مجله دیابت و متابولیسم ایران. بهمن- اسفند ۱۳۹۲؛ دوره ۱۳ (شماره ۳) ۲۷۱-۲۶۳

اثر ۶ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن فاکتور رشد عصبی در بخش حسی نخاع رت‌های با نوروپاتی دیابت

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

چکیده

مقدمه: نوروپاتی دیابت یکی از رایج‌ترین عوارض دیابت می‌باشد که با کاهش در سنتز و انتقال نروتروفین‌ها همراه است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در بخش حسی رت‌های با نوروپاتی دیابت می‌باشد.

روش‌ها: ۲۸ سر رت صحرایی بالغ از نژاد ویستار با میانگین توده بدنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم به‌طور تصادفی در چهار گروه دیابت کنترل، دیابت تمرین، سالم کنترل و سالم تمرین قرار گرفتند. جهت القا نوروپاتی دیابت، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از روش تزریق درون صفاقی محلول STZ (٤٥ mg/kg) استفاده گردید. ۲ هفته پس از تزریق STZ پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌مدت ٦ هفته انجام گردید و ٢٤ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها قربانی شدند. با استفاده تکنیک Real time-Pcr بیان ژن NGF در بخش حسی نخاع رت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها و تعامل متغیرها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید.

یافته‌ها: تمرین استقامتی، موجب افزایش معنادار در بیان ژن NGF در رت‌ها شد. همچنین، کاهش معنی‌دار سطوح گلوکز خون در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: افزایش فعالیت بدنی و تمرین می‌تواند به‌طور قوی عوامل پاتولوژیک مرتبط با نوروپاتی دیابت را از طریق افزایش فاکتور رشد عصبی تحت تاثیر قرار دهد. لذا پیشنهاد می‌گردد افراد دیابتی برای پیشگیری از عوارض عصبی و درمان بیماری‌های مرتبط با آن از ورزش در کنار دیگر راه‌های درمانی استفاده نمایند.

واژگان کلیدی: نوروپاتی دیابت، تمرین استقامتی، فاکتور رشد عصبی، نخاع

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس

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

***نشانی:** تهران، جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸٤٦٤٦، آدرس پست الکترونیک: ghara_re@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۳ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۱۳۹۲/۱۱/۲۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۲/۱۶

مقدمه

نوروپاتی دیابت[1] شامل اختلال اعصاب محیطی در افراد مبتلا به دیابت، پس از حذف دیگر عوامل ایجاد کننده نوروپاتی می‌باشد [۱]، که با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی اکسون، میلین زدایی، کاهش تارهای عصبی و کند شدن بازسازی تارهای عصبی همراه است [۲] و می‌تواند منجر به علائمی از قبیل درد و از دست دادن حس شود [۳]. شیوع نوروپاتی محیطی دیابت[2](DPN) با افزایش مدت دیابت و میزان هایپرگلیسمی افزایش می‌یابد [٤]. سازوکارهای مختلفی در بیماری‌زایی نوروپاتی دیابت، از قبیل هایپرگلیسمی[3]، مسیر پلیول[4]، گلیکاسیون و استرس اکسیداتیو درگیر می‌باشند [۵]. آسیب اعصاب می‌تواند مستقیما در اثر تجمع گلوکز درون سلولی و جریان افزایش یافته مسیر پلیول(با آلدوز ریداکتاز)، که پیامدهای آن شامل تولید گلیکاسیون قندها، محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته[5](SGE)، آسیب اکسیداتیو افزایش یافته و فعال شدن پروتئین کیناز C باشد [٦]. علی‌رغم آسیب‌های مستقیم ناشی از هایپرگلیسمی، به‌طور غیرمستقیم ایسکمی به‌وجود آمده از کاهش جریان خون عروقی-عصبی می‌تواند در بیماری زایی نوروپاتی دیابت نقش ایفا نماید. اطلاعات جمع آوری شده از مدل‌های حیوانی دیابت نشان داده است، کمبود و نقص فاکتورهای نروتروفیکی و گیرنده‌های آنها در پیشرفت نوروپاتی دیابت دخیل می‌باشد [٦]. آتروفی و حتی مرگ نرون‌ها می‌تواند به‌دلیل کاهش فاکتورهای رشدی در نوروپاتی دیابت ایجاد شود [۷].

