

تعدیل بیان ژن *Sunday Driver* در عضله نعلی رت‌های دارای نروپاتی دیابت متعاقب تمرین استقامتی

اعظم کرمی پسکوهانی*^۱، مسعود رحمتی^۲، عبدالرضا کاظمی^۳

چکیده

مقدمه: نروپاتی دیابت منجر به آتروفی عضله اسلکتی می‌گردد؛ اما سازوکارهای پیام‌رسانی آتروفی در این بیماری به‌طور کامل مشخص نشده است. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی بیان ژن *Sunday Driver (Syd)* در عضله نعلی رت‌های نروپاتیک دارای نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی بود.

روش‌ها: ۱۲ سر رت صحرائی بالغ نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی در سه گروه چهار تایی شامل دیابتی تمرین کرده، دیابتی تمرین نکرده و کنترل سالم قرار گرفتند. ۲ هفته پس از تزریق STZ (۴۵ mg/Kg)، با اثبات نروپاتی دیابت توسط آزمون‌های آلودینای مکانیکی و هایپرالژزیا حرارتی، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت ۶ هفته اجرا گردید. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها تشریح و عضله نعلی استخراج گردید. بیان ژن *Syd* نیز به روش Real time-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: وزن عضله نعلی در گروه‌های دیابتی کاهش یافت ($p=0/001$)، اگرچه در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده بالاتر بود ($p=0/001$). بیان ژن *Syd* در گروه دیابت تمرین نکرده نسبت به گروه کنترل سالم بالاتر بود ($p=0/001$). همچنین تمرین منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن *Syd* و سطوح گلوکز خون در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده شد (به ترتیب $p=0/001$ و $p=0/0001$).

نتیجه‌گیری: تنظیم افزایشی *mRNASyd* در عضله نعلی رت‌های دیابتی، در توسعه آتروفی عضلانی درگیر بوده و ورزش به‌عنوان یک راهبرد غیر دارویی، می‌تواند آن را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک نماید. بنابراین، پیشنهاد می‌شود *Syd* به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نروپاتی دیابت، تمرین استقامتی، عضله نعلی، *Sunday Driver*.

۱- واحد علوم تحقیقات کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

***نشانی:** کرمان، خیابان گل‌دشت، کوچه ۵۷، جنب مدرسه سما، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات شعبه استان کرمان، تلفن:

آدرس پست الکترونیک: karami-pas@yahoo.com، ۰۹۱۲۴۵۲۵۵۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷

تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۳/۱۱/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۰۹

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ‌ومیر در دنیاست که اختلالات متعددی از جمله نوروپاتی^۱، نفروپاتی^۲، رتینوپاتی^۳، بیماری‌های قلبی-عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را به دنبال دارد [۱]. تغییرات آتروفیک و دژنراسیون سلولی، از مهم‌ترین ضایعات عضلانی ناشی از بیماری دیابت هستند که با کاهش مشخص قطر و طول رشته عضلانی و شکل گیریاوکولها در سارکوپلاسم سلول عضلانی همراه می‌باشند. ایجاد شرایط هایپرگلیسمی در بافت عضلانی، شرایط متابولیکی را فراهم می‌کند که تولید محصولات نهایی گلیکوزیله پیشرفته و افزایش استرس اکسیداتیو را به عنوان مهم‌ترین عوامل درگیر در مرگ سلولیه همراه دارد [۲].

پروتئین *Sunday Driver (Syd)* که به عنوان JIP3 و JSAPI نیز در پستانداران و به عنوان mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 (Mapk8ip3) در رت شناخته شده است، در تنظیم ساختار و عملکرد سلول‌های عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کند. در این میان می‌توان به درگیر بودن SYD در تعدیل سیگنال‌های استرس، ساختار مخروط رشد نرون‌ها، جوانه زدن، نوزایش و انتقال آکسونی اشاره کرد [۳-۷]. همچنین SYD، توسط تنظیم جنبش‌پذیری موتور پروتئین‌های کابزین و دابنئین، در انتقال آکسونی نقش دارد و انتقال آکسونی و زیکولی را به پیام‌رسانی آسیب مرتبط می‌کند [۸]. مطالعات انجام شده بر روی بسیاری از بیماری‌های تخریب عصبی نظیر آلزایمر [۹-۱۱]، هانتینگتون [۹، ۱۲] و پارکینسون [۹، ۱۰]، نقصان سلول‌های عصبی را به SYD نسبت داده‌اند. اگرچه مطالعات بسیاری بر نقش SYD در سلول‌های عصبی متمرکز شده‌اند، اما نقش‌های آن در عضله اسکلتی به‌خوبی مطالعه نشده است. پژوهش‌های انجام شده بر روی *Drosophila melanogaster* حاکی از نقش بالقوه SYD در مکان‌یابی هسته سلول عضلانی در یک فرآیند وابسته به میکروتوبول و وابسته به موتور پروتئین‌های کابزین و دابنئین است [۱۳]. این در حالی است که عضله اسکلتی،

