مجله دیابت و متابولیسم ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۳؛ دوره ۱۳ (شماره۴)۲۹۶-۲۸۷

اثرتمرین استقامتی بر میزان بیان ژن CDK5 در بخش حرکتی نخاع رت‌های نر ویستار دارای نوروپاتی دیابت

محمد کشاورز[۱]، رضا قراخانلو[۱]*، منصوره موحدین[۲]، لیلا باقرصاد[۱]، امیربهادر دخیلی[۱]، علی خازنی[۱]

چکیده

مقدمه: تنظیم افزایشی و کاهشی بیان ژن CDK5 به‌عنوان یک پروتئین کیناز، در سیستم عصبی راه‌اندازی مسیرهای مرگ یا بقا نورون‌ها را به‌همراه دارد. لذا با توجه به اثرات مزمن تمرین استقامتی بر رشد، جوانه زنی و عملکرد نورونی به‌ویژه در شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی، در پژوهش حاضر به بررسی تاثیر ٦ هفته تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن CDK5 در بخش حرکتی نخاع رت‌های نر ویستار با نوروپاتی دیابتی پرداختیم.

روش‌ها: ۲۸ سر موش صحرایی نر ویستار ۱۰ هفته‌ایی پس از رسیدن به وزن مطلوب (۸/٤±۳۲٦/۳گرم)، به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم (C)، تمرین سالم (HT)، کنترل نوروپاتی (N) و تمرین نوروپاتی (NT) تقسیم شدند. دیابت با استفاده از یک وهله تزریق STZ(٤٥ mg/Kg)ایجاد شد. و پس از تایید ایجاد شرایط نوروپاتی توسط تست‌های رفتاری، گروه‌های تمرین ٦ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط و فزاینده را روی تردمیل اجرا کردند و بیان ژن CDK5 در بخش حرکتی سگمنت‌های نخاعی عصب سیاتیک با تکنیک Realtime اندازه‌گیری و با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

یافته‌ها: بیان ژن CDK5 پس از ٦ هفته تمرین استقامتی در بخش حرکتی نخاع گروه تمرین نوروپاتی به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل نوروپاتی کمتر بود. همچنین، تمرین کاهش معنی‌دار سطوح گلوکز خون در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل را به همراه داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش ویژه‌ی CDK5 در توسعه و رشد و یا مرگ نورونی، پژوهش حاضر نشان داد که تمرین استقامتی مزمن با اثرات مفید خود بر شبکه نورونی منجر به کاهش بیان ژن CDK5 در حالت پاتولوژیکی می‌شود.

واژگان کلیدی: CDK5، تمرین استقامتی، نوروپاتی دیابت

۱- گروه تربیت بدنی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۲- گروه آناتومی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

* ***نشانی***: تهران، خیابان جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی ghara_re@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۱۳۹۲/۱۲/۱۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۰۱/۳۰

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ‌ومیر در دنیاست که اختلالات متعددی از جمله نوروپاتی[1]، نفروپاتی[2]، رتینوپاتی[3]، بیماری‌های قلبی عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را به‌دنبال دارد [۱]. به‌منظور ایجاد دیابت نیز در میان مدل‌های حیوانی از تزریق STZ[4] به‌عنوان یک مدل کارآمد برای القای این بیماری استفاده شده است. STZ موجب هایپرگلایسمی و هیپوانسولینی ماندگار در حیوانات دیابتی می‌شود و سرانجام، ورود و تجمع گلوکز اضافی در نورون‌ها موجب راه‌اندازی مسیرهای متابولیکی مخرب می‌گردد [۲]. در مدل‌های مختلف رت‌ها و دیگر نمونه‌های حیوانی، در پی ایجاد دیابت، علائم نوروپاتی دیابت با ظهور این شرایط تخریبی در نورون‌ها همپوشانی داشته است، که ابتدا نورون‌های حسی و سپس حرکتی را درگیر می‌کند [۳].