نروتروفین‌ها نقش مهمی در توسعه بقا، تمایز، عملکرد و ترمیم نرونی ایفا می‌نمایند. آنها رشد آکسونی در نرون‌های حسی، هم بازسازی عصب در پاسخ به آسیب و هم شاخه‌زایی جانبی پایانه‌های عصبی آسیب ندیده را تنظیم می‌کنند [۸]. فاکتور رشد عصبی[6](NGF) اولین عضو کشف شده از خانواده نروتروفین‌ها می‌باشد، که برای رشد و حفظ فنوتیپ نرون‌ها در سیستم عصبی محیطی[7] و یکپارچگی عملکردی نرون‌های کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی[8] ضروری می‌باشد [۹]. NGF در سیستم عصبی مرکزی و محیطی وجود دارد و از طریق انتقال رو به عقب، به‌وسیله گیرنده با میل ترکیبی بالا TrkA[9] و p75[10] گیرنده با میل ترکیبی پایین بر نرون‌های حسی اثر می‌گذارد و رشد و تمایز پذیری نرون‌های جوان را تحریک کرده و به بالیده شدن آنها کمک می‌کند [۱۰،۱۱]. ناحیه کینازی گیرنده TrkA به محض اتصال NGF متحمل ترانس فسفوریلاسیون می‌شود، و اعتقاد بر این است که این رویداد آبشار پیام‌بر ثانویه را راه‌اندازی می‌کند، در نتیجه موجب دامنه‌ای از تغییرات عملکردی در فعالیت نرون می‌شود [۱۱]. در وضعیت‌های پاتولوژیکی از قبیل دیابت، بیان NGF و گیرنده آن کاهش می‌یابد [۱۰]. اطلاعات به‌دست آمده از مدل‌های حیوانی و انسانی نشان می‌دهد که نوروپاتی‌های محیطی می‌تواند مرتبط با عدم تنظیم در هر یک از سنتز، انتقال، و مصرف NGF به‌وسیله نرون‌های PNS باشد [۹]. از سوی دیگر، تامین NGF در مدل‌های حیوانی با نوروپاتی دیابت، از طریق اثر محافظتی بر نرون‌های PNS نشانه‌های نوروپاتیکی آنها را برگشت داده و فعالیت آنها را نرمال ساخته است. ولی استفاده از NGF اگزوژنز[11](با منشا خارج از بدن) اثرات جانبی از قبیل درد عضلانی و هایپرآلژزیا[12](افزایش حساسیت به درد) در محل تزریق در آزمودنی‌های سالم نشان داد [۹]. بنابراین، سیستم NGF برای رشد و حفظ سیستم عصبی محیطی حیاتی می‌باشد [۱۲].

از سوی دیگر فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی بازسازی نرون‌های حسی را پس از آسیب آکسون افزایش داده و بیان ژن پروتئین‌های مورد نیاز برای رشد و بازسازی آکسون را تحریک می‌کند [۱۳]. علاوه بر این، تمرین ورزشی منظم موجب بهبود عملکردهای مغزی نظیر ادراک می‌گردد؛ شکل پذیری مغز، سیستم ضد اکسایشی و تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها را ارتقا می‌بخشد و از آپوپتوز

---

1 Diabetic Neuropathy
2 Diabetic Pripheral Neuropathy
3 hyperglycemia
4 Polyol Pathway
5 Advanced Glycation End-Products
6 Nerve Growth Factor
7 Peripheral Nervouse System
8 Central Nervouse System
9 Tyrosine Kinase A Receptor
10 p75 Receptor
11 Exogenous
12 hyperalgesia

سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند. ورزش همچنین می‌تواند بیوسنتز RNA، افزایش انتقال آکسونی و افزایش میزان جوانه زنی عصبی به‌دنبال برش عصبی را به همراه داشته باشد [۱٤]. تجویز برنامه‌های ورزشی بلند مدت می‌تواند پارامترهای عصبی عضلانی را در بیماران دیابتی تحت تاثیر قرار دهد، بدین وسیله تغییرات سازشی در سیستم عصبی عضلانی در پاسخ به تمرین ورزشی ایجاد نماید. تغییرات متابولیکی و عروقی متعدد ناشی از ورزش می‌تواند دلیلی برای توضیح اثرات ورزش بر بهبود DPN باشد [۱۵].