بافتی متشکل از سلول‌های چند هسته‌ای است و استقرار نادرست هسته‌های عضلانی، به‌عنوان اصلی‌ترین عامل تشخیص بیماری‌های عضلانی معرفی شده است [۱۴]. از سوی دیگر، تمرین استقامتی به‌عنوان یک راهبرد غیر دارویی در بهبود عملکرد و ساختار عضله اسکلتی در شرایط نروپاتی دیابت مورد استفاده قرار گرفته است. افزایش مصرف گلوکز، افزایش انتقال دهنده‌های گلوکز، افزایش حساسیت انسولینی بافت عضلانی، از جمله مهم‌ترین فواید مطلوب ناشی از فعالیت بدنی برای بیماران دیابتی به‌شمار می‌روند [۱۵]. به‌علاوه، فعالیت ورزشی، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مداخلات درگیر در تنظیم استقرار هسته‌های عضلانی معرفی شده است. بر اساس اطلاعات موجود، تا کنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی اختلالات احتمالی *Syd* در عضله اسکلتی دارای نروپاتی دیابت و اثر ورزش استقامتی بر آن پرداخته است. لذا در پژوهش حاضر به بررسی بیان ژن *Syd* در عضله نعلی رت‌های نر و بیستار دارای نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی پرداخته می‌شود.

روش‌ها

در پژوهش حاضر از ۱۲ سر رت صحرايي بالغ نر ۱۰ هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی $250/3 \pm 15/4$ گرم استفاده شد. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 3 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 لرستان مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، رت‌ها به‌طور تصادفی در سه گروه چهارتایی قرار گرفتند: گروه دیابت تمرین کرده، گروه دیابت تمرین نکرده و گروه کنترل سالم. ۲ هفته پس از القا دیابت، آزمایشات رفتاری درد نروپاتیکی به‌عنوان شاخص عملکرد نرون‌های حسی و حرکتی [۱۶] اجرا گردید و پس از اطمینان یافتن از حصول نروپاتی حسی و حرکتی در رت‌ها [۱۷، ۱۸]، پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت ۶ هفته انجام شد [۱۹]. ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته

¹ Neuropathy

² Nephropathy

³ Retinopathy

نحوه اندازه گیری هایپراآلزیای حرارتی

هایپراآلزیای حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران (۱۹۸۸) مورد سنجش قرار گرفت [۲۳]. به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Basil, Italy) حیوانات در محفظه مخصوص قرار می گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، بخش میانی کف پای حیوان در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار می گرفت و تایمر فعال می شد. سپس با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف می گردید و Paw Withdrawal Latency (PWL) ثبت می شد. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش می شد و میانگین آن‌ها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت می گردید. همچنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به طور کلی، سنجش هایپراآلزیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد.

پروتکل تمرین

در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک [۲۱]، استفاده گردید؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفت. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۷-۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند [۱۹].

استخراج و وزن کشی عضله نعلی

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی (۹۰ mg/kg) کتامین و (۱۰ mg/kg) زایلازین بیهوش و عضله نعلی در سمت چپ استخراج شد و پس از وزن کشی بلافاصله در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و

به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. همچنین، به منظور سازگاری جهت آزمایشات رفتاری نیز حیوانات به مدت ۳ روز در معرض آزمایشات رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار می گرفتند. بدین صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می گرفتند [۲۰].

القاء دیابت

به منظور القاء دیابت، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO) ۴۵ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه (۰/۵ mol/L، pH: ۴/۵) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. به رت‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسست بر روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت ریشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۱۶].

نحوه اندازه گیری آلودینیای مکانیکی

به منظور اندازه گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار می گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار می گرفتند. سپس از تارهای Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stolling، USA استفاده شد. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می گردید، همان وزنه به عنوان Paw Withdrawal Threshold (PWT) محسوب می شد. همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شد و میانگین آن‌ها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید [۲۱، ۲۲]. به طور کلی، سنجش آلودینا مکانیکی، قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد.

