

تعدیل بیان ژن SYD در نرون‌های حسی رت‌های دارای نروپاتی دیابت متعاقب تمرین استقامتی

مریم فولادوند^۱، رضا قراخانلو^{۲*}، احمد همت‌فر^۳، مسعود رحمتی^۲

چکیده

مقدمه: نروپاتی دیابت منجر به اختلالات نرون‌های حسی می‌گردد؛ اما سازوکارهای پیام‌رسانی آسیب در این بیماری به طور کامل مشخص نشده است. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی بیان ژن SYD در نرون‌های حسی ریشه‌های نخاعی عصب سیاتیک رت‌های نروپاتیک و بیستار دارای نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی بود.

روش‌ها: ۱۲ سر رت صحرائی بالغ نر نژاد بیستار به طور تصادفی در سه گروه چهار تایی: دیابتی تمرین کرده، دیابتی تمرین نکرده و کنترل سالم قرار گرفتند. جهت القا دیابت، از روش تزریق درون صفاقی محلول STZ (۴۵ mg/Kg) استفاده گردید. دو هفته پس از تزریق STZ، با اثبات نروپاتی دیابت توسط آزمون‌های آلودینای مکانیکی و هایپرالژیا حرارتی، پروتکل تمرین استقامتی با شدت ۵۵-۵۰ درصد Vo2max، به مدت ۶ هفته اجرا گردید. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها تشریح و نرون‌های حسی L4-L6 بافت نخاع استخراج گردید. بیان ژن SYD نیز به روش Real time-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: سطوح گلوکز خون در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده کاهش معنی‌داری داشت. 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 در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده شد (به ترتیب $P=0/001$ و $P=0/0001$).

نتیجه‌گیری: در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی mRNASYD در پیام‌رسانی آسیب نرونی درگیر بوده و ورزش به عنوان یک راهبرد غیر دارویی، می‌تواند آن را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک نماید. بنابراین، پیشنهاد می‌شود SYD به عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نروپاتی دیابت، تمرین استقامتی، بیان ژن، SYD

۱- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

* **نشانی:** تهران، خیابان جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۶۶۶، نمابر: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۶۶۶

پست الکترونیک: ghara_re@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۲۵

تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۲/۰۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۱۹

مقدمه

نروپاتی ایجاد شده توسط بیماری دیابت، توزیع آناتومیکی، دوره‌های درمانی، و احتمالاً سازوکارهای سبب‌شناسی مختلفی را در بر می‌گیرد. هر یک از این موارد به وسیله آسیب متمرکز یا پراکنده به تارهای عصبی خودمختار یا سوماتیک محیطی ویژگی می‌یابند که ناشی از دیابت می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند اختلالات پروتئین کینازهای عصبی، از اصلی‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در توسعه نروپاتی ناشی از بیماری دیابت است [۱].

از سوی دیگر، پروتئین کینازهای c-Jun N-terminal (JNK)، یکی از سه خانواده پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوز^۱ (MAPK) می‌باشند که ایزوفرم‌های مختلف آن توسط پیرایش متنوع سه ژن JNK1، JNK2 و JNK3 شکل می‌گیرند [۲]. JNK1 و JNK2 به طور گسترده در همه بافت‌ها بیان می‌گردند؛ در حالی که JNK3 به صورت انتخابی در مغز، قلب و بیضه‌ها بیان می‌گردد [۳]. پروتئین‌های ساختمانی JNK شامل: پروتئین‌های تعامل کننده با JNK^۲ (JIP) [۴]، IKAP^۳، بتا آرستین-۲، POSH^۴ [۵-۷] و فیلامین می‌باشند. در این میان، خانواده JIP در تعدیل سیگنال‌های استرس، مخروط‌های رشد نرون‌ها، جوانه زدن، نوزایش و انتقال آکسونی شرکت می‌کنند [۸-۱۲]. پروتئین SYD^۵ که به عنوان JIP3 و JSAP1^۶ نیز در پستانداران شناخته شده است، انتقال آکسونی و زیکولی را به پیام‌رسانی آسیب مرتبط می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که اندوزوم‌های مرتبط با SYD در حمل پیام‌های آسیب از مکان آسیب به سمت جسم سلولی نقش دارند [۱۳]. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند پروتئین SYD توسط تنظیم جنبش پذیری موتور پروتئین‌های کاینزین و داینین، در انتقال آکسونی نقش دارد [۱۳]. مطالعات انجام شده بر روی دیگر بیماری‌های تخریب عصبی نظیر آلزایمر [۱۶-۱۴]، هانتینگتون [۱۷، ۱۴] و

پارکینسون [۱۵، ۱۴]، نقصان‌های عصبی را به SYD نسبت داده‌اند.