در بخش حرکتی نخاع، شوکی نورون‌های حرکتی استقرار یافته‌اند که نورون‌های ویژه‌ایی دارای آکسون‌های بلند هستند [٤]. جای‌گیری مناسب نوروفیلامان‌ها در طول آکسون این نورون‌ها در بخش حرکتی به‌منظور شکل گرفتن ساختمان آکسون ضروری می‌باشد، در واقع نوروفیلامان‌ها در طول آکسون نورون‌های حرکتی توسط موتورپروتئین‌ها انتقال داده می‌شود تا جایگاه خود را به منظور جلوگیری از تجمع و شرایط پاتولوژیکی برای شکل دهی ساختار مناسب آکسون پیدا کند [۵]. امراض پاتولوژیکی نورون‌های حرکتی که باعث تخریب این نورون‌ها می‌شود معمولاً نارسایی‌های هستند که سیر پیشرونده در آنها بارز است و از انواع آن می‌توان به اسکلروز آمیوتروفیک جانبی(ALS[5])، اسکلروز جانبی اولیه(PLS[6]) و آتروفی عضلانی پیشرونده (PMA[7]) اشاره کرد، از نشانه‌های نارسایی در نورون‌های حرکتی ضعف و آتروفی عضلانی، خستگی عضلانی و وجود رفلکس‌ها و انقباضات خودبه خود می‌باشد که در نوروپاتی دیابت به چشم می‌خورد [٦]. به‌طور جزئی‌تر در مورد نورون‌های حرکتی، پژوهش‌ها قویاً حاکی از آن هستند که نقص در انتقال آکسونی مواد، پروتئین‌ها و همچنین فسفوریلاسیون نابجای نوروفیلامان‌ها از دلایل اساسی توسعه شرایط پاتولوژیکی نظیر نوروپاتی دیابت، در این نورون‌ها می‌باشد [۷].

CDK5[8] به‌عنوان یک پروتئین کیناز، یکی از اعضای منحصر به فرد خانواده CDKs می‌باشد. عملکرد بهینه و نرمال این کیناز برای بازیابی شرایط هموستاز و توسعه شبکه نرونی ضروری است [۸،۹]. فعالیت بیش از حد و یا عدم تنظیم فعالیت این کیناز در شرایط پاتولوژیک منجر به روند افزایشی در تسریع آپوپتوز و بیماری‌های تخریب عصبی می‌شود [۱۰]. فعالیت و بیان CDK5 در سیستم عصبی مرکزی (CNS) به چشم می‌خورد [۸]. CDK5 به‌عنوان یک کیناز، تنظیم‌کننده اعمال و انتقال آکسونی با فسفوریلاسیون در رشته‌های عصبی (NFs) می‌باشد [۱۱]. Cruz و Tsai (۲۰۰٤) عدم تنظیم فعالیت و بیان CDK5 را در بیماری تخریب عصبی آلزایمر نیز مشاهده کردند [۱۲]. Alvira و همکاران نیز (۲۰۰٦) نقش محافظتی و یا افزایشی CDK5 در روند آپوپتوز را در نورون‌های محیط کشت بیان کردند [۱۳]. همچنین Crews و Masliah (۲۰۱۰) نقش CDK5 را در روند بیماری آلزایمر به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی پیش‌رونده گزارش کردند [۱٤]. به‌طور کلی مطالعات حاکی از نقش CDK5 در فرآیندهای تنظیم هموستاز و توسعه نرونی [۱۵]، آپوپتوز عصبی [۱٦]، انتقال آکسونی [۱۱]، و تنظیم فسفوریلاسیون سیتواسکلتون آکسونی [۷] می‌باشد. مشخص شده است که فسفوریلاسیون نابجای نروفیلامان‌ها در بسیاری از بیماری‌های تخریب عصبی رخ می‌دهد، همچنین در مدل رت‌های دیابتی شده با تزریق STZ نیز این غیر نرمال بودن فسفوریلاسیون در اعصاب مشاهده شده است [۷].

مطالعات بنیادی نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی یک روش امیدبخش به‌منظور افزایش بازسازی آکسونی[9] است.

---

[1] Neuropathy
[2] Nephropathy
[3] Retinopathy
[4] streptozotocin
[5] Amyotrophic lateral sclerosis
[6] Primary lateral sclerosis
[7] Progressive muscular atrophy
[8] Cyclin Dependent Kinase 5
[9] Axon Regeneration