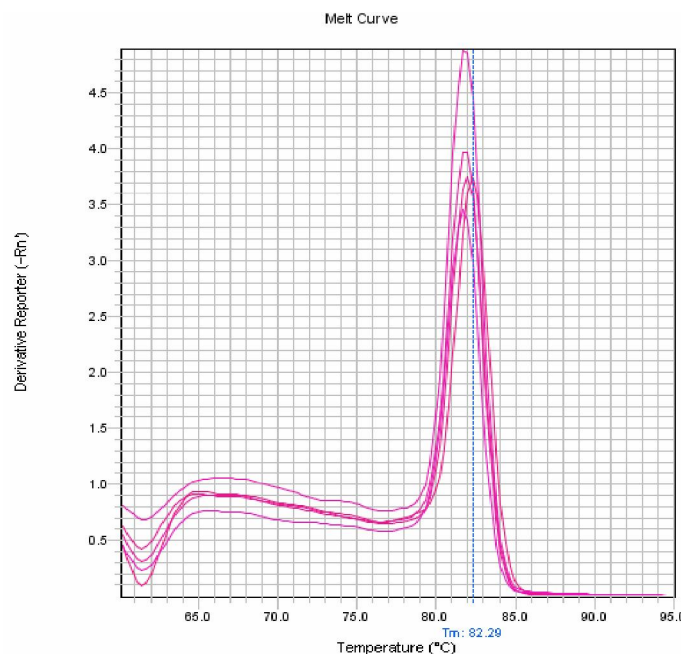
Real time – PCR

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان *mRNASyd* از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primixsyber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $20\mu\text{L}$ (شامل $1\mu\text{L}$ میکرولیتر cDNA، $1\mu\text{L}$ میکرولیتر آغازگر جلویی (Forward Primer)، $1\mu\text{L}$ میکرولیتر آغازگر برگشتی (Reverse Primer)، $7\mu\text{L}$ آب Depc (Diethylpyrocarbonate) و $10\mu\text{L}$ میکرولیتر syber green) و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های *Syd* و *Gapdh* در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) و با استفاده از نرم افزار Oligo 7 طراحی شد (جدول ۱). همچنین، نمودار ذوب (شکل ۱ و ۲) جهت بررسی صحت داده‌ها رسم گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: 95°C به مدت 10 دقیقه - 95°C به مدت 15 ثانیه، 60°C به مدت 1 دقیقه (تکرار 40 سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ اندازه‌گیری شد [۲۵].

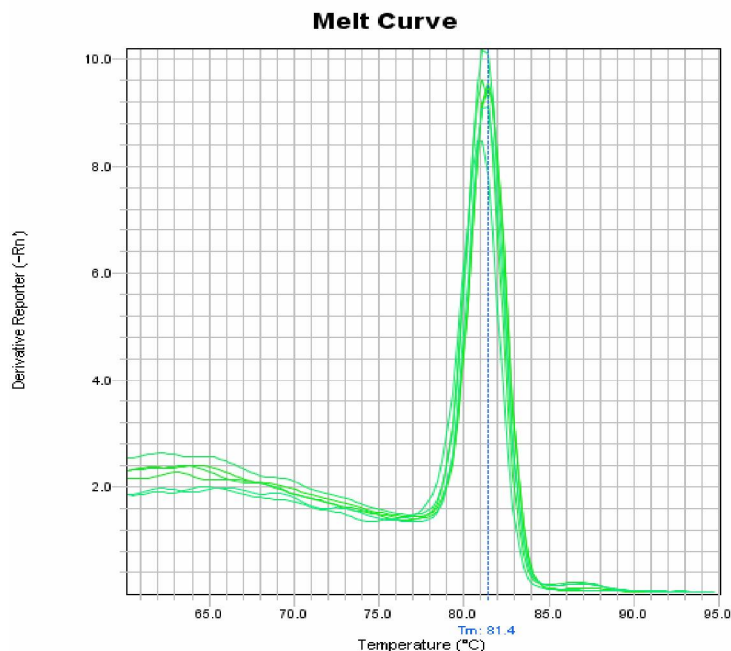
تحلیل بعدی نگهداری شدند. همچنین، پس از جداسازی کامل عضلات و بافت‌های پیوندی از استخوان درشت نی، طول بیشینه استخوان درشت نی توسط کولیس اندازه‌گیری می‌شد. سپس به منظور نرمال‌سازی داده، توده عضلانی نسبت به طول درشت نی محاسبه می‌شد [۲۴].

