Devi VR, Selvam R, Subramanian SP. Sinapic acid regulates glucose homeostasis by modulating the activities of carbohydrate metabolizing enzymes in high fat diet fed-low dose STZ induced experimental type 2 diabetes in rats. Glob J Obes Diabetes Metab Syndr. 2017; 4(2): 054-061.
2. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. Lancet Neurol. 2012; 11: 261–71.
3. Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance.J Clin Invest. 2000;106(4):473-481.
4. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors. NHLBI.1979; 1979;59:8–13.
5. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. Clin Sci. 1998; 94 (6): 623–632.
6. Mohamed J, Nafizah AN, Zariyantey A, Budin S. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. Sultan Qaboos Univ Med J. 2016; 16(2): e132–e141.
7. Lucchesi AN, Freitas NTd, Cassettari LL, Marques SFG, Spadella CT. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. Acta Cir. Bras. 2013; 28 (7) 502 -8.
8. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ. Res. 2010;107:1058–1070.
9.Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. Liver Int. 2006; 904-911.
10. Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DE, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. Mol. 2011; 1397-1407
11. Karimi MN, Abbasalipourkabir R, Arab Sadeghabadi Z, Ziamajidi N. The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic. JSSU. 2017; 25(7): 547-555.
12. Snowling NJ, Hopkins WG. Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis. Diabetes Care. 2006;29(11):2518–27.
13. Ko JR, Seo DY, Kim TN, Park SH, Kwak H-B, Ko KS, et al. Aerobic exercise training decreases hepatic asprosin in diabetic rats. J. Clin. Med. 2019; 8(5)- 666.
14. Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. J. Hepatol. 2015; 174-182.
15. Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. J. Am. Pharm. Assoc. 2002; 217-226.
16. Chandirasegaran G, Elanchezhiyan C, Ghosh K, Sethupathy S. Berberine chloride ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the pancreas of Streptozotocin induced diabetic rats. Biomed. Pharmacother. 2017; 175-185.
17. Wojtyczka RD, Dziedzic A, Kępa M, Kubina R, Kabała-Dzik A, Mularz T, et al. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative Staphylococcus strains in vitro. Molecules 2014; 19(5): 6583-6596.
18. Pierpaoli E, Arcamone AG, Buzzetti F, Lombardi P, Salvatore C, Provinciali M. Antitumor effect of novel berberine derivatives in breast cancer cells. Biofactors. 2013;672-679.

19. Chandirasegaran G, Elanchezhiyan C, Ghosh K. Modulatory effects of berberine chloride on lipid profile, oxidant status and insulin signaling molecules in streptozotocin induced diabetic rats. Indian J Clin Biochem. 2019; 34: 254–262.
20. Han L, Sheng W ,Li X, Sik A, Lin H, Liu K, et al. Novel carbohydrate modified berberine derivatives: synthesis and in vitro anti-diabetic investigation. Med. Chem. Commun. 2019;10:598-605.
21. Kulkarni SK, Dhir A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride. Eur. J. Pharmacol. 2008;163-172.
22. .Chandirasegaran G, Elanchezhiyan C, Ghosh K. Effects of Berberine chloride on the liver of streptozotocin-induced diabetes in albino Wistar rats. Biomed. Pharmacother. 2018; 227-236.
23. Pan L-r, Tang Q, Fu Q, Hu B-r, Xiang J-z, Qian J-q. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. Acta Pharmacol. Sin. 2005; 26 (11): 1334–1338.
24.Kazemi F, Zahedi Asl S. The correlation of plasma levels of apelin-13 with insulin resistance index and plasma leptin of diabetic male rats after 8-week aerobic exercise. AMUJ. 2015;18(6):51-60.

25. Ayman M. Mahmoud1* MMA-R, Nermin A. Bastawy2, Hassan M .Eissa2. Modulatory effect of berberine on adipose tissue PPARγ, adipocytokines and oxidative stress in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. J. Appl. Pharm. Sci. 2017; 7 (04): pp. 001-010.
26. Ramezani J, Azarbayjani MA, Peeri M. Simultaneous effects of aerobic training and berberine chloride on plasma glucose, IL-6 and TNF-α in type 1 diabetic male Wistar rats. Nutr. Food Sci. 2019;6(1):9-16.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 248-254.
28. Sahrsyi M. Abdi A. Jalal h. Protective Effect of Berberine Chloride and Aerobic Training on Liver Nrf2/HO-1 Pathway and PPARγ in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. ARDABIL UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES. 1399. 20(3).[persian]
29. Chandirasegaran G, Elanchezhiyan C, Ghosh K .Effects of Berberine chloride on the liver of streptozotocin-induced diabetes in albino Wistar rats Biomedicine & Pharmacotherapy .Volume 99, March 2018, Pages 227-236
30. Yaribeygi H, Atkin SL, Sahebkar A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. J. Cell. Physiol. 2019;1300-1312.
31. Pongkittiphan V, Chavasiri W, Supabphol R. Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells. . Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16 (13): 5371-5376.
32. Cai Z, Wang C, Yang W. Role of berberine in Alzheimer's disease. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2016; 12: 2509–2520.
33. Azizi A. Investigating the effect of six weeks of aerobic training and the use of different doses of berberine chloride hydrate supplement on the apoptotic markers caspase 3, Bcl 2 and Bax in the kidney tissue of diabetic rats. 2018. Thesis [persian].
34. Hasnan J, Yusoff M, Damitri T, Faridah A, Adenan A, Norbaini T. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. S. Singapore Med J.2010;51.٥٠:(١).
35. Francés DE, Ronco MT, Monti JA, Ingaramo PI, Pisani GB, Parody JP, et al. Hyperglycemia induces apoptosis in rat liver through the increase of hydroxyl radical: new insights into the insulin effect. J. Endocrinol.2010; 205, 187–200.
36. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell. Signal. 2012;24(5):981-90.
37.Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM. Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPARγ, and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. Biomed. Pharmacother.2017; 280-291.
38. Sahraei M, Abdi A, Jalal H. Protective Effect of Berberine Chloride and Aerobic Training on Liver Nrf2/HO-1 Pathway and PPARγ in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Res. Sci. J. Ardabil Univ. Med. Sci. Health Serv. 2021;296-306.
39. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. Exp. Diabetes Res.2012;16.