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

ورزش هوازی مزمن همچنین یک درمان موثّر در بهبود عملکرد اعصاب حرکتی می‌باشد [۱۷]، نشان داده شده است که فعالیت ورزشی با شدت متوسط اثرات مثبتی را در بهبود بیماری ALS به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی دارد [۱۸]، همچنین تمرین استقامتی مزمن با افزایش تروفیک فاکتورها منجر به بهبود بازسازی آکسونی و شکل‌پذیری نورونی در نورون‌های حرکتی پس از آسیب این اعصاب در رت‌ها شد [۱۹]. با توجه به مبانی نظری فوق مبنی بر اثر فعالیت ورزشی مزمن بر بهبود عملکرد نورونی و جلوگیری از گسترش شرایط تخریب عصبی و همچنین نقش انکار ناپذیر CDK5 در توسعه شبکه نورونی و همچنین راه‌اندازی مسیرهای رشد و یا مرگ سلولی در شرایط فیزیولوژکی و پاتولوژیکی مختلف، انتظار می‌رود الگوی تمرینی حاضر با کاهش (تعدیل) بیان ژن و فعالیت این کیناز منجر به بهبود شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت گردد و لذا هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی مزمن بر میزان بیان ژن CDK5 در بخش حرکتی سیستم عصبی مرکزی رت‌های با نوروپاتی دیابت می‌باشد.

روش‌ها

در پژوهش حاضر ۲۸ سر رت صحرایی بالغ نر ۱۰ هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۱/۲±۲۷۱/۳ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه گردید و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری گردیدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. جهت القای نروپاتی دیابت پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ ٤٥ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ mol/L، pH:٤/٥) دیابت القاء گردید. به رت‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ٤٨ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست بر روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه (Roche)آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قندخون آنها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۲۰]. لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه از علائم ناشی از تزریق اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب ٨/٤±٣٢٦/٣ گرم، رت‌ها به‌طور تصادفی در چهار گروه هفت‌تایی قرار گرفتند: گروه اول (گروه نوروپاتی تمرین)، گروه دوم (گروه نوروپاتی کنترل)، گروه سوم (گروه سالم کنترل)و گروه چهارم (گروه سالم تمرین).

به‌طور خلاصه، ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. سپس پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت شش هفته انجام شد. در پژوهش حاضر از میانگین شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک [۲۱]، استفاده گردید؛ تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت های ١٦ تا ١٨ عصر برگزار گردید؛ بدین صورت که گروه‌های تمرین در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به‌مدت ٦ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به‌تدریج افزایش یافت (جدول ۱).

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱- برنامه تمرینی پژوهش حاضر[۲۱]

هفته	سرعت	مدت
اول	۱۰متر در دقیقه	۱۰ دقیقه
دوم	۱۰متر در دقیقه	۲۰ دقیقه
سوم	۱۴-۱۵متر در دقیقه	۲۰ دقیقه
چهارم	۱۴-۱۵متر در دقیقه	۳۰ دقیقه
پنجم	۱۷-۱۸متر در دقیقه	۳۰ دقیقه
ششم	۱۷-۱۸متر در دقیقه	۳۰ دقیقه

جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به‌حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند [۲۱]. همچنین، از هیچ‌گونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده نگردید و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی بر روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین می‌گردیدند.

پیش از شروع پروتکل تمرین استقامتی و دو هفته پس از القای دیابت، آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک (آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژزنیای حرارتی) به‌عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت، مطابق پژوهش قراخانلو و همکاران (۱۳۹۲) چاپ شده در همین مجله اجرا شد و پس از اطمینان یافتن از وقوع شرایط نوروپاتی دیابت پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت شش هفته انجام شد [۲۲].

موش‌های صحرایی در هر دو گروه به‌مدت ٦هفته پس از تزریق STZ با ترکیبی از کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌صورت داخل عضلانی) و زایـلازین (۵-۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. بلافاصله پس از بیهوشی، خون موش‌های صحرایی به‌طور مستقیم توسط سرنگ از قلب کشیده شد و پس از مشخص کردن ناحیه Lumbarenlargement نخاع، تحت شرایط استریل سگمنت‌های نخاعی تشکیل دهنده عصب سیاتیک L4-L6, مشخص شد و بخش حرکتی نخاع در آن قسمت با دقت جدا شده، بافت‌های مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند و این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۷۰- °c منجمد و نگهداری گردیدند.