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود 50 میلی‌گرم بافت عضله نعلی به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت 1 به 10 در QIAzol® Lysis Reagent به روش هاون کوبی همگن گردید. همچنین، غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Spectrophotometer, Eppendorff, Germany) و نسبت 260 به 280 بین $1/8$ تا 2 به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. به علاوه، سنتز cDNA با استفاده از $1\mu\text{g}$ از RNA و استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmuv Reversetranscriptase (کیازن، آلمان) انجام گرفت.



شکل ۱- نمودار منحنی دمای ذوب ژن *Gapdh*. وجود انحنا در این نمودار نشان دهنده یک دمای ذوب منحصر است که عدم وجود آلودگی و عملکرد اختصاصی پرایمرها را نشان می‌دهد.



شکل ۲- نمودار منحنی دمای ذوب ژن *Syd* وجود انحنای در این نمودار نشان دهنده یک دمای ذوب منحصر است که عدم وجود آلودگی و عملکرد اختصاصی پرایمرها را نشان می‌دهد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence	GenBank code
<i>Syd</i>	For: 5'-CCAGCTACCAGTGTCCAAACGAT-3' Rev: 5'-CTTTGTGACACTGCCATAGTCCC-3'	NM_001100673
<i>Gapdh</i>	For: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3' Rev: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	NM_017008

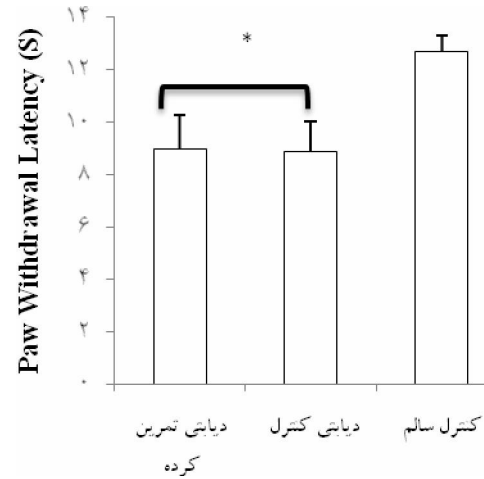
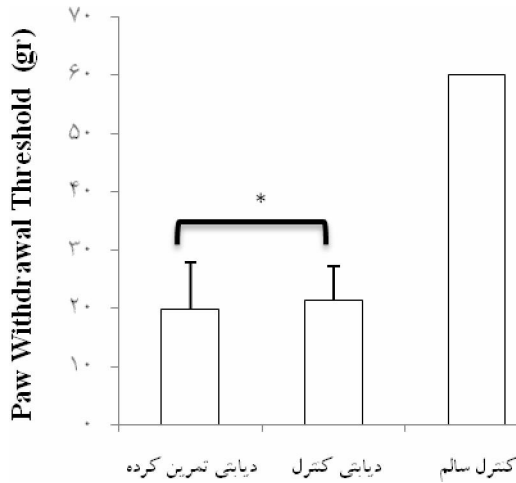
تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای مورد مطالعه از تحلیل واریانس دو طرفه استفاده شد. جهت انجام آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر توکی به عمل آمد. سطح معنی‌دار نیز $\alpha = 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS/Win نسخه ۱۹ انجام گرفت.

یافته‌ها

تمام رت‌ها در گروه تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین استقامتی را به‌طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین×دیابت) حاکی از اثر معنی‌دار تمرین بر

بیان ژن *Syd* ($F=10.41$, $p=0.003$) و اثر تعاملی بین دو متغیر فوق بود. ($F=11.79$, $p=0.006$) میانگین تغییرات زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپراآلژیای حرارتی دو هفته پس از القا دیابت در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار کم‌تر بود ($p=0.0001$) (نمودار ۱). همچنین، در همان زمان، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودینیا مکانیکی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار کم‌تر بود ($p=0.0001$) (نمودار ۲).



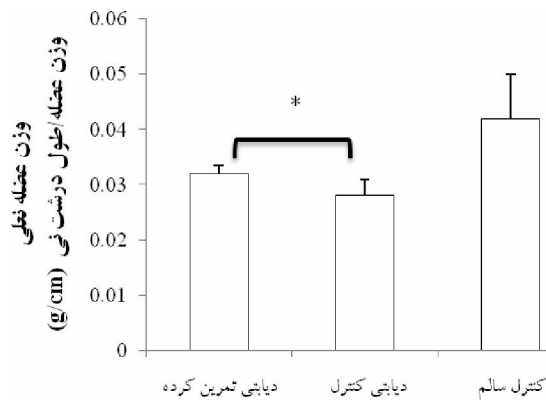
نمودار ۲- تغییرات زمان تاخیر در عقب کشیدن پا در آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه‌های مختلف.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($p < 0.01$).