فعالیت ورزشی منظم در وضعیت دیابت نه فقط به هموستاز گلوکز کمک می‌کند بلکه اثر مثبت بر بیان NGF دارد، که سلول‌های عصبی را از مسمومیت محافظت می‌کند [۱۰]. مطالعات مختلفی ارتباط مستقیم بین تغییر در NGF و ورزش را نشان داده‌اند. بخشی از این NGF در عضلات یا CNS سنتز می‌شود، به‌علاوه تمرین ورزشی پویا گیرنده‌های NGF را افزایش می‌دهد [۱٦]. Chae و همکاران[1] [۱۰] گزارش کردند که ٦ هفته تمرین استقامتی بیان NGF ،در عضله نعلی رت‌های دیابتی ناشی از STZ[2] را افزایش می‌دهد، این افزایش سطوح NGF می‌تواند فعال شدن PI3-K[3] را تسریع کند و از این طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های عضلانی در عضله نعلی را کاهش دهد [۱۰].

در سال‌های اخیر، توجه زیادی به عواملی که می‌تواند بازسازی عصبی را در نوروپاتی دیابت بالا ببرد و نرون‌ها را از مرگ سلولی حفظ کند معطوف گردیده است.اکنون نشان داده شده که درمان با NGF نوروپاتی حسی دیابت را در حیوانات بهبود می‌بخشد، لذا NGF می‌تواند کمک مفیدی برای درمان نوروپاتی دیابت و خودمختار باشد و باتوجه به نقش فعالیت بدنی و ورزش در کنترل دیابت و کاهش عوارض ناشی از آن و تاثیر مثبت بر تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها، این سوال پیش می‌آید که آیا تمرین و ورزش می‌تواند به‌عنوان یک راه پیشگیری و/یا یک مکمل درمانی در کنار راه‌های درمانی دیگر، عوارض ناشی از نوروپاتی دیابت را کاهش دهد و تخریب اعصاب را کنترل و دوباره سازی آنها را افزایش دهد؟ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ٦ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در نخاع رت‌های نر ویستار با نوروپاتی دیابت می‌باشد.

روش‌ها

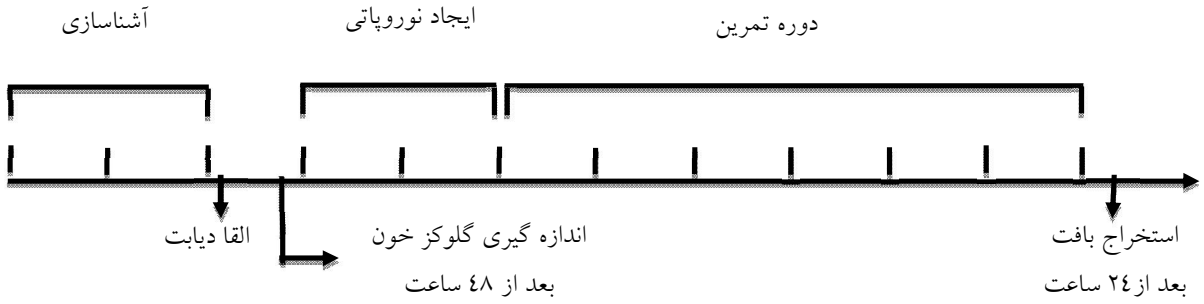
حیوانات و شرایط نگهداری

تحقیق حاضر از نوع تجربی بوده که برای این منظور ۲۸ سر موش صحرایی نر ویستار با ۱۰ هفته سن و میانگین وزنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم از انستیتو رازی خریداری شد. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی گراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری گردیدند. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب ۸/٤±۳۲٦/۳ گرم [۱۷] رت‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه هفت تایی، دیابت تمرین کرده (DTG)[4]، گروه دیابت کنترل (DCG)[5]، گروه سالم تمرین کرده (HTG)[6] و گروه سالم کنترل(HCG)[7] تقسیم شدند. کلیه مراحل اجرای پژوهش حاضر در شکل ۱ نشان داده شده است. در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور سازگار شدن به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات ۵ روز در هفته به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند.