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzolLysisReagent هموژن گردید. به‌منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ٤° C، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در ٤°C، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ٤°C، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNAدر اتانول شستشو و در Lμ20 آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت جذبی ۲٦۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از gμ1 از RNA و باستفاده از Random hexamer primer و آنزیم MmulvReversetranscriptase انجام گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان mRNACDK5 از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primixsyber green II انجام شد (USAAppliedBiosystems,). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lμ20 و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های CDK5 و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

شامل ۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰ به‌مدت ۱ دقیقه (تکرار ٤۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

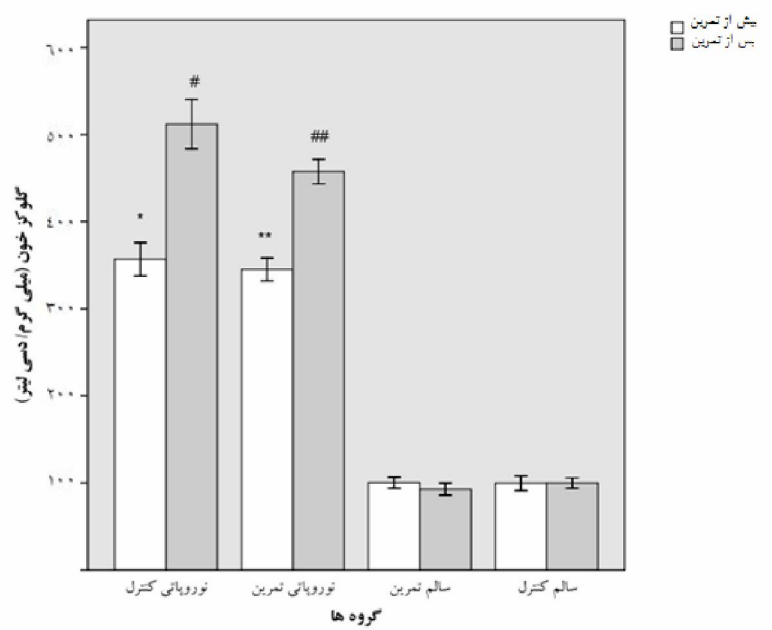
جدول ۲- توالی پرایمرها

Genes	Primer sequence	GenBank code
CDK5	- GGC TTCATGATGTCCTGCATA-3′For: 5 ′- GAC AGA ATC CCA GGC CTT TC -3′Rev: 5′	NM_001100673
GAPDH	′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3′For: 5 ′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT -3′Rev: 5	NM_017008

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف (KS)، استفاده شد. جهت تعیین معناداری تفاوت بین متغییرها و تعامل آنها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS-20 انجام و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ ($P<0.05$)در نظر گرفته شد.

نتایج

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار بالاتر بود (p=۰/۰۰۰۱) و پس از ٦ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی‌دار برخوردار بود (p=۰/۰۰۰۱). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل به‌طور معنی‌دار پایین‌تر بود (p=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۱).



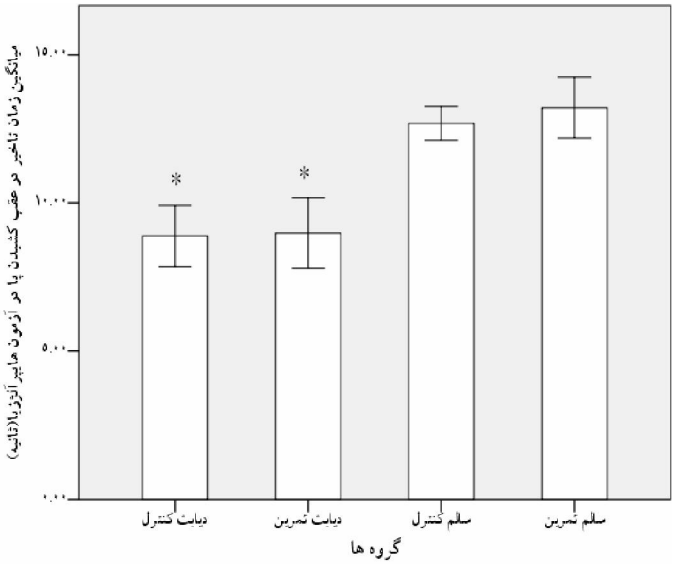
نمودار ۱- تغییرات‌گلوکزپلاسمادرگروه‌های مختلف

*، ** اختلاف معنی‌دار با گروه سالمکنترل (p<۰/۰۱)، # اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی تمرین، سالم تمرین و سالم کنترل ## اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین و سالم کنترل (p<۰/۰۱)