نمودار ۱- تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلژی‌زای حرارتی در گروه‌های مختلف.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($p < 0.01$).

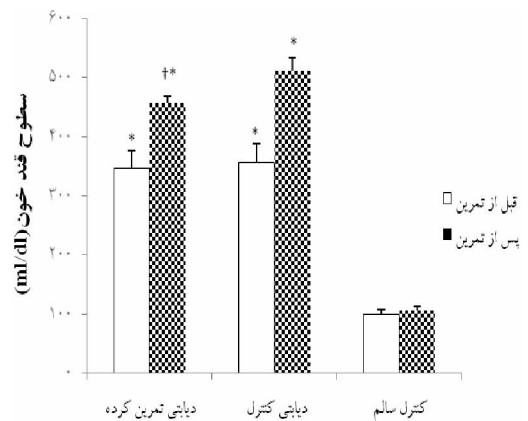
تمرین نکرده به‌طور معنی‌دار کم‌تر بود ($p = 0.04$). همچنین، وزن عضله نعلی در گروه‌های دیابتی کاهش یافت ($p = 0.01$), اگرچه در گروه DT نسبت به گروه DC بالاتر بود ($p = 0.01$) (نمودار ۴).

پس از ۶ هفته تمرین استقامتی، میانگین بیان ژن *Syd* در گروه DC نسبت به گروه C به‌طور معنی‌دار بالاتر بود ($p = 0.01$). بیان ژن *Syd* در گروه DT نسبت به گروه DC نیز به‌طور معنی‌دار کم‌تر بود ($p = 0.01$). همچنین، بین بیان ژن *Syd* در گروه DT نسبت به گروه C نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p = 0.08$) (نمودار ۵).

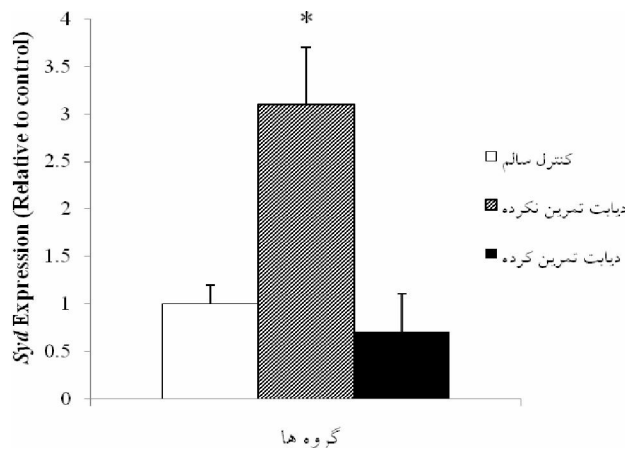
در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم به‌طور معنی‌دار بالاتر بود ($p = 0.001$) و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی‌دار برخوردار بود ($p = 0.001$). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به‌طور معنی‌دار پایین‌تر بود ($p = 0.001$) (نمودار ۳). وزن اولیه گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند ($p = 0.07$). اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه تمرین و کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم به‌طور معنی‌دار کم‌تر بود (به‌ترتیب $p = 0.001$ و $p = 0.01$). همچنین، میانگین وزن گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت



نمودار ۴- تغییرات وزن عضله نعلی در گروه‌های مختلف.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($p < 0.01$).



نمودار ۳- تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف.
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($p < 0.01$),
† اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت تمرین نکرده ($p < 0.01$).



نمودار ۵- میزان بیان ژن *Syd* در عضله نعلی گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($p < 0.01$).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیماری دیابت منجر به افزایش *mRNA* *Syd* در عضله نعلی رت‌های دیابتی می‌شود. تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی بیان ژن *Syd* در بیماری دیابت و حتی دیگر بیماری‌های عضلانی و تخریب عصبی پرداخته است. اگر چه، مطالعات بسیاری به بررسی *Syd/JIP3* در دیگر بیماری‌های تخریب عصبی و در سطح سلول‌های عصبی پرداخته‌اند. برای مثال، Perrin و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فعال‌سازی JNK در بیماری هانتینگتون (HD) درگیر بوده و مسدود کردن این مسیر بهبود بسیاری از اختلالات عصبی را در این بیماری به همراه داشته است [۲۶]. Stokin و همکاران (۲۰۰۶) نیز ثابت کردند فعال‌سازی *Syd/JIP3* ممکن است در تنظیم انتقال و فسفریلاسیون پروتئین پیشرو آمیلوئید (APP) در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۲۷]. چنانچه Pan و همکاران (۲۰۱۲) هم نشان دادند که فعال‌سازی JNK در بیماری پارکینسون نیز درگیر بوده و مهار انتخابی فعال‌سازی مسیر میتوکندریایی خانواده JNK جهت درمان این بیماری موثر است [۱۰].