از سوی دیگر، فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی منظم می‌تواند شکل‌پذیری مغز [۱۸]، سیستم ضد اکسایشی [۱۹] و تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها را ارتقا بخشد [۲۰] و از آپوپتوز سلول‌های عصبی نیز جلوگیری کند [۲۱]. ورزش همچنین می‌تواند بیوستز RNA [۲۲]، افزایش انتقال آکسونی [۲۳]، و افزایش میزان جوانه‌زنی عصبی به دنبال برش عصبی را به همراه داشته باشد [۱۸].

با توجه به درگیر بودن SYD/JIP3 در بسیاری از اختلالات ناشی از برخی بیماری‌های تخریب عصبی [۱۷-۱۴]، لذا این احتمال می‌رود که در نقصان‌های حسی ناشی از بیماری نروپاتی دیابت نیز نقش داشته باشد و از سوی دیگر، ممکن است ورزش به عنوان یک راهبرد غیر دارویی نیز اثرات سودمندی را بر این پروتئین کیناز به همراه داشته باشد. براساس اطلاعات موجود، تاکنون هیچ مطالعه‌ای نیز به بررسی اختلالات احتمالی SYD در نروپاتی دیابت و اثر ورزش استقامتی بر آن نپرداخته است. لذا با توجه به اینکه در نروپاتی دیابت، بخش اعظم اختلالات مشاهده شده ناشی از نقصان در نرون‌های حسی است [۲۴]، و این نقصان‌ها در مدل نروپاتی دیابت القا شده توسط تزریق سیستمی استرپتوزوسین STZ نیز مشاهده شده است [۲۵]؛ در پژوهش حاضر به بررسی بیان ژن SYD در نرون‌های حسی ریشه‌های نخاعی عصب سیاتیک رت‌های نر ویستار دارای نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی پرداخته می‌شود.

روش‌ها

در پژوهش حاضر ۱۲ سر رت صحرایی بالغ نر ۱۰ هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی 271.3 ± 11.2 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 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، رطوبت نسبی ۴۰٪ و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری گردیدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول

1. Mitogen-activated protein kinases
2. JNK-interacting protein
3. IKB kinases- complex- associated protein
4. Plenty of SH3s
5. Sunday Driver
6. C-Jun NH2- terminal kinase/stress- activated protein kinase- associated protein 1

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 جراحت کوچک توسط لانسیت بر روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۲۶]. لازم به ذکر است، با توجه به احتمال مرگ‌ومیر و عدم دیابتی شدن ناشی از تزریق STZ، تعداد ۱۲ رت جهت این کار در نظر گرفته شد که ۲ سر از آنها پس از تزریق از بین رفتند و در نهایت از میان رت‌های باقی مانده، تعداد ۸ سر به عنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند. با توجه به اینکه، میزان تزریق STZ و وزن حیوانات قبل از تزریق STZ، دو عامل مهمی هستند که پیدایش دیابت نروپاتیکی را به همراه دارند [۱۲۸، ۱۳، ۲۶]؛ لذا جهت کاهش حساسیت بیماری و اثرات جانبی به سطح قابل قبول [۲۶]، از کمترین میزان تزریق STZ و مطابق با وزن حیوانات [۸]، در مطالعه حاضر استفاده گردید. لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ گونه از علائم ناشی از تزریق اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید.