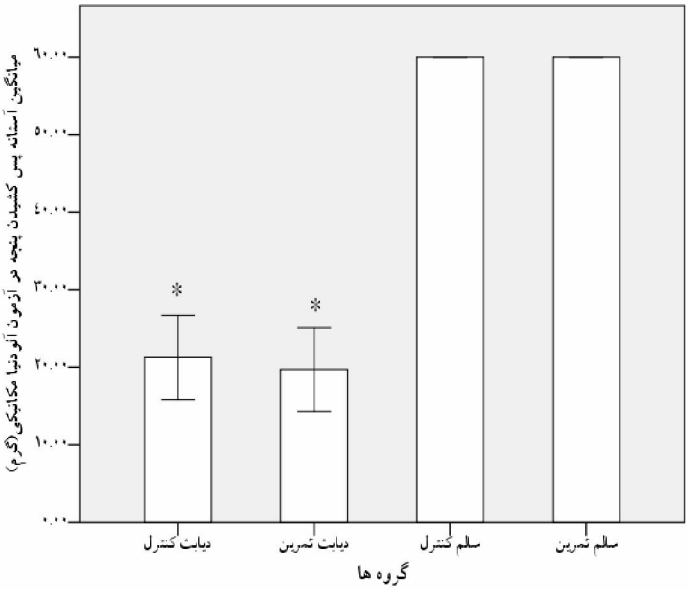
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

میانگین تأخیرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپرآلژزنیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های نوروپاتی(دیابتی) نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معناداری کمتر بود (P=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۲).

همچنین میانگین میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودنیای مکانیکی دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های نوروپاتی(دیابتی) نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معناداری کمتر بود (P=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۳).



نمودار ۲- تغییرات زمان تأخیر در عقب کشیدن پا در آزمون پر دردی حرارتی (هایپزآلژزنیا) قبل از دوره تمرینی در گروه‌های مختلف پژوهش (ثانیه)

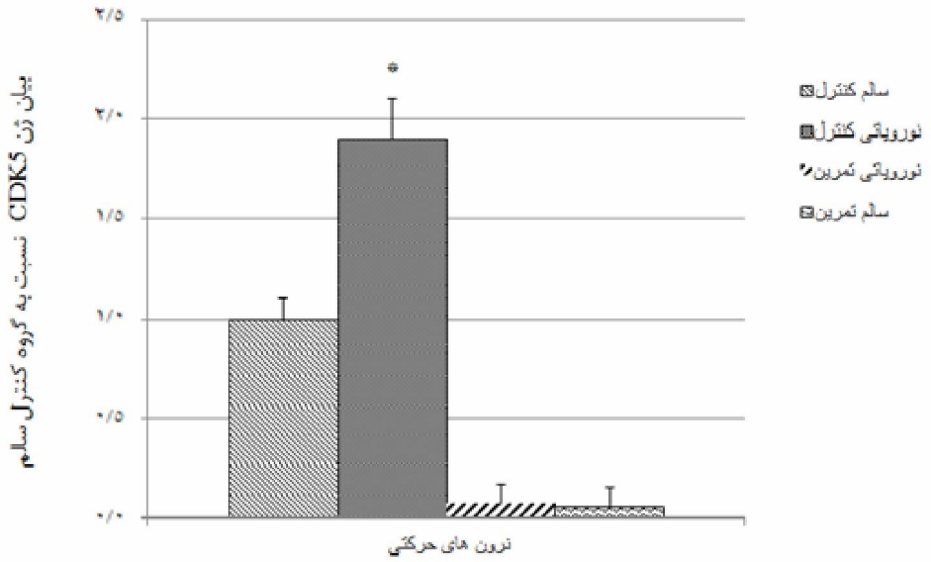


نمودار۳- تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی قبل از دوره تمرینی در گروه‌های مختلف پژوهش (ثانیه).

بیان ژن CDK5 در نورون‌های بخش حرکتی نخاع در گروه نوروپاتی تمرین (P= ۰/۰۱۱)، سالم کنترل (۰/۰۱۶ =P) و سالم تمرین (P= ۰/۰۱۱) به‌طور معناداری نسبت به گروه نوروپاتی کنترل پایین‌تر بود. تفاوت معناداری در سطوح بیان ژن CDK5 بین گروه نوروپاتی تمرین نسبت به سالم کنترل (P= ۰/۸٤) و سالم تمرین (P=۰/۹۹)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

مشاهده نشد. تفارت میزان بیان ژن CDK5 در گروه سالم تمرین نسبت به سالم کنترل با کاهش همراه بود هرچند که به لحاظ آماری با تغییرات معناداری همراه نبود(P= ۰/۸۳). (نمودار شماره٤).