در طول دیابت، اجزاء متعددی از بافت عضله اسکلتی دچار اختلال می‌گردند. در این میان می‌توان به تغییرات ساختاری اتصال عصبی-عضلانی (NMJ) [۲۸]، کاهش شمار وزیکول‌های حاوی استیل کولین، کاهش نوزایش میتوکندری در پایانه‌های عصب حرکتی [۳] اشاره کرد. در این رابطه، Garcia و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تأثیر دیابت نوع یک بر عملکرد اجزاء پیش و پس سیناپسی NMJ موش‌های دیابتی شده توسط

STZ پرداختند. نتایج آنان نشان داد در حالی که عملکرد حرکتی موش‌ها نرمال بوده است، اما پاسخ تنش تکانه عضله EDL ایزوله شده به تحریک عصبی، پس از ۴ هفته از آغاز هایپرگلیسمی القا شده توسط STZ، به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد. همچنین نشان دادند که این تغییرات مکانیکی، با دامنه افزایش یافته و دوره طولانی‌تر جریان‌های میناتوری صفحه انتهایی (mEPCs)^۱ همراه بوده است. به‌علاوه، نتایج آنان نشان داد که طولانی‌تر شدن mEPCها ناشی از بیان عضلانی کاهش یافته استیل کولین استراز بوده است. این محققین نتیجه‌گیری کردند که افزایش پهنای جریان‌های میناتوری صفحه انتهایی و کاهش زمان تند انقباضی عضله EDL در موش‌های دیابتی شده توسط STZ، اساساً ناشی از کاهش بیان و فعالیت استیل کولین استراز در صفحه انتهایی بوده است [۲۹]. این تحقیق نشان می‌دهد که تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی القا شده توسط دیابت در بافت عضله اسکلتی، منجر به آغاز توالی تغییرات پاتوفیزیولوژیکی در صفحه انتهایی عضله می‌شود که می‌تواند به ضعف عضلانی بیانجامد.

از سوی دیگر، یکی از نقش‌های اساسی *Syd* در بافت عضلانی، مکان‌یابی هسته سلول عضلانی است [۱۳]. همچنین، نشان داده شده عضله اسکلتی بافتی متشکل از سلول‌های چند هسته‌ای است که استقرار نادرست هسته‌های عضلانی، اختلالات عضلانی را به دنبال دارد [۱۴]. این در حالی است که تنها مطالعه انجام شده در ارتباط با نقش *Syd* در بافت عضلانی بر روی *Drosophila melanogaster* حاکی از این است که استقرار

^۱ miniature end-plate current

هسته سلول عضلانی، به‌عنوان یک فرآیند وابسته به میکروتوبول، به موتورپروتئین‌های کاینزین و داینین متکی بوده است. این محققین به‌منظور شناسایی چگونگی مستقر ساختن هسته‌های عضلانی توسط موتورپروتئین‌های انتقال آکسونی، به بررسی تنظیم‌کننده‌های این موتورپروتئین‌ها پرداختند و نتایج آن‌ها نشان داد که سازشگر انتقال آکسونی *Syd* در بافت عضلانی بیان می‌شود و اختلال در آن منجر به استقرار نادرست هسته عضلانی می‌گردد. به‌طور کلی، این محققین نتیجه‌گیری کردند اختلالات *Syd* در بافت عضلانی منجر به ناتوانی داینین در انتقال درست محموله آن، به‌ویژه هسته عضلانی می‌گردد [۱۳]. بنابراین، در پژوهش حاضر این احتمال می‌رود که سطوح افزایش یافته *mRNASyd* در عضله نعلی رت‌های دیابتی، منجر به مکان‌یابی نادرست هسته عضلانی در چنین شرایط پاتولوژیکی گردد. از طرف دیگر، با توجه به تعدیل *mRNASyd* در عضله نعلی رت‌های دیابتی تمرین کرده، این امکان نیز وجود دارد که تمرین منجر به مکان‌یابی صحیح هسته‌های عضلانی شده است.

همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین استقامتی موجب کاهش بیان ژن *Syd* در عضله نعلی رت‌های دیابتی می‌گردد. مطالعات بسیاری نیز نشان داده‌اند تمرین استقامتی موجب بهبود عملکرد و ساختار عضله اسکلتی در شرایط نروپاتی دیابت می‌گردد. برای مثال نشان داده شده فعالیت بدنی منجر به افزایش مصرف گلوکز و افزایش انتقال دهنده‌های گلوکز در بافت عضلانی می‌گردد. به‌علاوه، نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد [۱۵]. بهبود عملکرد عضله اسکلتی، به افزایش وابسته به ورزش بیان *mRNA* و سطوح پروتئین NT-3 در عضله اسکلتی نیز نسبت داده شده است [۲۰]. این مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق تنظیم سوخت و ساز گلوکز و افزایش عوامل نروتروفیک، به بهبود ساختار و عملکرد عضله اسکلتی در شرایط دیابت بیانجامد. این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد تمرین ورزشی با شدت متوسط موجب کاهش معنی‌دار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت منجر به آتروفی عضله اسکلتی

می‌گردد و تمرین ورزشی قادر است این روند را معکوس سازد، به گونه‌ای که وزن عضله نعلی در رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت و تمرین ورزشی منجر به افزایش وزن عضله نعلی در رت‌های دیابتی تمرین کرده گردید. لذا در پژوهش حاضر، این احتمال می‌رود که ورزش از طریق اثراتی که بر کاهش غلظت گلوکز خون داشته است موجب توقف و یا تضعیف فرآیند آتروفی در عضله نعلی رت‌های دیابتی تمرین کرده گردیده است. اگر چه این امر در تحقیق حاضر مستقیماً مورد بررسی قرار نگرفت ولی این نتیجه همسو با تحقیقاتی است که هایپرگلیسمی القا شده توسط STZ را در توسعه آتروفی عضلانی ناشی از نروپاتی دیابت سهیم دانسته‌اند و نشان داده‌اند که درمان انسولین می‌تواند به بهبود عملکرد عضلانی بیانجامد [۳۲-۳۰].

به‌طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که احتمالاً در عضله نعلی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی *mRNASyd* در توسعه آتروفی عضلانی درگیر بوده و تمرین استقامتی می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد غیر دارویی، این افزایش را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند. همچنین، مطالعه حاضر فراهم آورنده شواهد غیرمستقیم بر استقرار نادرست هسته‌های سلول عضلانی در شرایط نروپاتی دیابت است و از طرف دیگر نشان دهنده احتمال تنظیم استقرار صحیح هسته‌های عضلانی توسط فعالیت ورزشی می‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود *Syd* به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه واقع شود؛ هر چند که نکات متعددی در این ارتباط وجود دارند و در آینده باید مورد مطالعه قرار بگیرند.

سپاسگزارای

از سرکار خانم دکتر زهره مظاهری (استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس) به جهت راهنمایی‌های ارزنده جهت انجام آزمایشات مولکولی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

مآخذ

1. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120(1):1-34.
2. Frier BC, Noble EG, & Locke M. Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF- κ B activation and expression. *Cell Stress and Chaperones* 2008; 13(3): 287-296.
3. Centeno C, Repici M, Chatton JY, Riederer BM, Bonny C, Nicod P, Price M, Clarke PG, Papa S, Franzoso G, Borsello T. Role of the JNK pathway in NMDA-mediated excitotoxicity of cortical neurons. *Cell Death Differ* 2007; 14, 240-253.
4. Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P, Davis RJ. Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 2001; 15, 2421-2432.
5. Dajas-Bailador F, Jones EV, Whitmarsh AJ. The JIP1 scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons. *Curr Biol* 2008; 18, 221-226.
6. Koushika SP. "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays* 2008; 30, 10-14.
7. Anguelova E, Boularand S, Nowicki JP, Benavides J, Smirnova T. Up-regulation of genes involved in cellular stress and apoptosis in a rat model of hippocampal degeneration. *J Neurosci Res* 2000; 59, 209-217.
8. Abe N, Almenar-Queralt A, Lillo C, Shen Z, Lozach J, Briggs SP, Williams DS, Goldstein LS, Cavalli V. Sunday driver interacts with two distinct classes of axonal organelles. *J Biol Chem* 2009; 284, 34628-34639.
9. Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Beas-Zarate C, Pallàs M, Auladell C and et al. Role of JNK in neurodegenerative diseases. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II* 2012; 37 (2): 15-28.
10. Pan J, Li H, Ma J-F, Tan Y-Y, Xiao Q, Ding J-Q, et al. Curcumin inhibition of JNKs prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease through suppressing mitochondria dysfunction. *Transl Neurodegener* 2012; 1 (1): 16.
11. Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Alzheimer Dis* 2011; 24, 633-642.
12. Junyent F, de Lemos L, Verdaguer E, Pallàs M, Folch J, Beas-Zarate C, Camins A, Auladell C. Lack of Jun-N-terminal kinase 3 (JNK3) does not protect against neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38(4): 311-21.
13. Schulman VK, Folker ES, Baylies MK. Sunday Driver (Syd/JIP3) and JNK Signaling are Required for Myogenesis and Muscle Function. 55th Annual Drosophila Research Conference, 2014; San Diego, California, USA.
14. Folker ES, & Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Frontiers in physiology* 2013; 4.
15. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and Type 2 Diabetes The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes care* 2010; 33(12), 2692-2696.
16. Calcutt N, Freshwater J, O'Brien J. Protection of sensory function and antihyperalgesic properties of prosaposin-derived peptide in diabetic rats. *Anesthesiology* 2000; 93: 1271-1278.
17. Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2009 57(4): 456-62.
18. Beyreuther B, Callizot N, Stohr T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 2006, 539:64-70.
19. Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009; 164, 1665-1673.
20. Sharma NK, Ryals JM, Gajewski BJ, Wright DE. Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain. *PHYS THER* 2010; 90: 714-725.
21. Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996; 68: 293-299.
22. Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rat with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 1994; 57: 375-382.
23. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32:77-88.
24. Farrell PA, Fedele MJ, Hernandez J, Fluckey JD, Miller JL, Lang CH, et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *Journal of Applied Physiology* 1999; 87(3), 1075-1082.
25. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 2001; 29: e45-e45