نحوه اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی

به منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰ × ۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار گرفتند. جهت سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stolling، USA جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع می‌شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده گردید. چنانچه دو بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا

اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب 326.3 ± 8.4 گرم جهت القا نروپاتی دیابت [۲۶]، رت‌ها به طور تصادفی در سه گروه چهارتایی قرار گرفتند: گروه اول (گروه دیابت تمرین کرده)، گروه دوم (گروه دیابت تمرین نکرده) و گروه سوم (گروه کنترل سالم). دو هفته پس از القا دیابت، آزمایش‌های رفتاری درد نروپاتیکی به عنوان شاخص عملکرد نرون‌های حسی [۲۷] اجرا گردید و پس از اطمینان یافتن از حصول نروپاتی حسی در رت‌ها [۲۸، ۲۹]، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام شد [۲۱]. ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. همچنین، به منظور سازگاری جهت آزمایش‌های رفتاری حیوانات به مدت سه روز در معرض آزمایش‌های رفتاری (دو بار برای هر آزمایش) قرار 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 گرفتند [۳۰]. سرانجام، به منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون‌ها، دیابت القا گردید. دو هفته پس از القا دیابت، با اجرای مجدد آزمون‌های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نروپاتیکی در گروه‌های دیابتی، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گردید [۲۱]. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار گردید. همچنین، به منظور اجتناب از عوامل مداخله‌گر نظیر آنتی‌نوسیسپشن القا شده توسط استرس، آزمایش‌های رفتاری نیز میان ساعت‌های ۷ تا ۱۰ صبح به عمل آمدند [۳۰].

القاء دیابت

به منظور القا دیابت نوع اول، 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

پروتکل تمرین

در پژوهش حاضر از سرعت تمرینی ۱۸-۱۰ متر در دقیقه معادل ۵۵-۵۰ درصد Vo2max و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک [۲۱]، استفاده گردید؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و به مدت شش 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 ۱۸-۱۷ 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 [۲۱].

استخراج نمونه

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش و سگمنت‌های نخاعی تشکیل دهنده عصب سیاتیک (L6-L4) [۳۴] که در رت، میان دنده‌های T10-T12 (۲۵-۲۰ mm) قرار گرفته‌اند [۳۵]، با برش در پایین‌ترین بخش ممکن بلافاصله استخراج گردید. سپس، بافت نخاع با استفاده از کانال مرکزی به عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی آن که حاوی نرون‌های حسی بود [۳۶]، در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگه‌داری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی گرم بافت حسی به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت یک به ده در QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ۴۰C، ۴، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت یک به نیم با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴۰C، ۴، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA

توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه Paw Withdrawal Threshold (PWT) محسوب می‌شد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. چنانچه حیوان به هیچ یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. همچنین، هر آزمایش سه بار و به تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید [۳۱،۳۲]. به طور کلی، سنجش آلودینا مکانیکی، قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد. لازم به ذکر است که از این روش، به عنوان یک روش کارآمد جهت سنجش رفتارهای درد نروپاتییک [۲۶،۲۷،۳۱،۳۲] و اثبات نروپاتی حسی [۲۶،۴۰-۴۵] در مطالعات حیوانی استفاده شده است.

نحوه اندازه‌گیری هایپرآلژزیای حرارتی

هایپرآلژزیای حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران با کمی تغییر مورد سنجش قرار گرفت [۳۳]. به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil, Italy) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول ۲۲ cm عرض ۲۲ cm ارتفاع ۱۳.۳ cm) و بر روی یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابجایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال شده و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف گردید و با ثبت زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه Paw Withdrawal Latency (PWL) میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار گرفت. هر پا به طور متناوب و با فواصل پنج تا ده دقیقه، برای سه بار آزمایش شد و میانگین آنها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت گردید. همچنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به طور کلی، سنجش هایپرآلژزیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد.

یافته‌ها

تمام رت‌ها در گروه تمرینی توانستند شش هفته تمرین استقامتی را به طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین دیابت) حاکی از اثر معنی‌دار تمرین بر بیان ژن SYD ($F=9/01$, $P=0/002$) و اثر تعاملی ($F=9/9$, $P=0/008$) بین دو متغیر فوق بود.

میانگین تغییرات زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی دو هفته پس از القا دیابت در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌دار کمتر بود ($P=0/001$). همچنین، در همان زمان، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودینیا مکانیکی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌دار کمتر بود ($P=0/001$) (جدول ۲).

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم به طور معنی‌دار بالاتر بود ($P=0/001$) و پس از شش 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 به طور معنی‌دار پایین‌تر بود ($P=0/001$) (نمودار ۱).