نمودار۴- *؛ تفاوت معنادار بین گروه نوروپاتی کنترل و سایر گروه‌ها (P<۰/۰۵)

بحث و نتیجه گیری

مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت کند [۲۳]، بیان انتقال دهنده‌های گلوکز را افزایش دهد [۲٤] و سرانجام کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به‌همراه داشته باشد [۲۵]. تمرین ورزشی می‌تواند جهت کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن مفید واقع شود. به‌علاوه، نشان داده شده تمرین ورزشی می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد [۲٦]. همسو با نتایج پیشین در پژوهش حاضر نشان داده شد که تمرین استقامتی مزمن منجر به کاهش معنادار سطوح گلوکز پلاسما در رت‌های با نوروپاتی دیابت می‌شود که می‌تواند دلیلی برای وقایع پیش گفته محسوب شود.

تا کنون پژوهشی که بیان ژن CDK5 را در شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین ورزشی بر بیان ژن این کیناز در بخش حرکتی نخاع بررسی کند انجام نشده است، لذا پژوهش حاضر اولین پژوهشی است که به بررسی تغییرات بیان ژن CDK5 در شرایط پاتولوژکی نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین ورزشی بر میزان بیان ژن این کیناز در بخش حرکتی نخاع پرداخته است.

یکی از پیامدهای پاتولوژیکی افزایش بیان CDK5 همان‌طور که اشاره شد افزایش فسفوریلاسیون نوروفیلامان و پروتیئن‌های وابسته به آن در اعصاب می‌باشد [۷] که نتیجه آن برهم خوردن نظم اسکلت سلولی آکسون و جدا شدن موتورپروتیئن‌های انتقال دهنده مواد در طول آکسون از نوروفیلامان‌ها که به نوعی مسیر ارتباطی بین نقاط مختلف آکسون هستند می‌باشد. در واقع بر اثر افزایش فسفوریلاسیون نوروفیلامان‌ها و کاهش نرخ سرعت و میزان انتقال آکسونی می‌باشد که در نهایت منجر به ظهور شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی منجر می‌شود [۲۸، ۱۱]. مطابق انتظار در نورون‌های بخش حرکتی نیز اختلال در انتقال آکسونی مواد و پروتئین‌ها و همچنین نقص در نقل و انتقال مناسب نوروفیلامان‌ها و انباشتگی نوروفیلامان‌ها در آکسون و برهم خوردن ساختار نورون منجر به ظهور شرایط تخریب عصبی در این نورون‌ها می‌شود [۷]. عدم تنظیم فعالیت CDK5 در شرایط پاتولوژیکی نظیر التهاب و

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

دیابت [۸] به چشم می‌خورد. CDK5 در عملکرد دیگر عوامل کلیدی سیستم نورونی مانند سیگنالینگ درد با تنظیم عملکرد مورفین و کارکرد ضروری آن در ایجاد درد و مسیرسیگنالینگ آن در نورون‌های حسی [۲۹]، انتقال آکسونی و عامل جداسازی موتورپروتئین‌ها نظیر کاینزین از نوروفیلامان‌ها با فسفوریلاسیون بیش از حد در شرایط پاتولوژیکی و کاهش نرخ انتقال آکسونی به‌عنوان یک عامل مهم و موثر در رشد و جوانه‌زنی نورونی [۱۱] و همچنین در روند آپوپتوز سلولی با فسفوریـلاسیون گیرنده‌ها در ابتدای مسیرهای سیگنالینگ و جلوگیری از ادامه یافتن این مسیرهای مربوط به رشد و زنده ماندن نورون‌ها مانند مسیر [۳۰MEK] و مسیر [۳۱NGF] نقش اساسی ایفا می‌کند. مطابق انتظار در پژوهش حاضر مشاهده شد که بنا بر مبانی نظری فوق بیان ژن این کیناز در بخش حرکتی نورون‌های نخاع در آزمودنی‌های با نوروپاتی دیابت به‌طور چشم‌گیری افزایش نشان داد و از سوی دیگر با توجه به اثرات مفید تمرین ورزشی بر بیوسنتز [۱۵RNA]، افزایش انتقال آکسونی [۱٦]، و افزایش میزان جوانه‌زنی عصبی به‌دنبال برش عصبی در نورون‌های حرکتی[۹]. تمرین استقامتی مزمن منجر به‌تعدیل (کاهش) بیان ژن CDK5 در بخش حرکتی نخاع گردید که پیامد آن می‌تواند کاهش در توسعه نوروپاتی و بهبود عملکرد و رشد نورونی باشد.