26. Perrin V, Dufour N, Raoul C, Hassig R, Brouillet E, et al. Implication of the JNK pathway in a rat model of Huntington's disease. *ExpNeurol* 2009; 215: 191–200.
27. Stokin GB, Goldstein LS. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:607– 627.
28. Tapon N, Nagata K, Lamarche N, Hall A. A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *EMBO J* 1998; 17, 1395-1404.
29. Rahmati M, Khazani A, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Manaheji H. Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. *PhysiolPharmacol* 2013; 16(4):435-445.
30. Lee JH, McCarty R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. *Physiol-Behav* 1990; 47: 225-230.
31. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain* 1992; 50: 231- 236.
32. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *ProgNeurobiol* 1999; 57: 1-164.

MODULATION OF *SUNDAYDRIVER* GENE EXPRESSION IN SOLEUS MUSCLE OF RATS WITH DIABETIC NEUROPATHY FOLLOWING ENDURANCE TRAINING

Azam Karami Paskohani^{*1}, Masoud Rahmati², Abdolreza Kazemi³

1. Department Physical education and sport science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
2. Department Physical education and sport science, Lorestan University, Khoramabad, Iran
3. Department Physical education and sport science, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

ABSTRACT

Background: Diabetic neuropathy leads to skeletal muscle atrophy; however atrophy signaling mechanisms are not well documented. The aim of the present study was to investigate *Sunday Driver* (*Syd*) gene expression in soleus muscle of Wistar male rats with diabetic neuropathy.

Methods: Twelve male Wistar rats were randomly assigned in 3 groups: diabetic trained, diabetic untrained and healthy control. Two weeks after STZ injection (45 mg/Kg), diabetic neuropathy was demonstrated with mechanical allodynia and thermal hyperalgesia tests and after which moderate endurance training protocol was performed for 6 weeks. 48 hours after final training session, the rats were dissected and soleus muscle tissues were removed. Also *Syd* gene expression was measured with Real time-PCR methods.

Results: Soleus muscle weight was decreased in diabetic groups ($P=0.001$), but compared with diabetic untrained group, was higher in diabetic trained group ($P=0.001$). *Syd* gene expression in diabetic untrained group was higher than healthy control group ($P=0.001$). Also, compared with diabetic untrained group, training significantly decreased *Syd* gene expression and blood glucose levels in diabetic trained group. ($P=0.001$ and $P=0.0001$, respectively).

Conclusion: In soleus muscle of diabetic rats, *Sydm RNA* up-regulation is involved in development of muscle atrophy and training as a non-pharmacotherapy strategy can modulate and get it close to normal levels. So, it is suggested that *Syd* should be noted as a novel treatment in diabetes disease.

Keywords: Diabetic neuropathy, Endurance training, Soleus muscle, *Sunday Driver*

*Kerman, Golgasht street, Number 57, Next to Sama school, Islamic Azad University of Kerman, Tel: 09124525538, Email:karami-pas@yahoo.com