مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

اثرات ترکیبات فلاونوئیدی پوست سبز گردو بر افزایش بازده سلول درمانی با کمک تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های تولید کننده انسولین درموش‌های صحرایی مدل دیابتی

سیما مشایخ .Ph.D Student[۱]، مهناز آذرنیا .Ph.D[۲]، اسماعیل فتاحی .Ph.D*[۱]، رضا مقدسعلی .Ph.D[۳]

۱- گروه زیست شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۳- گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: esmail_fattahy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹

چکیده

هدف: در این مطالعه اثر ترکیبات فلاونوئیدی پوست سبز گردو را بر تولید سلول‌های ترشح کننده انسولین بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی(AD-MSCs) در شرایط استریل به‌مدت۲۱روز در مجاورت عصاره فلاونوئیدی با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سلول‌های انسولین ساز تمایز داده شدند. برای دیابتی کردن رت‌ها از استرپتوزوتوسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده شد. از رنگ‌آمیزی دیتیزون (DTZ) برای حضور انسولین، از روش ایمونوفلورسانس جهت تعیین حضور پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بتای پانکراس، اندازه‌گیری قند خون توسط دستگاه گلوکومتر، سطح کراتین، اوره و اسیداوریک سرم از روش کالریمتری و از رونویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) برای ارزیابی بیان ژن PAX_4 استفاده شد.

نتایج: تحت شرایط فوق به‌تدریج از سلول‌های دوکی شکل فیبروپلاستی به سلول‌های مدور تغییر و سلول‌های انسولین ساز با استفاده از رنگ DTZ به‌رنگ قرمز رویت و ترشح انسولین را نشان دادند. بیان نشان‌گرهای انسولین-پروانسولین و گیرنده بتا اثبات شد، میزان قند خون، اوره، اسیداوریک و کراتین کاهش و سطح بیان ژن PAX_4 در گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌داری را نشان دادند($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد که AD-MSCs تحت عصاره فلاونوئیدی پوست سبز گردو توانایی تمایز به سلول‌های تولیدکننده انسولین را دارند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های انسولین ساز، دیابت، فلاونوئیدی، تمایز

مقدمه

دیابت یک بیماری متابولیک همراه با افزایش قندخون است که ممکن است به‌دلیل کاهش ترشح انسولین از غده لوزالمعده یا مقاومت به انسولین و یا هر دو همراه با افزایش تولید گلوکز از کبد باشد (۱). شیوع دیابت طی دو دهه گذشت افزایش چشم‌گیری داشته است، تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۳۰ بیش از ۴۳۸ میلیون نفر افزایش خواهد یافت (۲). این بیماری اغلب همراه با بیماری‌های میکروواسکولار (رتینوپاتی، نوروپاتی ، نفروپاتی) و بیماری‌های ماکروواسکولار (حمله قلبی، سکته مغزی، بیماری‌های عروق محیطی) که باعث هزینه‌های بالای درمانی و مرگ‌ومیر می‌شود (۳).

امروزه استفاده از روش سلول درمانی جهت درمان دیابت که شامل خود سلول‌های بتا، سلول‌های تمایز یافته (سلول‌های کبد، روده، طحال و...) و سلول‌های بنیادی خون بند ناف، مغز استخوان، بافت چربی و غیره ... مورد توجه خاص قرار گرفته اند (۴).

در سال ۲۰۲۱ نتایج یک مطالعه جدید نشان داد که استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند درمانی مناسب برای بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ باشد. محققان در طی تحقیقات خود به‌این نتیجه رسیدند که سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی دگرزاد مشتق شده از مغز استخوان افراد بالغ (MPC_s) می‌توانند التهابی را که تصور می‌شود علت ابتلا به دیابت نوع ۲ باشد مورد هدف قرار دهد (۵).

مهم‌ترین امتیاز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (Adipose tissue derived) (mesenchymal stem cell رشد سریع‌تر آن نسبت به سلول‌های بنیادی خون بند ناف و استخوان می‌باشد، هم‌چنین به‌سادگی کشت داده، تکثیر سریع و حفظ خصوصیات چندتوانی به‌صورت طولانی بعد از چندین پاساژ نشان می‌دهد که این سلول‌های می‌توانند انتخاب مناسبی برای اهداف درمانی باشد (۶).

طبق تحقیقات AD-MSCs قادر هستند که تحت شرایط خاص به سلول‌های بالغ تمایز یافته تبدیل شوندکه توانایی تولید انسولین را دارند که به‌منظور تمایز این سلول‌ها می‌توان از محرک‌های مختلفی استفاده کرد، عوامل گوناگونی وجود دارند که با توجه به عمل‌کردشان در تکوین طبیعی پانکراس استفاده می‌شوند ازجمله این عوامل فاکتور رشد اپی‌دمی، عامل رشد ترانسفورمینگ بتا، عامل رشد فیبروبلاستی اسید، عامل رشد شبه انسولین و ... را می‌توان نام برد (۷).

گردو با نام علمی *Juglans regia* ازجمله گیاهانی است که تمام قسمت‌های آن در طب سنتی کاربرد بسیاری دارد به‌طوری‌که از برگ‌های آن برای دردهای روماتیسمی، تب، دیابت و درمان کم‌خونی، از گل‌های آن برای درمان مالاریا ناشی از روماتیسم، از مغز گردو برای درمان سنگ کلیه و به‌خاطر وجود امگا ۳ به‌عنوان مقوی حواس و تقویت کننده قوای جنسی استفاده می‌شود (۸).

هم‌چنین پوست سبز میوه حاوی ترکیب‌های دارویی زیاد بوده و اثر مفیدی برسلامت انسان دارد. تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل هیدروکسی سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسیدکافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسیدگالیک، اسید الاژیک، اسید پروتوکاتئیک، اسید سیربتژیک و اسید وانیلیک) ، فلوونوئید (کاتکین ، اپی کاتکین ، میرسن) و ژوگلون یا جوگلون (۵ هیدروکسی ۱و۴ نفتوکینون) درگردو شناسایی شده است (۹).

فلاونوئیدهای موجود درگردو درتو اقع گروهی از ترکیبات پلی‌فنولی با منشا گیاهی و وزن مولکولی کم هستند که به‌طور طبیعی در میوه، برگ و سایر اندام‌های گیاهی توزیع شده اند، فلاونوئیدها دارای خواص آنتی اکسیدانتی، ضدالتهابی، ضدپیری، ضدسرطانی و ضددیابتی هستند (۱۰). به‌طوری‌که طبق مطالعات پیش نشان داده شده است که عصاره متانولی برگ گردو با داشتن آنتی اکسیدانت‌هایی نظیر ترکیبات فلاونوئیدی باعث کاهش قند خون می‌شود و دارای اثرات قابل توجهی در بهبود کنترل اختلالات متابولیکی ناشی از بیماری دیابت می باشد (۱۱).

تحقیقات بسیاری توسط داروها حاصل شده است ولی تقاضای بیماران دیابتی شیمیایی برای استفاده از محصولات طبیعی با خواص ضددیابتی هم‌چنان رو به افزایش است چرا که انسولین و دارو های کاهنده قند خون خوراکی دارای اثرات جانبی نامطلوب زیادی هستند بنابراین تلاش برای یافتن عوامل طبیعی برای مقابله با این بیماری از ارزش بالینی بسیاری برخوردار است. هم‌چنین با توجه به اثرات فوق‌العاده گیاه گردو بر درمان دیابت ولی تاکنون هیچ پژوهشی در زمینه بررسی اثرات ترکیبات فلاونوئیدی حاصل از پوست سبز گردو در جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های تولیدکننده انسولین بافت پانکراس صورت نپذیرفته است، لذا ما درمطالعه فوق با هدف افزایش پتانسیل سلول درمانی به کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین به بررسی برخی از شاخص‌های دیابتی (قند خون، اوره، اوریک اسید، کراتین سرمی) و میزان بیان ژن XAP_4 به‌عنوان یک عامل رونویسی و تکامل پانکراس پرداختیم.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره فلاونوئیدی: در این تحقیق تجربی، پوست سبز گردو از باغی در روستای ولیان شهرستان ساوجبلاغ تهیه شد. پوست‌های سبز پس از آن‌که به‌طور کامل در دمای محیط خشک شدند به‌کمک دستگاه خرد کن برقی خرد و جهت یکنواخت کردن اندازه ذرات الک شدند. میزان ۱۲۰ میلی‌لیتر حلال (۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۹۰ میلی‌لیتر متانول) به ۲۰ گرم پودر پوست سبز گردو اضافه شد و به‌مدت یک ساعت توسط هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس به‌منظور جداسازی و مخلوط عصاره و متانول از یکدیگر از دستگاه (Wiggens GmbH- Germany) Rotary evaporator استفاده شد.