وزن اولیه گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند ($P=0/7$). اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه تمرین و کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم به طور معنی‌دار کمتر بود (به ترتیب $P=0/0001$ و $P=0/001$). همچنین، میانگین وزن گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به طور معنی‌دار کمتر بود ($P=0/004$) (نمودار ۲).

پس از شش هفته تمرین استقامتی، میانگین بیان ژن SYD در گروه دیابت تمرین نکرده نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی‌دار بالاتر بود ($P=0/001$). بیان ژن SYD در گروه دیابتی تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده نیز به طور معنی‌دار کمتر بود ($P=0/001$). همچنین، بین میزان بیان ژن SYD در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه کنترل سالم نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P=0/9$) (نمودار ۳).

برداشته و با نسبت یک به نیم با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در $0C$ ، 10min ، 12000g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در $20\mu\text{L}$ آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorff, Germany) و نسبت 260 به 280 بین $1/8$ تا 2 به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از $1\mu\text{g}$ از RNA و استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmuvl Reverse transcriptase انجام گرفت.

Real time – PCR

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان SYD mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $20\mu\text{L}$ و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های SYD و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: 95 به مدت 10 دقیقه - 95 به مدت 15 ثانیه، 60 به مدت یک دقیقه (تکرار 40 سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای مورد مطالعه از تحلیل واریانس دو طرفه استفاده شد. جهت انجام آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر LSD به عمل آمد. سطح معنی‌دار نیز $\alpha=0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS/Win نسخه ۱۶ انجام گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

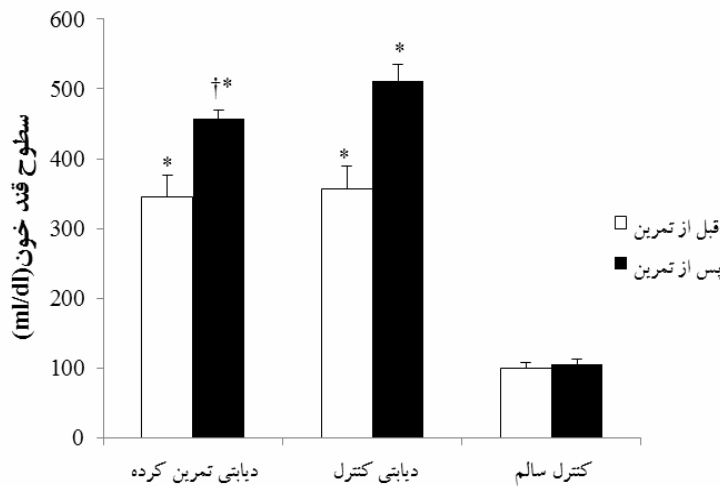
Genes	Primer sequence	GenBank code
SYD	For: 5'-CCAGCTACCAGTGTCCAAACGAT -3'	NM_001100673
	Rev: 5'- CTTTGTGACACTGCCATAGTCCC-3'	
GAPDH	For: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3'	NM_017008
	Rev: 5'- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	

جدول ۲- مقادیر آلودینا مکانیکی و هایپرالزیا حرارتی در گروه های سه گانه (Mean±SD)

متغیر	گروه	کنترل سالم	دیابت تمرین نکرده	دیابت تمرین کرده
آلودینا مکانیکی	گروه	۶۰ ± ۰	*۲۱/۲۸ ± ۵/۸۷	*۱۹/۷۱ ± ۸/۱۷
	هایپرالزیا حرارتی	۱۲/۶۸ ± ۰/۶۲	*۸/۸۸ ± ۱/۱۲	*۸/۹۸ ± ۱/۲۸