در آزمودنی‌های سالم تمرین استقامتی منجر به کاهش اندک سطوح بیان ژن CDK5 نسبت به گروه سالم کنترل شد هرچند که به لحاظ آماری معنادار نبود ولی نشان از روند کاهشی گویاست. با توجه به اینکه فعالیت CDK5 در برخی مسیرهای سیگنالینگ که در پیش اشاره شد منجر به فسفوریلاسیون برخی گیرنده‌ها و پروتین‌ها و همچنین جلوگیری از ادامه یافتن این مسیرهای مربوط به رشد و زنده ماندن نورون‌ها مانند مسیر [۳۰MEK] و مسیر NGF [۳۱] می‌شود، از طرفی تمرین ورزشی مزمن منجر به سازگاری در نورون‌ها، بهبود عملکرد آکسونی و در نتیجه آن رشد و جوانه زنی و توسعه شبکه نورونی می‌شود [۱۷]. بنابراین به‌نظر می‌رسد به‌منظور رشد و جوانه‌زنی نورونی در پی سازگاری با تمرین کاهش بیان ژن این کیناز می‌تواند منجر به کاهش فعالیت آن در مسیرهای سیگنالینگ نام برده دانست که در نهایت کاهش فسفوریلاسیون سوبستراهای مختلف و پایدار ماندن مسیرهای سیگنالینگ مربوط به رشد و زنده ماندن نورون‌ها می‌شود.

به‌طور کلی، همسو با پژوهش Rahmati و همکارن، (۱۳۹۱) [۳۲] مبنی بر اثر تمرین استقامتی بر بهبود شرایط نوروپاتی در رت‌های به نوروپاتی مبتلا شده توسط القای STZ، در پژوهش حاضر انتظار می‌رود که فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین استقامتی با شدت متوسط، دارای اثرات مفید بر بهبود شرایط نوروپاتیک باشد. هرچند که با توجه به بررسی سطوح بیان ژن CDK5، انتظار می‌رود تغییرات در سطوح پروتینی در نتیجه بیان ژن بیش از حد منجر به سطوح پروتین بالاتر و فعالیت بالاتر این کیناز می‌شود که در نهایت منجر به اثر نهایی از طریق فسفوریلاسیون نوروفیلامان‌ها و گیرنده‌های مختلف شود، هرچند که برای دستیابی به شرایط قطعی‌تر پیشنهاد می‌شود سطوح پروتئین CDK5 نیز اندازه‌گیری شود. از این رو پیشنهاد می‌شود که تمرین ورزشی به شکل استقامتی به‌عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش روند پیش‌رونده تخریب عصبی به‌کار گرفته شود. همچنین پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آینده بر کـارایی انـواع تمرین‌های مختلف ورزشی در بیماران یابتی متمرکز شوند وسایر عناصر و سازو کارهای موثر ومرتبط را مورد بررسی قرار دهند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری گروه آناتومی و علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پژوهش به ما یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

ماخذ

1. Banting FG & Best CH. Panceratic extracts. J.Lab Cin.Med 1990 ;115:254-272.
2. Wattiez AS, Barrière DA, Dupuis A, Courteix C. Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them?. *Diabetes Metab* 2012 ;43:008.
3. Zochodne DW, Ramji N, TothC.Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. *Neuroscientist* 2008 ;14:311-8.
4. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 2007 ; 53:344-54
5. Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 2006 ;97:772-83
6. K Talbot. Motor neurone disease Review. *Postgrad Med* 2002 ;78:513-519
7. Ralph A. Nixon, Aidong Yuan, editors. Cytoskeleton of the nervous system, chapter14. *Advances in neurobiology*; 2011 . P. 296
8. Contreras-Vallejos E, Utreras E, Gonzalez-Billault C. Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cell Signal* 2012 ;24: 44-52
9. Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 2002: 22: 15-27
10. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 2012 ;22:169-175
11. Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 2005 ;118:5411-9
12. Cruz JC, Tsai LH. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 2004 ;10:452-8
13. Alvira D, Tajes M, Verdaguer E, Acuña-Castroviejo D, Folch J, Camins A, Pallas M. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *J Pineal Res* 2006 ;40:251-8
14. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2010 ;15:R12-20
15. Nancy Y. Ip , Li-Huei Tsai. cyclin dependent kinase 5 (CDK5). 1st: Springer Science +Business Media, LLC 2008: .p. 1-23
16. Shirley B. Shelton and Gail V. W. Johnson. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. Journal of Neurochemistry 2004 ;88:1313–1326
17. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, Santos AR. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low intensity aerobic exercise nervecrush on sciatic injury in mice. *Neuroscience* 2011 ;194:337-348
18. Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD. The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J NeurolSci* 2001 ;15:133-7
19. Udina E, Puigdemasa A, Navarro X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. *Muscle Nerve* 2011 ;43:500-9
20. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 2004; 99:55-65
21. Chae, C.H., Jung, S.L., An, S.H., Park, B.Y., Wang, S.W., Cho, I.H., Cho, J.Y., Kim, H.T. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/ extracellular signalregulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009 ;164:1665–1673