برای تهیه پودر خشک، نمونه به‌دست آمده به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون (حکیم آزما تجهیز- ایران) قرار گرفت سپس عصاره به‌دست آمده تا زمان خالص‌سازی فلاونوئیدی در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ایی رنگی در یخچال (حدود ۴ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد.

برای تعیین غلظت فلاونوئیدی از محلول‌های استاندارد فلاونوئید کاتچین استفاه شد. میزان جذب محلول‌های استاندارد کاتچین در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Hitachi- ژاپن) اندازه‌گیری شد. با رسم منحنی استاندارد براساس میزان جذب محلول‌های کاتچین، غلظت عصاره به‌دست آمده در مطالعه حاضر از دارو گیاهی فلاونوئیدی با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفته است.

جدا و خالص سازی سلولهای بنیای مزانشیمی مشتق از بافت چربی: موش‌های سفید آزمایشگاهی پس از کشته شدن، بافت‌های چربی زیرصفاق آن‌ها جدا و در Phosphate Buffer saline (PBS) نگه‌داری شدند. بافت‌های توسط اسکالپل ریز شدند و قطعات حاصل به‌منظور هضم در کلاژناز تیپ یک غلظت ۰/۱ گرم درصد قرار گرفتند. در مرحله بعدی پس از سانتریفوژ کردن رسوب محتوی سلول‌های مـزانشیمی با محیط (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) FBS 10% ۲ mml++DMEM High Glucose (GIBCO) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) گلوتامین، پنی سیلین و استرپتومایسین (Invitragen) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) هم‌زده شده و داخل فلاسک ۷۵ cm^2 کشت داده شد و دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 انکوبه (Memmert-Germany) شد. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و به‌تدریج طی پاساژهای بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص شدند.

آنالیز فلوسایتومتری: آنالیز فلوسایتومتری با حداقل سه تکرار برای سلول‌های مشتق از بافت چربی انجام شد. سلول‌های حاصل از این بافت در پاساژ دوم مورد ارزیابی فتوتایپی با روش فلوسایتومتری قرارگرفت، حدود 1×10^6 سلول با تمایز مناسبی از آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه با فلوئورسین ایزوتیوسیانات(Fluorescein Is thiocyanate) ضدمارکرهای CD_{90} و CD_{34} و نیز آنتی‌بادی مونوکلونال کونژرگه با فیکواریزین (Phycoerythrin) ضدمارکرمای CD_{105} و CD_{45} و یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل مرتبط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به‌مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. تمامی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دوره استفاده دراین مطالعه از شرکت BD Pharmingen خریداری شدند. پس سلول‌ها با PBS شست‌وشو شدند و بررسی‌های ایمونوفنوتایپینگ با استفاده از یک دستگاه FACS Calibur انجام شد و یافته‌ها با نرم افزار (Cyflo Ltdo) آنالیز شدند. در این تست مقادیر زیر ۵ درصد منفی و بالای ۵ درصد مثبت درنظر گرفته شد.

تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلولهای انسولین ساز: پس از جدا سازی، کشت، تکثیر، شناسایی و اثبات وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تکنیک فلوسایتومتری، تمایز AD-MSCs به سلول‌های انسولین ساز (Islets) درمحیط آزمایشگاهی انجام شد. سلول‌های به‌تعداد 1×10^6 مورد درپیت‌های ۹۶ خانه کشت و بعد از ۲۴ ساعت با عصاره فلاونوئیدی با دوزهای ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌مدت ۲۱ روز تیمار شدند. درطی مدت تمایز تغییرات این سلول‌ها با میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شد.

ارزیابی سلول‌های حاصل از تمایز جهت اثر عامل القایی عصاره فلاونوئیدی: دراین تحقیق برای شناسایی سلول‌های تولید کننده انسولین که در شرایط آزمایشگاهی تمایز یافته‌اند از دو روش بررسی مورفولوژیکی سلول‌های حاصل از تمایز با استفاده از رنگ اختصاصی در دیتیزون ,(Dithizone (DTZ (merck,catik 6433055-USA) و بررسی بیان نشان‌گرها اختصای سلول‌های بتا به‌روش ایموفلورنس استفاد شد.

رنگ آمیزی دیتیزون: ۵۰ میلی‌گرم دیتیزون در ۱۰ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید(Dimethyl sulphoxod) حل و به‌عنوان محلول استوک دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. درهنگام استفاده دیتیزون با غلظت نهایی ۱۰ میکرو مولار به سلول‌های اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور(PiTo53Rs - ایران) انکوبه شدند. سلول‌هایی که در نتیجه‌ی این رنگ‌آمیزی به‌رنگ قرمز درآمده‌اند سلول‌های تولیده کننده انسولین می‌باشند. جهت شمارش سلول‌های تمایز یافته و سلول‌های متمایز نیافته از لام نئوبار میکروسکوپ نوری(Olympus - ژاپن) استفاده شد.

روش ایمونوفلورسنس: در پژوهش حاضر از آنتی‌بادی‌های اولیه انسولین_پروانسولین و سپتور بتای انسولین استفاده شد. آنتی‌بادی IgG کونژوگه با Flaore scencin iso thio cyanate:FITZ , sigma,cat:F9137:FITC به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه در نظرگرفته شد. برای انجام ایمونوفلورسنس سلول‌های تیمار شده با عصاره فلونوئیدی به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌محلول ۴ درصد پارا فرمالدهید انکوبه شدند، پس از شست‌وشو با فسفات با فرمالین سلول‌ها با محلول بلاک کننده حاوی ۳۰ درصد تریتون X ۱۰۰ و ۱۰ درصد سرم نرمال بز در PBS به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سلول‌ها به‌مدت دو ساعت با آنتی‌بادی‌های اولیه و پس از شست وشو با PBS به‌مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. درنهایت نمونه توسط گلیسرول ۷۰ درصد روی لام چسبانده و توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus - ژاپن) مشاهده شدند.

پرورش و نگهداری حیوانات: در این پژوهش از رت‌های صحرایی نر بالغ با وزن حدود ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. رت‌های صحرایی پس از خریداری شدن به اتاق حیوانات واقع در دانشگاه خوارزمی تهران انتقال و همگی در شرایط استاندارد حیوان خانه‌ای ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترس کافی به‌آب و غذا در دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

قوانین اخلاقی مربوط به نگه‌داری و کار با حیوانات در همه مراحل آزمایش رعایت شد (این طرح درکمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی با کد اخلاق IR.Khu.REC.1398.031 به‌تصویب رسیده است.)

گروه بندی حیوانات: برای انجام این مطالعه، رت‌ها در شش گروه ۵ سری تقسیم‌بندی شدند.

۱- رت‌های سالم به‌عنوان شاهد (Ctrl-)

۲- رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (Ctrl+)

۳- رت‌های دیابتی تیمار شده با سلول‌های تمایز یافته بتا تحت تاثیر عصاره فلاونوئیدی ۵۰ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم (B_{50})

۴- رت‌های دیابتی تیمارشده با سلول‌های تمایز یافته بتا تحت تاثیر عصاره فلاونوئیدی ۱۰۰ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم (B_{100})

۵- رت‌های دیابتی تیمار شده هم‌زمان با سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر عصاره فلاونوئیدی ۵۰ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم و عصاره فلاونوئیدی با دوز ۵۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم (B50+F50)

۶- رت‌های دیابتی تیمار شده هم‌زمان با سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر عصاره فلاونوئیدی۵۰ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم و عصاره فلاونوئیدی با دوز ۱۰۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم (B100+F100)

ایجاد مدل حیوانی دیابت: جهت القای دیابت در رت‌ها، استرپتوزوتوسین(Sterptozotocin/Zell io GmbH) با دوز ۶۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی (IP) به‌میزان تزریق شد. STZ در سرم فیزیولوژی سرد حل شده و به‌صورت تازه استفاده شد. ۷۲ ساعت بعد از القای دیابت از دم حیوان خون‌گیری شد. میزان قند خون با دستگاه گلوکومتر(Germany Mdss Gmh) اندازه‌گیری شد. حیوان با قند خون ناشتای بیش‌تر از ۲۵۰ mg/dl دیابتی تلقی شد.