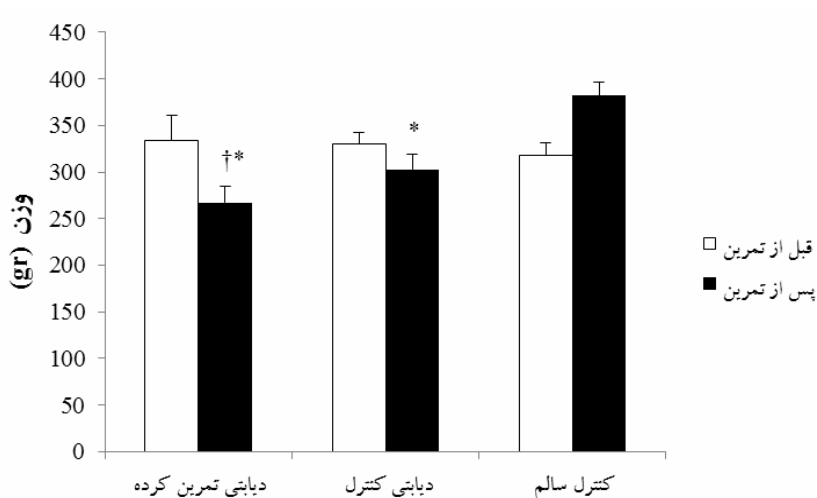
• اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۱)

نمودار ۱- تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف



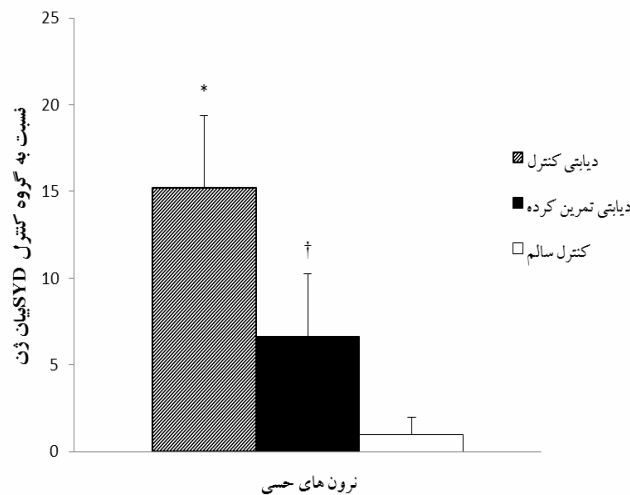
* اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۱)، † اختلاف معنی دار با گروه دیابت تمرین نکرده (P<۰/۰۱)

نمودار ۲- تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف



* اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۱)، † اختلاف معنی دار با گروه دیابت تمرین نکرده (P<۰/۰۱)

نمودار ۳- میزان بیان ژن SYD در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل



* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($P < 0.01$)، † اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت تمرین نکرده ($P < 0.01$)

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیماری دیابت منجر به افزایش mRNA SYD در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی می‌شود. این نتیجه همسو با مطالعاتی است که نشان داده‌اند SYD/JIP3 در دیگر بیماری‌های تخریب عصبی نیز دچار اختلال می‌گردد. برای مثال، Perrin و همکاران 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 [۳۷]. Stokin و همکاران نیز ثابت کردند فعال‌سازی SYD/JIP3 ممکن است در تنظیم انتقال و فسفریلاسیون پروتئین پیشرو آمیلوئید (APP) در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۳۸]. چنانچه Pan و همکاران 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 [۱۵].

همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین استقامتی موجب کاهش بیان ژن SYD در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی می‌گردد. مطالعات بسیاری نیز نشان داده‌اند تمرین استقامتی موجب بهبود عملکرد و ساختار نرون‌های حسی در نروپاتی دیابت می‌گردد. به گونه‌ای که، مطالعه قبلی ما نشان داد فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین استقامتی

موجب بهبود هایپرالژزیا حرارتی و آلودینیا مکانیکی به عنوان شاخص عملکرد نرون‌های حسی گردیده است [۳۹]. Chen و همکاران نیز نشان دادند تمرین شنا و دویدن روی نوار گردان موجب بهبود یافتن آلودینیا مکانیکی و هایپرالژزیا حرارتی در رت‌های نر تمرین کرده دیابتی گردیده است [۴۰]. Sharma و همکاران نیز نشان دادند ۳ هفته تمرین هوازی ملایم بر روی نوار گردان می‌تواند هایپرالژزیا مکانیکی را بهبود بخشد [۳۰]. Rossi و همکاران نیز ثابت کردند ۸ هفته تمرین شنا به بهبود هایپرالژزیا مکانیکی در رت‌های ماده ویستار دیابتی شده توسط STZ می‌انجامد [۴۱]. در تناقض با یافته‌های پژوهش حاضر، برخی مطالعات نیز نتوانسته‌اند به تایید اثرات تمرین ورزشی بر بهبود عملکرد و ساختار نرون‌های حسی بپردازند. برای مثال، Sluka و Rasmussen نشان دادند فعالیت ورزشی به افزایش زمان تاخیر در عقب کشیدن پا در هایپرالژزیا حرارتی می‌انجامد [۴۲]. این تناقض می‌تواند ناشی از مدل ورزشی متفاوت این پژوهشگران باشد که در آن از فعالیت ورزشی وامانده‌ساز استفاده شده بود. این موضوع نشان می‌دهد که فعالیت‌های ورزشی طاقت‌فرسا می‌تواند اثرات منفی بر عملکرد نرون‌های حسی در نروپاتی دیابت داشته باشد.