۲۲.قراخانلو رضا، فولادوند مریم، احمد همت فر، مسعود رحمتی، تعدیل بیان ژن SYD در نرون‌های حسی رت‌های دارای نروپاتی دیابت متعاقب تمرین استقامتی، *مجله دیابت و لیپید ایران* ۱۳۹۲: دوره ۱۲ (شماره٤) ۲۹۲-۳۰۱

23. Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A.W., Ohno, H.,Nakamoto, H., Goto, S. Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl erivatives in mitochondrial and cytosolic fraction of rat skeletal muscle. Arch. Biochem. *Biophys* 2000 ;383:114–118
24. Osborn BA, Darr JT, Laddaga RA, Romano FD & Paulson DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *Applied Physiology* 1997 ;82:828-834
25. Chen Y-W. Li Y-T. Chen YC. Li Z-Y. Hung C-H. Exercise Training Attenuates Neuropathic Pain and Cytokine Expression After Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve. *Anesth Analg* 2012 ;114:1330–7
26. Bailey C.J., J. P. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Diabete and Metabolisme* (Paris)1986 ;12:212–21
27. Russell ST, R. S, Exp Cell Res. Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemi. *Exp Cell Res* 2009 ;315:16-25
28. Shea TB, Yabe JT, Ortiz D, Pimenta A, Loomis P, Goldman RD, Amin N, Pant HC. Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. *J Cell Sci* 2004 ;29:933-41
29. Pareek TK, Kulkarni AB. Cdk5: a new player in pain signaling. *Cell Cycle* 2006 ;6(6):585-8
30. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ;10:749-5

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

31. Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain BehavImmun* 2007 ;21:642-51
32. Masoud Rahmati, Ali Khazani, Reza Gharakhanlou, MansourehMovaheddin, HomaManaheji.Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. *Physiol Pharmacol* 2013 ;16:435-445.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]

THE EFFECT OF ENDURANCE TRAINING ON GENE EXPRESSION OF CDK5 IN SPINAL MOTOR PART OF MALE WISTAR RATS WITH DIABETIC NEUROPATHY

Mohammad keshavarz[1], Reza Gharakhankou[*1], Mansoureh Movaheddin[2], Leila Baghersad[1], Amir Dakhili[1], Ali khazani[1]

1. *Department of Physical education and sport science, TarbiatModares University Tehran, Iran*
2. *Department of Anatomy, TarbiatModares University, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Increased and decreased CDK5 gene expression regulation, as a protein kinase, is associated with launching death or survival pathways in the nervous system. According to the chronic effects of endurance training on growth Germination, Neuronal function and improvement of pathological conditions of neurodegenerative diseases, the aim of our study was to investigate the effect of 6 Weeks Endurance Training on Gene Expression of Cdk5 in spinal motor part of Male Wistar Rats with Diabetic Neuropathy.
Methods: Twenty eight adult male Wistar rats ten year old in the weight range of 326.3±84gr, were randomly divided into four groups including healthy control (C), healthy training (HT), neuropathic control (N) and neuropathic training (NT). Diabetes was induced with one shut injection of STZ(45mg/Kg) and after confirmation of neuropathic condition with behavior tests, training groups performed 6 weeks endurance training(with moderate intensity and increasing) on the treadmill. CDK5 gene expression in Spinal motor segments forming the sciatic nerve was measured with Real time technique and calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.
Results: After 6 weeks of endurance training, CDK5 gene expression in spinal motor part of (NT) group was significantly lower than the (NC) group, also, in comparison with neuropathy control, training led to significant decrease in blood glucose levels in neuropathic training group.
Conclusion: According to the specific role of CDK5 in neuronal growth or death, our study showed the beneficial effects of Chronic endurance exercise on neural networks leading to reduced gene expression of CDK5 in a pathologic condition.

Keywords: Diabetic neuropathy, Endurance training, CDK5

[*] Tehran , Jalale Ale Ahmad , DaneshgaheTarbiatmodares, Faculty of humanities , Dept. Physical education and sport science, Phone: 00982182884646

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-12]