پیوند سلول‌ها به حیوانات دیابتی شده: پس از القای بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد با دوز ۵۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد با دوز ۵۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم دم موش را به‌مدت یک دقیقه در آب گرم نگه‌داشته تا عروق دم شوند و بدین ترتیب سیاهرگ نمایان شود. سپس به‌کمک سرنگ انسولین PBS ۵ درصد حاوی تعداد $1X10^{6}$ عدد سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز به سیاهرگ دمی رت‌های دیابتی گروه‌های تحت درمان تزریق شد. علاوه بر تزریق سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز به گروه‌های تحت درمان به‌مدت ۰۲ روز به‌دو گروه $)_{05}F+_{05}B($ و $()_{001}F+_{001}B$ به‌ترتیب عصاره فلاونوئیدی با دوز ۰۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و ۰۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم نیز تزریق شد.

ارزیابی بهبود عملکردی: بعداز پیوند سلولی هر روز یک‌بار به‌مدت ۲۰ روز، سطح قند خون رت‌ها اندازه‌گیری شد. برای این منظور حیوانات از شب پیش ناشتا نگه‌داشته می‌شدند. سپس با لانست زدن مستقیم به روی دم میزان یک قطره خون روی نوار مخصوص دستگاه گلوکومتر قرارداده شد. به‌این‌ترتیب میزان قند خون ناشتا (FBS) اندازه‌گیری شد.

درنهایت ۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز و بعد از بی‌هوش نمودن رت‌ها به‌کمک کلروفرم با شکافتن قفسه سینه آن‌ها و با کمک سرنگ از درون قلب خون‌گیری به‌عمل آمد و پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه‌های خونی به‌میزان کافی سرم تهیه و سپس تا زمان بررسی متغیرها دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریز نگه‌داری شد.

میزان قند خون توسط دستگاه گلوکومتر و سطح کراتین (Cr)، اوره و اسید اوریک سرمی نیز از طریق روش کالریمتری با کمک کیت تجاری (پارس آزمون- ایران) اندازه‌گیری شد.

در مرحله بعدی با استفاده از ست جراحی برداشت باعث پانکراس انجام گرفت و مقداری از این بافت به نسبت ۱ به ۴ در مایع حاوی RNA later (USA-Znvitrogen Tm) جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن PAX_4 دخیره شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن مورد بررسی در پژوهش حاضر از روش Real–TimePCR استفاده شد.

مراحل انجام تکنیک Real-Time PCR:

استخراج RNA: برای استخراج RNA از کیت تجاری RNA^{TM} (سیناژن_ایران) مورد استفاده قرارگرفت و کلیه مراحل طبق پروتکل کیت و با استفاده از محلول‌های کیت و ستون اسپین کالم استخراج RNA انجام شد. برای بررسی درصد خلوص غلظت RNA و میزان ۲۶۰ به ۲۸۰ از دستگاه اسپکتوفتومتری (آمریکا_Nano Drop.Thermo Fisher sceimtific) (Nano Drop) استفاده شد.

ساخت cDNA: پس از اطمینان از خالص بودن RNA استخراج شده سنتز cDNA با استفاده ازکیت (یکتا تجهیز آزما _ ایران) انجام شد و تمامی مراحل طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از مواد و محلول‌های موجود در کیت زیر سرد و روی یخ انجام گرفت.

طراحی و سنتز پرایمر: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش براساس توالی ژن مربوطه که از سایت NCBI به‌دست آمدند و با استفاده از نرم افزار PRIMER3 طراحی و سپس از توالی ژن PAX_4 سنتز شدند. توالی مربوط درجدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توالی مربوط به پرایمر بالا دست (F) و پایین دست (R) ژن PAX_4

Gens ame	Sequences of Primers	Annpoling temperature	Prodact size(hp)
PAX_4	F: $^{5'}$CTGAGGCACTGGAGAAAGAG$^{3'}$ R: $^{5'}$CTCAGAAGCACCTGGCATC$^{3'}$	57	182

مراحل انجام Real time PCR: مراحل انجام واکنش Real time PCR از کیت SYBR Green (یکتا تجهیز آزما _ ایران) استفاده شد. تمام مراحل در شرایط استاندارد و طبق پروتکل کیت انجام گرفت. مخلوط واکنش پس از آماده سازی تحت تاثیر برنامه دمایی ذکرشده در پروتوکل کیت دردستگاهReal Time قرار گرفت. تمامی واکنش‌های دو مرتبه تکرار شد و به‌منظور تائید ژن مورد نظر آنالیز منحنی Meltig محصول PCR بااستفاده از نرم افزار Real Time RT-PCR انجام گرفت.

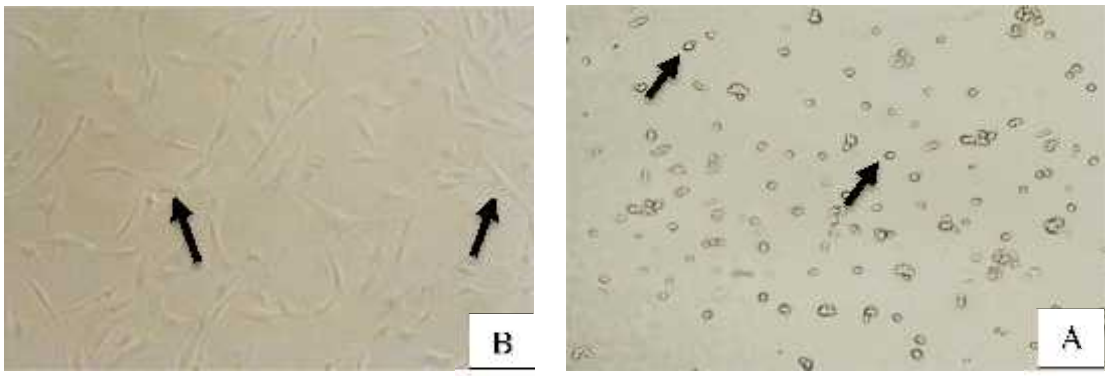
آنالیز آماری:

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار و با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (LSD-Tukey) و براساس نرم افزار SPSS۱۹ تجزیه و تحلیل شد. نمودارها براساس نرم افزار prism رسم شده است. مقادیر p≤۰/۰۵ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتایج

سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی موش‌های نر بالغ نشان دادند که این سلول‌ها دارای خاصیت چسبندگی به‌ظرف پلاستیکی و توانایی تشکیل کلونی درشرایط آزمایشگاهی را دارند. در ابتدای استخراج، این سلول‌های کروی شکل بودند و بعد از گذشت یک هفته به‌شکل دوکی کشیده درآمدند. شکل ظاهر این سلول‌ها مشابه سلول‌های فیبروبلاست است.