علاوه، مطالعات نشان می‌دهند که فشار اکسایشی، مهار آنزیم پیرووات دهیدروژناز، نقصان در عملکرد و تعداد میتوکندری، کاهش سطوح ATP سلولی [۴۸] و افزایش سایتوکاین‌های التهابی نظیر TNF- α [۱۱] می‌توانند به عنوان عوامل بالادست به تنظیم افزایشی پروتئین‌های کینازهای فعال شده توسط استرس بیانجامند؛ در حالی که تمام این اختلالات در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی شده توسط STZ نیز مشاهده شده است [۲۴،۱]. از سوی دیگر، مطالعات ثابت کرده‌اند که ورزش می‌تواند موجب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی [۱۹]، افزایش بیورژن میتوکندری و سطوح ATP سلولی در مغز [۴۹] و کاهش سایتوکاین‌های التهابی [۴۰] را به همراه داشته باشد. لذا این احتمال می‌رود که در پژوهش حاضر، تمرین استقامتی از طریق بهبود سطوح انرژی سلولی و کاهش سایتوکاین‌های التهابی، تنظیم کاهشی SYD mRNA و بهبود عملکرد و ساختار نرون‌های حسی به همراه داشته است؛ اگر چه این موارد به طور مستقیم در پژوهش حاضر ارزیابی نشده‌اند و جهت اثبات این موضوع، نیاز به انجام مطالعات بیشتر است.

به طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر و از سوی دیگر با توجه به نقش SYD/JIP3 در تنظیم فرآیندهای نرونی ویژه، می‌توان بیان کرد که احتمالاً در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی SYD/JIP3 mRNA، در پیام‌رسانی آسیب نرونی درگیر بوده و تمرین استقامتی می‌تواند به عنوان یک راهبرد غیر دارویی، این افزایش را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که از تمرین استقامتی با شدت متوسط به عنوان یکی از مهارکننده‌های SYD/JIP3، جهت درمان اختلالات ناشی از بیماری نروپاتی دیابت استفاده گردد؛ هر چند که نکات متعددی در این ارتباط وجود دارند و در آینده باید مورد مطالعه قرار بگیرند.

سپاسگزارای

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ابراز می‌دارند.

در ارتباط با شناسایی سازوکارهای درگیر در بهبود عملکرد نرون‌های حسی در اثر تمرین ورزشی نیز مطالعات بسیاری انجام شده است. برای مثال، Chen و همکاران اثرات تمرین ورزشی بر بهبود عملکرد نرون‌های حسی را به کاهش بیان IL-1 β و TNF- α و افزایش سطوح Hsp72 در عصب سیاتیک نسبت داده‌اند [۴۰]. Sharma و همکاران این موضوع را به افزایش وابسته به ورزش بیان mRNA و سطوح پروتئین NT-3 در عضله اسکلتی نسبت داده‌اند [۳۰]. این مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش سایتوکاین‌های التهابی و پیش التهابی، افزایش محتوی اپوپتیدهای درون‌زا و عوامل نروتروفیک، به بهبود وضعیت نرون‌های حسی بیانجامد. این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین ورزشی با شدت متوسط موجب کاهش معنی‌دار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. مطالعات نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند جهت کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن مفید واقع شود. به علاوه، نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد [۴۰]. 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 آسیب در نرون‌های حسی رت‌های دیابتی تمرین کرده گردیده است. اگرچه 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 اختلالات حسی نروپاتی دیابت سهیم دانسته‌اند و نشان داده‌اند که درمان انسولین می‌تواند به بهبود عملکرد نرون‌های حسی بیانجامد [۴۳-۴۵].