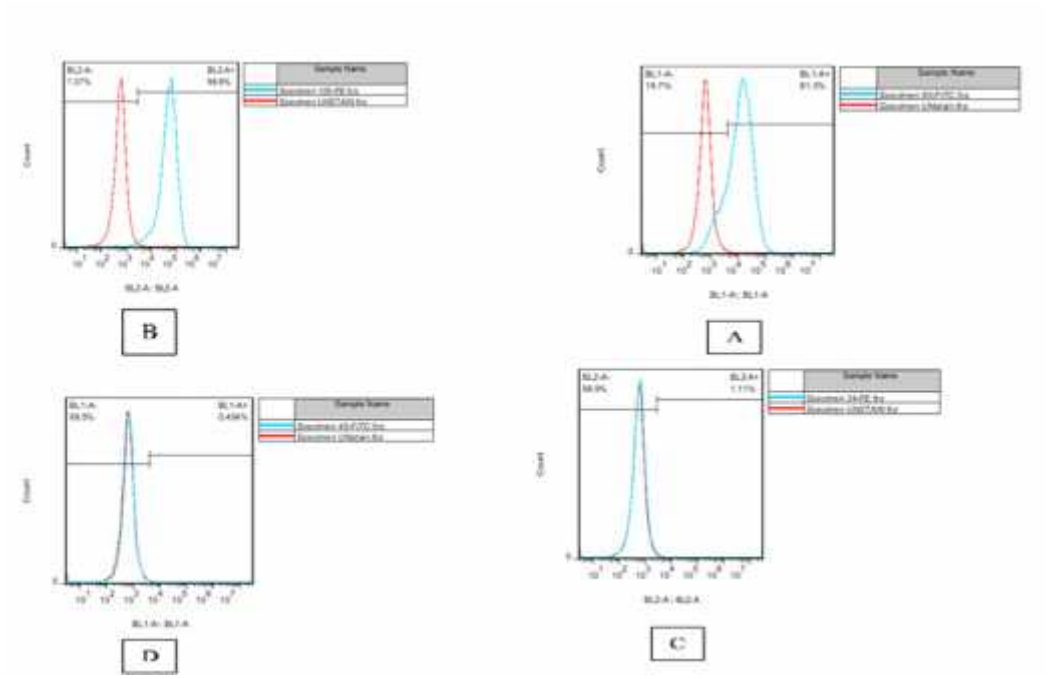
با این تفاوت که سلول‌های فیبروبلاست قابلیت تحمل پاساژهای متوالی و نیز توانایی تمایز به دودمان‌های مختلف را ندارند (شکل ۱).



شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی رت. A: بلافاصله پس از استخراج و در روز اول سلول‌ها حالت کروی داشته و به‌صورت پراکنده و معلق دیده می‌شوند. پیکان‌ها به‌سلول‌های حالت کروی اشاره دارد. B: سلول‌های بنیادی استخراج شده با تراکم بالا بعد از یک هفته از کشت. این سلول‌ها تشکیل کلونی داده و مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست پیدا می‌کنند. پیکان‌ها به‌کلونی‌های تشکیل شده اشاره دارد.

بررسی نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی:

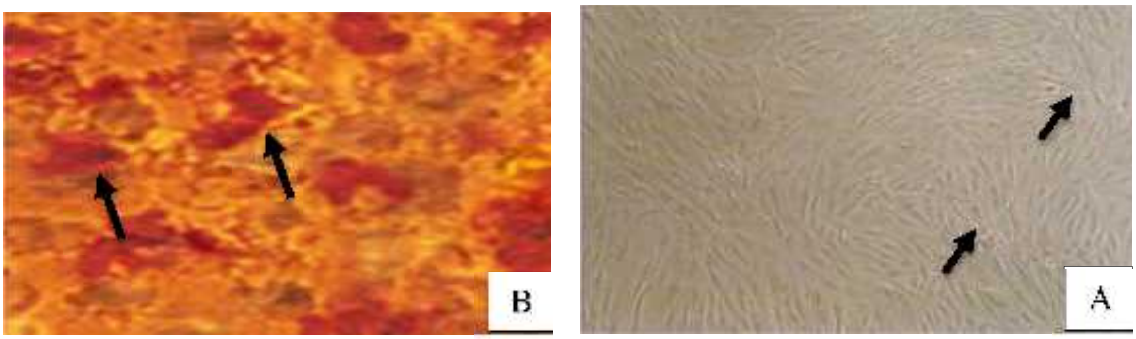
در بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌منظور بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، بیان مارکرهای سطحی با استفاده از فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این سلول‌ها با مارکرهای CD_{90} و CD_{105} را به‌صورت مثبت بیان کرده و از نظر بیان مارکرهای CD_{34} وCD_{45} منفی هستند (شکل ۲).



شکل ۲: نمودار بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌وسیله فلوسایتومتری بافت چربی، سلول‌ها از نظر بیان مارکرها CD_{90} (A) و CD_{105}(B) مثبت و از نظر بیان مارکرهای CD_{34}(C) و CD_{45}(D) منفی هستند

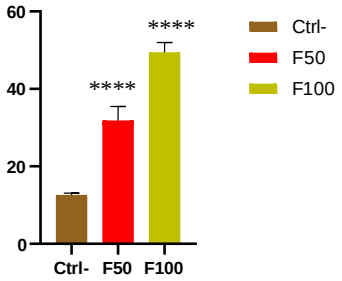
اثبات هویت سلول‌های تولید کننده انسولین حاصل از تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با رنگ‌آمیزی دیتیزون (DTZ):

دیتیزون عامل متصل شونده به فلز روی می‌باشد که به‌صورت انتخابی سلول‌های بتا پانکراس را به رنگ قرمز درمی‌آورد (۱۱). در این پژوهش با کمک رنگ‌آمیزی DTZ وجود سلول‌های تولید کننده انسولین به‌اثبات رسیدند. سلول‌های دوکی شکل MSCs تحت عصاره فلاونوئیدی تغییر مورفولوژی دادند و به‌حالت کروی و خوشه‌ای و به‌صورت تجمعی به‌رنگ قرمز آجری درآمدند (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات مورفولوژیک. A: سلول‌های دوکی شکل شبیه فیبروبلاست قبل از تمایز، پیکان‌ها به سلول‌های فیبروبلاستی اشاره دارند. B: رنگ‌آمیزی DTZ پیکان‌ها به سلول‌های تمایزیافته به‌شکل تجمعات خوشه‌ای و رنگ قرمز آجری اشاره دارند.

هم‌چنین یافته‌های به‌دست آمده از شمارش سلول‌ها نشان داد که عصاره فلاونوئیدی در القای فتوتیپ سلول‌های تولید کننده انسولین در MSCs اثر مثبت دارد. زیرا درصد تمایز در تمام گروه‌ها با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری نشان داد، با افزایش غلظت عصاره درصد تمایز به‌صورت چشم‌گیری افزایش یافت (نمودار ۱).

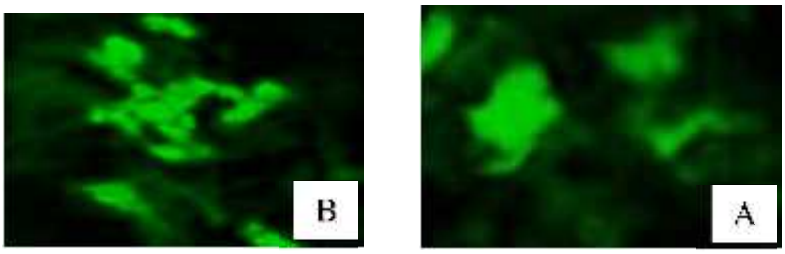


نمودار ۱: غلظت های ۵۰mg/ml و ۱۰۰ عصاره فلاونوئیدی به عنوان عامل القا کننده سلولهای MSCS به سلولهای بتا پانکراس به کاربرده شد. غلظت صفر عصاره فلاونوئیدی به عنوان گروه کنترل منفی درنظر گرفته شد و در این گروه سلول‌های SMSCS در معرض هیچ گونه عامل القاکننده ای قرار نگرفتند.

بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های انسولین ساز در سلول‌های تمایز یافته تحت تاثیر عصاره فلاونوئیدی:

سلول‌های MSCs بعد از ۲۱ روز تمایز با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره فلاونوئیدی از نظر بیان نشان‌گرهای انسولین_پروانسولین و گیرنده‌های بتای انسولین که ویژه سلول‌های بتای پانکراس هستند مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های

انسولین ساز حاصل از اثر ترکیبات فلاونوئیدی نشان دادند که قادر به بیان پروتئین انسولین_پروانسولین و رسپتور بتای انسولین بودند (شکل ۴).

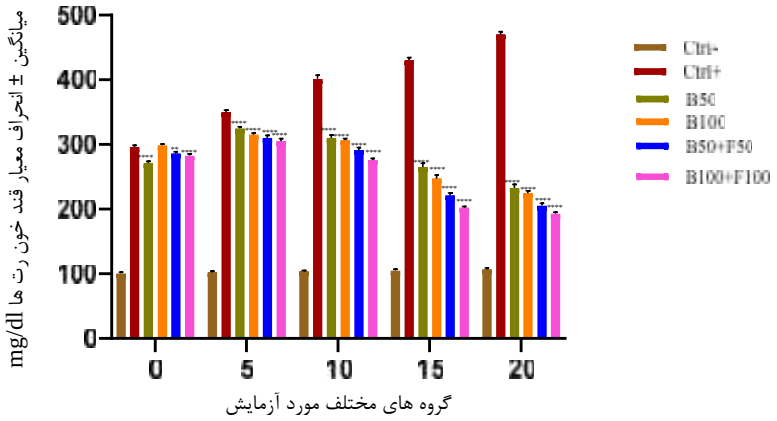


شکل ۴: تصویر میکروسکوپ فلورسنس از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های تولید کننده انسولین تحت عصاره فلاونوئیدی. A: سلول‌های تیمار شده با عصاره که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه انسولین _ پروانسولین استفاده شده است (۴۰۰x). B: سلول‌های تیمار شده با عصاره که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه گیرنده جای انسولین استفاده شده است (۴۰۰x)

بررسی میزان قند خون: برای بررسی نتایج حاصل از تزریق تمایز MSCs بر میزان گلوکز در رت‌های دیابتی در طی مدت زمان ۲۰ روز به‌فاصله هر ۵ روز میزان قند خون اندازه‌گیری شد که بیش‌ترین تاثیر در زمان ۲۰ روز دیده شد (جدول ۲)، (نمودار ۲) (۵ ٪ ≥p).

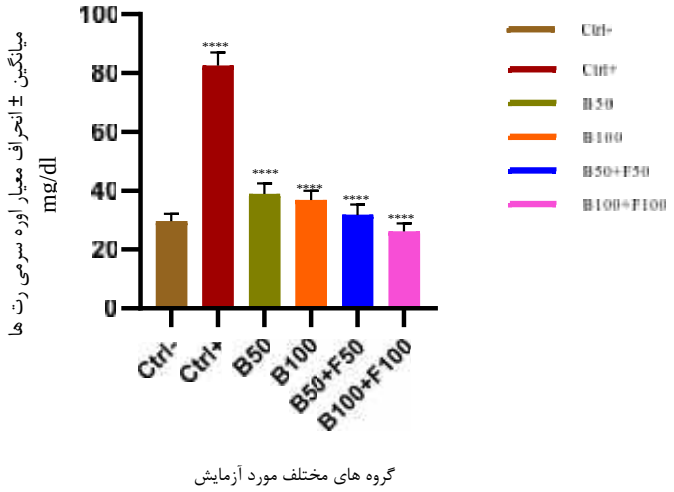
جدول ۲: توزیع میزان قند خون رت‌ها در زمان‌های مختلف به‌تفکیک گروه‌های درمانی، نتایج به‌صورت mean±SD بیان شده‌اند.

گروه ها	پارامتر	میزان قند خون mg/dl
Ctrl-	روز صفر	۱۰۰/±۶ ۲/۰۵
Ctrl+		±۲۹۶ ۲/۴۴
B50		۲۷۱/±۶ ۲/۱۵
B100		۲۹۸/±۴ ۲/۲۳
B50+F50		۲۸۶ 2±/۷۵
B100+F100		۲۸۲/±۶ ۲/۴۱
Ctrl-	روز پنجم	۱۰۲/±۲ ۱/۶۹
Ctrl+		۳۴۹/±۸ ۳/۱۲
B50		۳۲۴/±۶ ۲/۷۲
B100		±۳۱۵ ۲/۲۸
B50+F50		۳۱۰/±۴ ۳/۵۵
B100+F100		۳۰۵/±۴ ۳/۴۴
Ctrl-	روز دهم	±۱۰۴ ۱/۴۱
Ctrl+		۴۰۱/±۴ ۵/۵۴
B50		±۳۱۰ ۴/۹۷
B100		۳۰۶/±۴ ۲/۷۲
B50+F50		۲۹۱/±۴ ۳/۸۶
B100+F100		۲۷۶/±۲ ۲/۴۸
Ctrl-	روز پانزدهم	۱۰۵/±۲ ۲/۰۳
Ctrl+		۴۳۰/±۴ ۳/۸۷
B50		۲۵۶/±۲ ۵/۹۱
B100		۲۴۷/±۲ ۵/۴۱
B50+F50		۲۲۱/±۲ ۳/۶
B100+F100		۲۰۲/±۶ ۱/۹۳
Ctrl-	روز بیستم	۱۰۶/±۸ ۲/۰۸
Ctrl+		۴۷۰/±۲ ۴/۳۵
B50		۲۳۲/±۶ ۵/۷۴
B100		۲۲۴/±۶ ۳/۸۲
B50+F50		۲۰۵/±۸ ۳/۳۱
B100+F100		۱۹۳/±۲ ۲/۱۳



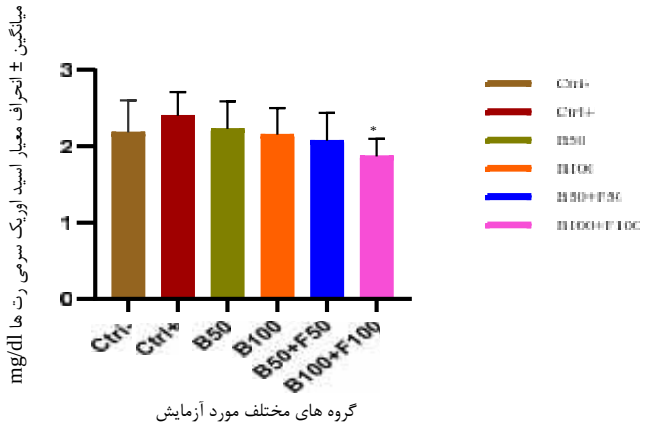
نمودار ۲: تغییرات میزان قند خون رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایش در روزهای صفر، پنجم، دهم، پانزدهم و بیستم تحت تزریق سلول‌های تمایزیافته انسولین ساز و عصاره فلاونوئیدی با دوزهای مختلف

اثر فلاونوئید بر غلظت اوره خون: نتایج نشان داد که میانگین میزان اوره سرم در گروه منفی و دیابتی (Ctrl+) به‌ترتیب ۲/۵۷± ۲۹/۶ و ۴/۴۵ ± ۸۲/۵۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و در گروه‌های دیابتی تحت درمان B_{50} و B_{100}، ۳/۶۲ ± ۳۸/۶۲ و ۳/۲۷±۳۶/۸۰ و درگروه‌های دیابتی تیمار شده‌ی $B_{50+}F_{50}$، $B_{100}+F_{100}$ به‌ترتیب ۳/۵۴±۳۱/۷۶ و ۲/۷۴±۲۶/۱ میلی گرم در دسی لیتر بود. سطح اوره در گروه دیابتی (Ctrl+) در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری نشان داد. در گروه‌های دیابتی تحت درمان نیز میزان اوره نسبت به گروه دیابتی(Ctrl+) به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته بود، به‌طوری‌که این کاهش در گروه دیابتی درمانی $B_{100}+F_{100}$ معنی‌دار بوده است (نمودار ۳) ($p\leq ۰/۰۵$).