مطالعات انجام شده در ارتباط با نقش SYD در تنظیم ساختار و عملکرد سلول‌های عصبی حاکی از نقش تنظیمی آن در جنبش‌پذیری موتور پروتئین‌های کاینزین و داینین [۱۳]، تعدیل انتقال آکسونی وزیکول‌های سیناپسی، تنظیم انتقال آکسونی عوامل نروتروفیک و گیرنده‌های آنها [۴۶،۱۳]، نورژن، بقا و تفکیک عصبی [۴۷] و فعال کننده قدرتمند مسیرهای پیام‌رسانی JNK [۱۱] می‌باشند. به

مأخذ

- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120(1):1-34.
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103, 239-252.
- Resnick L, Fennell M. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today* 2004; 9, 932-939.
- Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 1998; 281, 1671-1674.
- Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 277, 693-696.
- Holmberg C, Katz S, Lerdrup M, Herdegen T, Jaattela M, Aronheim A, Kallunki T. A novel specific role for I kappa B kinase complex-associated protein in cytosolic stress signaling. *J Biol Chem* 2002; 277, 31918-31928.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dajas-Bailador F, Jones EV, Whitmarsh AJ. The JIP1 scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons. *Curr Biol* 2008; 18, 221-226.
- Koushika SP. "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays* 2008; 30, 10-14.
- Angelova 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Alzheim Dis* 2011; 24, 633-642.
- 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 App lNeurobiol* 2012; 38(4):311-21.
- Cotman, C.W, Berchtold, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 295-301.
- Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A.W., Ohno, H., Nakamoto, H., Goto, S. Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fraction of rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383: 114-118.
- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 2006; 49, 387-392.
- 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 signal regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009; 164, 1665-1673.
- Gerchman, L, Edgerton V and Carrow R. Effects of physical training on the histochemistry and morphology of ventral motor neurons. *Exp Neurol* 1975; 49:790-801.
- Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 1999; 89(4): 1229-39.
- Said G. Diabetic neuropathy: a review. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3:331-340.
- Szilvássy Z, Németh J, Kovács P, Paragh G, Sári R, Vigh L, Peitl B. Insulin resistance occurs in parallel with sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats: differential response to early vs late insulin supplementation. *Metabolism* 2012; 61(6):776-86.
- Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 2004; 99: 55-65.

27. 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.
28. Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2009 57(4):456-62.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Prodanov D, Feirabend HKP. Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol* 2007; 503:85-100.
35. Liu S, Bréjot T, Cressant A, Bacci J, Saïd G, Tadié M, et al. Reinnervation of hind limb extremity after lumbar dorsal root ganglion injury. *Exp Neurol* 2005; 196(2):401-12.
36. Berger JV, Deumens R, Goursaud S, Schäfer S, Lavand'homme P, Joosten EA, Hermans E. Enhanced neuroinflammation and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats expressing mutated superoxide dismutase 1. *J Neuroinflammation* 2011, 13; 8:33.
37. 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.
38. Stokin GB, Goldstein LS. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:607- 627.
39. Rahmati M, Khazani A, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Manaheji H. Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. *Physiol Pharmacol* 2013; 16 (4): 435-445.
40. 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.
41. Rossi D M, Valenti V E, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *CLINICS* 2011; 66(9):1615-1619.
42. Sluka KA and Rasmussen LA. Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle Inflammation. *Pain* 2010; 148(2): 188.
43. Lee JH, McCarty R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. *Physiol Behav* 1990; 47: 225-230.
44. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain* 1992; 50: 231- 236.
45. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1-164.
46. Huang SH, Duan S, Sun T, Wang J, Zhao L, et al. (2011) JIP3 mediates TrkB axonal anterograde transport and enhances BDNF signaling by directly bridging TrkB with kinesin-1. *J Neurosci* 2011; 31: 10602-10614.
47. Takino T, Nakada M, Miyamori H, et al. JSAP1/JIP3 cooperates with focal adhesion kinase to regulate c-Jun N-terminal kinase and cell migration. *J of biological chemistry* 2005; 280(45): 37772-81.
48. Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2008; 104(2):325-35.
49. Steiner JL, Murphy E A, McClellan JL, Carmichael MD and Mark J. Exercise Training Increases Mitochondrial Biogenesis in the Brain. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1066-1071.