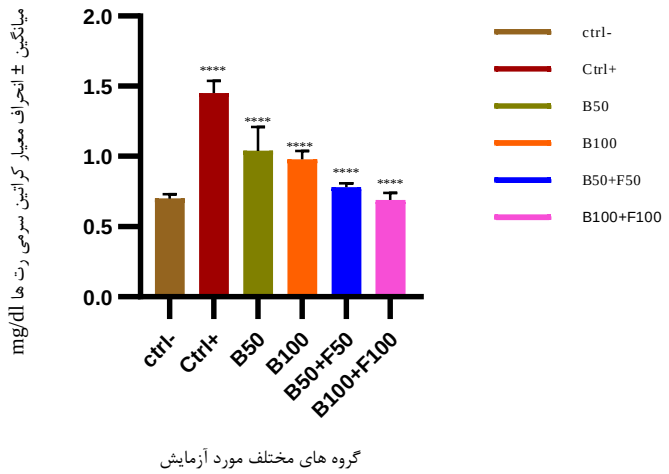
نمودار ۳: تغییرات میزان اوره سرمی رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی تحت تزریق سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز و عصاره فلاونوئیدی با دوزهای مختلف

اثر فلاونوئیدی بر غلظت اسید اوریک: میانگین میزان اسید اوریک سرمی درگروه کنترل منفی و دیابتی (Ctrl+) ۱۸/۴۲±۲/۰ و ۰/۳۱±۲/۴۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و در گروه‌های دیابتی تیمار شده B_{50} و B_{100} ۰/۳۶ ۲۳±۲/ و ۰/۳۵ ۲/۱۵± میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و در گروه‌های دیابتی تحت درمان $B_{50} + F_{50}$، $B_{100} + F_{100}$ به‌ترتیب ۰/۳۷±۲/۰۷ و ۰/۲۳±۱/۸۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. اختلاف میانگین اوره درگروه دیابتی (Ctrl+) نسبت به گروه کنترل منفی دارای کاهش بود ولی این کاهش معنی‌دار نبوده است. میانگین غلظت اوره درگروه‌های دیابتی تحت درمان نسبت به گروه دیابتی (Ctrl+) کاهش یافته بود که این کاهش صرفا در گروه دیابتی درمانی $B_{100} + F_{100}$ معنی‌دار بود (نمودار ۴) ($p \leq ۰/۰۵$).



نمودار ۴: تغییرات میزان اسید اوریک سرمی رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی تحت تزریق سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز و عصاره فلاونوئیدی با دوزهای مختلف

اثر فلاونوئید بر غلظت کراتین خون (cr): میانگین کراتین سرم درگروه دیابتی (Ctrl+) ۰/۰۹ ۴۵±۱/ نسبت به گروه کنترل منفی ۰/۰۳±۰/۷۰ افزایش معنی‌داری را نشان داد، هم‌چنین میانگین غلظت اوره در گروه‌های دیابتی تحت درمان B_{50} و B_{100} به‌ترتیب ۰/۱۷±۱/۰۴ و ۰/۰۶±۰/۹۸ و در گروه‌های دیابتی تحت تیمار $B_{50} + F_{50}$ و $B_{100} + F_{100}$ به‌ترتیب ۰/۰۳±۰/۷۸ و ۰/۰۵±۰/۶۹ بود که در مقایسه با گروه دیابتی (Ctrl+) کاهش معنی‌دار را نشان دادند. به‌طوری‌که در این کاهش معنی‌دار میانگین میزان کراتین سرم گروه دیابتی دریافت کننده $B_{100} + F_{100}$ مشابه گروه کنترل منفی بود (نمودار ۵) ($p \leq ۰/۰۵$).

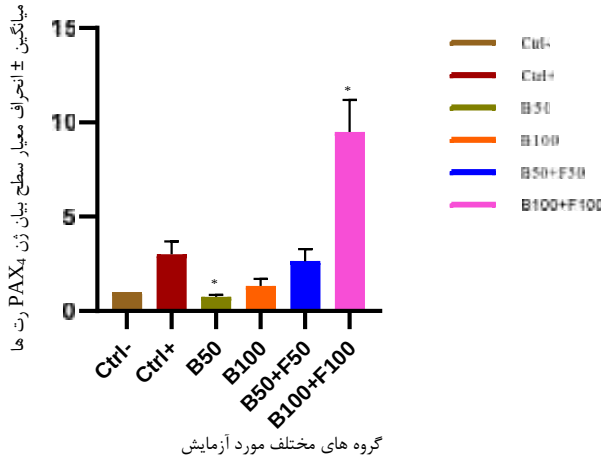


نمودار ۵: تغییرات میزان کراتین سرمی رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی تحت تزریق سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز و عصاره فلاونوئیدی با دوزهای مختلف

:Real- Time PCR

پس از انجام RT-PCR منحنی تکثیر cDNA برای ژن اختصاص PAX_4 رسم شد و CT آن نیز تعیین شد. تحلیل آماری ژن PAX_4 نیز با نرم افزار SPSS انجام شد و ازآن‌جایی‌که داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. میزان بیان این ژن درگروه‌های دیابتی تیمار شده با B_{50}، B_{100} و $B_{50}+F_{50}$ نسبت به گروه‌های کنترل منفی و دیابتی (Ctrl+) دارای کاهش بوده است که این کاهش صرفا در گروه دیابتی تیمار شده با B_{50} معنی‌دار نشان داده شد، هم‌چنین میزان بیان ژن PAX_4 در گروه دیابتی تیمار شده با $B_{100}+F_{100}$ نسبت به گروه کنترل منفی و دیابتی (Ctrl+) افزایش معنی‌دار را نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$).

طبق شواهد می‌توان نتیجه گرفت که سطح بیان این ژن در گروه دیابتی تحت درمان هم‌زمان با سلول‌های تمایز یافته بتای تحت عصاره فلاونوئیدی ۱۰۰ میلی‌لیتر برمیلی‌لیتر و تزریق عصاره فلاونوئیدی با غلظت ۱۰۰ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری داشته است (نمودار ۶) ($p\leq ۰/۰۵$).



نمودار ۶: تغییرات سطح بیان ژن PAX4 رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی تحت تزریق سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز و عصاره فلاونوئیدی با دوزهای مختلف

بحث

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۰ توسط Garcia و همکاران (۱۲) انجام پذیرفت، مقدار $۱۰^{۶}$ عدد سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسان را به رت‌های دیابتی تزریق کردند که نتایج حاکی از کاهش قند خون در طول دوره درمان بود (۱۲). در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای توسط Wilson و همکاران (۱۳). روی قابلیت کشت و تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی انجام شد مشخص شد می توان از سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی به‌عنوان یک منبع جدید و مهم برای تمایز به انواع مختلفی از سلول‌ها استفاده کرد.

Wang (۱۴) و هم‌چنین Phuc و همکاران (۱۵) موفق به‌تولید سلول‌های بتا پانکراس از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به‌دست آمده از خون بند ناف شدند که پس از تزریق به موش دیابتی توانستند سطح گلوکز خون را کاهش دهند.

شواهد بسیاری نشان داده اند که تانن‌ها و پلی فنول‌ها به‌خصوص فلاونوئیدی‌ها، دارای اثرات ضددیابتی هستند و از آن‌جا که دیابت تعادل سطح تولید رادیکال آزاد یا سطح فعالیت آنتی اکسیدانت‌های بدن را بر هم می‌زند در نتیجه استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که هایپرکلیسمی یکی از عوامل اصلی ایجاد استرس اکسیدایتو است به‌طوری‌که دیابت به‌افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم دفاع آنتی اکسیدانت بدن همراه است، نتیجه استرس اکسیداتیو سازی یا آسیب سلولی، تخریب DNA، پروتئین و لیپدها، برهم خوردن هومئوستازی سلولی و ذخیره مولکولی آسیب دیده می‌باشد (۱۶). بسیاری از ترکیبات گیاهان دارویی ازجمله پلی‌فنول‌ها دارای خواص آنتی اکسیدانتی هستند. ترکیبات پلی فنولی خصوصا فلاونوئیدها اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سموم کبد، رادیکال‌های آزاد و آنتی دیابتی دارند (۱۷).

در تحقیق که توسط کریمی و همکاران (۱۸) انجام پذیرفت نشان داده شد که در ریشه گیاه جغجغه به‌علت داشتن ترکیبات آلکالوئید، فلاونوئید و تانن و با توجه به مکانیزهای متفاوتی مانند افزایش ترشح انسولین، فعال کردن مسیر کاتابولیسم گلوکز، مهار و یا غیرفعال کردن مسیر گلوکونئوژنز و هدایت گلوکز به‌داخل سلول، جذب گلوکز آزاد و ممانعت از اتصال آن‌ها به پروتئین‌ها و ممانعت از جذب گلوکز از روده، غلظت گلوکز سرم خون را کاهش می‌دهد.

در پژوهشی که توسط Eidi (۱۹) انجام پذیرفته نشان داده شد که عصاره اتانولی بخش هوایی گیاه Salvia syriaca به‌علت داشتن ترکیبات دارویی به‌ویژه ترپن‌ها، فلاونوئیدها بر هیپرگلیسمی دیابتی که موجب افزایش میزان اوره و کراتین پلاسما می‌شد اثر گذاشته است و علاوه‌بر کاهش معنی‌دار بر میزان اوره کراتین، اسیداوریک و گلوکز موجب افزایش معنی‌دار سطح میزان انسولین سرم می‌شد.

در مطالعه‌ایی که توسط Zarezadeh و همکاران (۲۰) انجام پذیرفت مشخص شد گل‌برگ زعفران که عموما به‌عنوان یک منبع طبیعی آنتی اکسیدانت در نظر گرفته می‌شود و باتوجه به‌تاثیر مصرف ۲۸ روزه عصاره الکلی این گیاه دارویی بررسی سنجش تغییرات بیوشیمیایی رت‌های دیابتی نشان داده شد که عصاره گل‌برک زعفران توانسته است سبب کاهش قند خون، اوره خون و کراتین در گروه‌های درمانی نسبت به‌گروه دیابتی شود.

طی تحقیق که توسط Hedayati و همکاران (۲۱) انجام پذیرفت تایید شده است که فلاونوئیدهای Quercetin و morin موجود در گیاه گلدر (*Otostegia persica*) علاوه بر اثرات آنتی اکسیدانتی، آنتی آلرژیک، ضد التهابی، ضد موتاسیون و ضد سرطانی از توانایی مهار لیپاز پانکراسی نیز برخوردار است. علاوه‌بر آن تاکید کردند که فلاونوئیدها موجود در این گیاه از چند طریق عمل آنتی اکسیدانت خود را انجام می‌دهد مثلا" ترکیب با رادیکال‌های آزاد و تولید محصولاتی با فعالیت کم‌تر، مهار آنزیم‌های متابولیکی بدن مثل لیپواکسیژنار، گزانتین اکسیداز و نتیریک اکسید سنتتاز که در تولید رادیکال‌های آزاد دخیل هستند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات فلاونوئیدی پوست سبز گردو چه در جهت تیمار رت‌ها با سلول‌های بنیاد مزانشیمی بافت چربی تمایز یافته به‌سلول‌های انسولین ساز و چه تزریق بعد از مورد تیمار قرار دادن رت ها با سلول‌ها تمایزیافته کاهش معنی‌دار در قند خون طی ۲۰ روزه، اوره، اسید اوریک و کراتین نشان داد.

دراین تحقیق باتوجه به مطالعات قبلی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین مشاهده شد که استرپتوزوتوسین با تخریب پانکراس ایجاد دیابت می‌کند و روی متغیرهای مورد نیاز تاثیر می‌گذارد. تغییرات برروی موارد مورد بررسی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی تمایز یافته توسط عصاره فلاونوئیدی به‌میزان ترتیب سلول‌های انسولین ساز پانکراس وابسته است. برای توضیح این یافته دو دلیل وجود داشته است:

۱- احتمالا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی که تحت تاثیر فلاونوئیدی به‌سلول‌های انسولین ساز پانکراس تمایز یافتند پس از تزریق جایگزین سلول‌های بتای تخریب شده‌اند یا باعث بهبود سلول‌های تخریب شده شده‌اند.

۲- علاوه بر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به سلول‌های انسولین ساز، تزریق هم‌زمان عصاره فلاونوئیدی علاوه‌بر جایگزینی یا بهبود سلول‌های انسولین ساز تخریب شده باعث جلوگیری از مرگ مابقی سلول‌های بتا شده‌اند.

کاوالی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در صورت خوردن دانه‌های گزنه باعث درمان آن‌ها می شود به‌طوری‌که دانه گیاه گزنه به‌علت داشتن ترکیبات فلاونوئیدی قادر است باعث کاهش گلوکز خون درگروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شود و تعداد سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس را در مقایسه با گروه دیابتی افزایش دهد (۲۲).

اگر چه تحقیقات نشان داده است فلاونوئیدهای با تمایز سلول‌های چربی و از طریق ممانعت و یا تغییر میان ژن‌های کلیدی دخیل در فرآیندهای کنترل شاخص‌های دیابتی می‌توانند آن‌ها را تاحدی به‌سطح نرمال بازگرداند (۲۳) ولی یکی دیگر از ساز و کارهایی که ماده القاگر ازطریق آن اثر خود را بر تمایز سلول‌های بنیادی اعمال می‌کند تغییر در میان برخی ژن‌های بخش اندوکرین و یا اگزوکرین پانکراس است ازجمله این ژن ها می توان: Pax_6,Haf ,3B,Mnf-1a,Mafa-D_1, Pdx_1,Pax_4 اشاره کرد (۲۴). PAX_4 یک ژن زوج دومین هموباکسی است که بیان آن در سلول‌های بتای پانکراس دردوران جنینی آغاز و تا بزرگ‌سالی ادامه دارد. این ژن در ترشح گلوکاگون، انسولین و سوماتواستاتین نقش دارد و برای تمایز، بقا و گسترش سلول‌های بتا پانکراس لازم است (۲۵).

هم‌چنین پروتئین‌های هومئودومین PAX_4 را کد می‌کند که حضور آن‌ها برای تمایز سلول‌های بتای پانکراس ضروری است. نقش اصلی این ژن کنترل تکوین سلول‌های بتا و دلتا است، تحقیقات نشان داده که موش هایی که فاقد PAX_4 هستند سه روز بعد از تولد به‌دلیل نبود سلول‌های بتا و دلتا می‌میرند (۲۶). گاج و همکاران (۲۷) در طی پژوهشی که برروی سلول‌های بنیادی جنینی انسان انجام دادند، دریافتند بیان بیش ازحد PAX_4 بیان گلوکاگون را در سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می‌دهد و منجر به بهبود تعداد سلول‌های تولد کننده انسولین می شود .

درپژوهشی لی و همکارانش که (۲۸) انجام دادند نشان دادن که بیان بالای PAX_4 در سلول‌ها بتا بالغ جزایر لانگرهانس از هایپرگلیسمی جلوگیری می‌کند.

در مطالعه‌ایی که توسط زانگ و همکاران (۲۹) پذیرفت، نهایت به‌این نتیجه رسیدند که انتقال ژن PAX_4 به سلول‌های آلفا می‌تواند آن‌ها را به سلول‌های بتا عمل‌کردی تبدیل کند به‌طوری‌که نتایج این آزمایش می‌تواند یک نوید راه‌برد درمانی مناسب برای درمان دیابت به‌ویژه دیابت وابسته به انسولین با دست کاری ژن PAX_4 در آینده‌ای نزدیک باشد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی رت‌ها می‌توانند در محیط آزمایشگاهی تکثیر و تحت اثر ترکیبات فلاونوئیدی به‌سلول‌های انسولین ساز پانکراس تمایز پیدا کنند و پس از پیوند باعث ایجاد تغییرات معناداری در جهت بهبود برخی فاکتورهای بیو شیمیایی سرم در رت‌های دیابتی شوند. به‌طوری‌که استفاده هم‌زمان از سلول‌های تمایز یافته با ترکیبات فلاونوئیدی دارای بیش‌ترین بازدهی بود. هم‌چنین سلول‌های تمایزیافته و ترکیبات فلاونوئیدی باعث تغییر در میزان بیان عوامل رونویسی مرتبط با تکامل و عمل‌کرد سلول‌های پانکراس (فاکتور PAX_4) نیز شدند.

بنابراین باتوجه به اهمیت فوق العاده چشم‌گیر درمان دیابت در جامعه امروزی، ارائه روش‌های نوین برای گسترش سلول‌های بتا و تامین Islet–Like cells مشتق از سلول‌های بنیادی در حال حاضر به‌عنوان گزینه‌ای سلول درمانی مورد توجه و بحث است، هم‌چنین می‌توان جهت افزایش پتانسیل سلول درمانی هم‌زمان از گیاهان دارویی نیز بهره جست که این مطالعه می‌تواند راه‌گشا پژوهش‌های جدید در این زمینه طی دهه‌های آینده باشد.

تشکر و قدردانی

درنهایت باتوجه به‌این‌که مطالعه حاضر مستخرج از رساله دکتری تخصصی می‌باشد از زحمات بی‌دریغ و راهنمایی‌های حکیمانه کلیه اساتید بزرگوار صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم .

منابع

1. Kazemi1 A , Bahador H. Provide a Predictive Model to Identify People with Diabetes Using the Decision Tree. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism. 2021; 21(3): 151-164.
2. Bouwens L, Noubracken Z, Mfopou JK. The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus. Nature Revews Endocrinology. 2013; 9 (10): 598 -606.
3. Olfatifar M, Karami M , shokri P, Aosseini SM. Prevalence of Chronic Complications and Related Risk Factors of Diabetes in patients Referred of the Diabetes center of Hamadan Nursing ,8 Midwifery Faculty. 2016; 25(2): 69-74.
4. Nougchi H. Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes. World j stem cells. 2002; 1(1):36- 42.
5. Solis MA, Velásquez LM, Correa R, Huang LLH. Stem cells as a potential therapy for diabetes mellitus: a call-to-action in Latin America. 2019;11(20):1-13
6. Solail S, kaviani S, Soleimani M, Zonai Z. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell devived from adipose tissue . koomeh. 2015; 16 (4): 505-511.
7. Esmaeil f, Kharazian N, Aoushmand F. mansourzaweh s. Evaluation of differentiation in duction of wesenchymal stem cells in to pancreatic beta cells by methanolic extract of medi cago sative L. Scientific–Research journal of shahed university. 2015; 11b (22): 51-56.
8. Hosseini s, Karimzadeh K ,Vessal M. Effects of a Hvdroalcoholic Extract of Valnut male Flowers on Diabetic Rats. Zirms. 2013; 15 (11): 44-58.
9. Cheraghali F, Mirmoghatadate L, Shajaee-Aliabad S, Hosseini SM. A Comparative study of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Walnut Green Husk Aqueous Extract efore and after microencop sulation .Iranian Journal of Nutrition Sciences 8 Food Technology. 2016 l; 11(2):113-124.

10. Dastoo R, Bakhshi D, Aliakar A. The assessment of total Phenol. Flavonoid, resveratrol contenol ant: oxidant cap city of vitis vinife L., Pistacia veral., samucaus virga l. and Ilex Spiningera. loes Eco Phytochemical journal of Medicinal Plant. 2017; 5 (2); 37-48.
11. Habibian M, Saghafi MR, Far zanegip. The Effect of Regular swimming Exercise on the levels of Renal Matrix metalloproteinase–2 and Trans forming Growth factor–b_1 in Rats with Diabetes. Journal of Kerman university of Medical Sciences. 2016; 23(4): 446 -456.
12. Garcia MM, Fandel TM, lin G, Shindel AW, et al. Treatment of Crectile dysfunction in the obese typy2 diabetic ZDF rat with adipose tissue derived stem cell. Z sexual med. 2010; 1(1pt1):89-98.
13. Wilson B, Liotta LA, Petri cation .Dynamic Protein Pathway activation mapping of adipose – derived stem cell differentiation implicates novel regulator of adipocyte differentiation , Molecular 8 Cellular Proteomics : M C P. 2013;12(9) ; 2522-35 .
14. Wang H S, Shyu JF, Shen WS, Hsu Hc. et al . Transplantation of in sulin –Producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. Cell Transplant. 2017; 20(3): 255-466.
15. Phuc PV, Nhung TH, Loan DT, chung DC, et al. Differentiating, of banked human umbilical cord blood- derived mesne chymel stem cell into insulin–secreting Cell. Inviter cell Der Biol Anim. 2011; 47(1): 45-69.
16. Karami M, Mokhtar M, Sharifi E. Assessing the Effect of Hydro alcoholic lea Extract of Mespilus Germania on the Blood levels of Glucose and L. pids in Streptozotocin Induced Diabetic Male pats. Journal of Fasa university of medical sciences. 2014; 4(1): 81-90.
17. Karimi R, Mirzaei F, Rasouli M. Phenolic acid, Flavonoids, Antionx: dant Copacity and Minerals content in fruit of five Grapevine Cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology. 2017;18 (1): 89-102.
18. Bazi shad A, Miri, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Hajinezhad MR, et al. the effect of hydro–alcoholic extract prosopis farcta on weight , blood glucose and gene expression of pyruvate Kinase in diabetic tat (type F). Journal Health chimes. 2017; 4(4):1-9.
19. Eid A. Antidiabetic effect of ethanoic extract of aerial parts of salvia syriaca streptozotocin – induced diabetic rats .comparative pathobiology. 2014 ;11(3):1363-1372.
20. Zarezadeh M, Vaziteshenas–Darmiyan KH, Afshar M, Valavi M, et al . Effects of Extract of Clous sativus petal on Kenal Function in Diabetic Rats. J Mazandaran univ med sci.2017; 27 (147): 11-14.
21. Hedayati M, Poaraboli I, Pouraboli B, Dabiri sh, et al. Effects of Otcstegia Perisca extract on serum levels of glucose and morphology of pancreas in diabetic rats .Koome sh. 2012; 13(2): 201-204.
22. kavalali G, Tuncel H, Hatmi HH. Hypoglycemic activity of urticate pilulifera in STZ-diabetic rats . J E thnopharmacol. 2003; 84(2-3): 241-245.
23. Velayuthom R, Sankara doss N, Ahamed Kf. Protective effect of tannins from ficus racemose in htper cholesterolemia and diabetes in duced vascular tissue damage in rats. Asian poc J Trop mod. 2012; 5 (5): 367.73.
24. Ardeshiri M, Zia Jahromi N. The effect of char tine on expression of dax_1 gene in strep to zoto cin–induced diabetic rata Razi journal of medical sciences .2019; 26(6): 44-53
25. Brun Th, Hai Hu He K, lupi R, Boehm B, et al. The diabetes–linked Transcription factor pax_4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP–1. Human mole caller Genetics. 2004;17(4): 472-483.

26. Nikkhah S, sazgar H, Zia jahromi N. Effect of slymarianon blood glucose concentration and pax_4 gene expression and histopathology of Pancreatic tissa in streptozotocin. Induced diabetic wistar rats. Razi journal of medical sciences. 2014; 26(5): 67-70.
27. Goge BK, Baker Rk, Kieffer Tj. overexpression of pax_4 reduces glucagon expression in differentiating h ESC. Islets. 2014; 6 (2): e 29236-9.
28. Li Y, Wen JM, Du GJ, Hu SM, et al. thymol inhibits bladder cancer cell Proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis Biochem Biophys Res common. 2017; 491(2): 530- 6.
29. Zhang y, fava GE , Wang H, Mauvais–Jarvis F, et al. Pax4 gene transfer in deuces x- to–B coll phenotypic conversion and confers therapeutic benefits for diabetes treatment. Mol her. 2016; 24(2): 251-60.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2022; 12(4) *Original Article*

Effects of flavonoid compounds in walnut green skin on increasing cell therapy efficiency by differentiating adipose-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells in diabetic rats

Mashayekh S[1], PhD Student., Azarnia M[2] Ph.D., Fattahi E[1*] Ph.D., Moghadasali R[3] Ph. D

1. Department of Biology, Ayatolla Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2. Department of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: esmail_fattahy@yahoo.com

Received: 23 May. 2021 Accepted: 19 Jan. 2022

Abstract

Aim: In this study, investigated the effect of flavonoid compounds in walnut skin on the production of insulin-secreting cells.

Material and Methods: In this experimental study, adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) were differentiated into insulin-producing cells under sterile conditions for 21 days in the presence of flavonoid extract at doses of 50 and 100 mg/ml. Streptozotocin at a dose of 60 mg/kg was used to diagnose rats. Dithizone staining (DTZ) for insulin, Immunofluorescence to determine the presence of pancreatic beta-specific proteins, Blood glucose measurement by glucometer, Serum creatine, urea and uric acid levels by calorimetry and Reverse chain reaction transcription E-polymerase (RT-PCR) was used to evaluate the expression of PAX4 gene.

Results: AD-MSCs under the above conditions gradually changed from spindle-shaped fibroblasts to circular cells and showed insulin-producing cells using red DTZ dye and insulin secretion .Expression of insulin-pronsulin and beta receptor markers was demonstrated, blood sugar, urea, uric acid and creatinine levels decreased and the expression level of PAX4 gene in experimental groups showed a significant disorder ($P \geq 0.05$).

Conclusion: The results showed that AD-MSCs under the flavonoid extract of walnut green skin have the ability to differentiate into insulin-producing cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Insulin-producing cells, Diabetes, Flavonoids, Differentiation