نحوه القا دیابت توسط STZ

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:٤/۵) دیابت القا گردید. به رت‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ٤۸ ساعت پس از تزریق؛ با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار

[1] Chae and et al
[2] Streptozotocin
[3] Phosphoinositide 3-Kinase
[4] Diabetic Training Group
[5] Diabetic Control Group
[6] Healthy Training Group
[7] Healthy Control Group



شکل ۱- طرح شماتیک ۱۲ هفته‌ای اجرای مراحل مختلف در پژوهش حاضر

توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به‌عنوان رت‌های دیابتی وارد مطالعه حاضر شدند [۱۷]. لازم به ذکر است که در این پژوهش، پس از تزریق STZ، هیچ گونه از علائم ناشی از تزریق اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید و ۲ هفته پس از القا دیابت پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت ٦ هفته انجام گردید و تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ١٦ تا ١٨ عصر برگزار گردید.

برنامه تمرینی

در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک [۱۰]، استفاده گردید. بدین صورت که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به مدت ٦ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به‌تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵-۱٤ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵-۱٤ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی ثابت نگه داشته شدند [۱۰]. همچنین، از هیچ گونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده نگردید و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین می‌گردیدند.

استخراج بافت

در پایان ٦ هفته برنامه تمرینی، ۱۲ ساعت پس آخرین جلسه تمرین رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیب زایلازین و کتامین بیهوش شده و تحت شرایط استریل بخش حسی سگمنت‌های نخاعی L4، L5، L6 جدا شد. بافت مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و این نمونه تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۷۰- °c منجمد و نگهداری گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به‌منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در٤^0C، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در ٤^0C، 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 در٤^0C، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در Lμ20 آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ بین

۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از gμ1 از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv Reverse transcriptase انجام گرفت.

Real time – PCR

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان NGF mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lμ20 و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های NGF و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکروژن (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: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰ به‌مدت ۱ دقیقه (تکرار ٤۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

ژن	توالی پرایمر	بانک ژن
NGF	For: ٥′- CAC CTC TTC GGA CAC TCT GGA –٣′ Rev: ٥′- CGT GGC TGT GGT CTT ATC TCC –٣′	NM_۰۰۱۲۷۷۰٥٥.۱
GAPDH	For: ٥′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC –٣′ Rev: ٥′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT –٣′	NM_۰۱۷۰۰۸

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده‌ها براساس میانگین±انحراف استاندارد توصیف شده‌اند. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، همسان بودن واریانس‌ها از آزمون Leven استفاده شد. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها و تعامل متغیرها از تحلیل واریانس دوطرفه[1] و آزمون تعقیبی LSD[2] استفاده گردید. سطح معناداری نیز $P\leq$۰/۰٥ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

یافته‌ها

تمام رت‌ها در گروه‌های تمرینی توانستند ٦ هفته تمرین استقامتی را به‌طور مداوم انجام دهند و به اتمام برسانند. اختلاف معناداری در توده بدن اولیه گروه‌ها، مشاهده نگردید. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (تمرین×دیابت) تفاوت معناداری بین گروه‌ها در مقدار NGFmRNA (P=۰/۰۰۰۱) و تعامل بین دو متغیر فوق ($P\leq$۰/۰٥) را نشان داد.

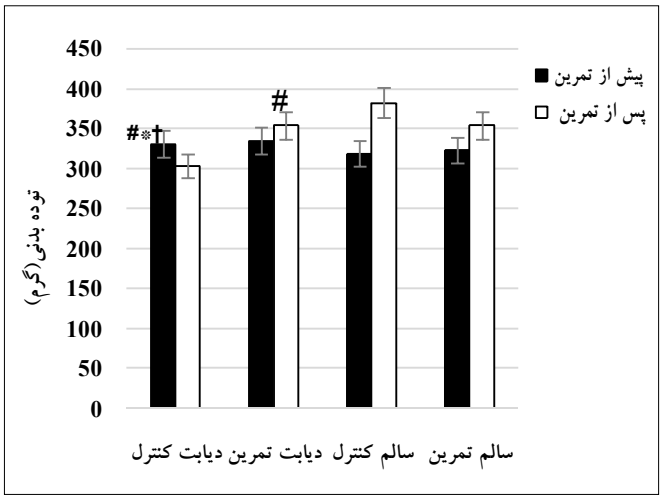
سطح NGFmRNA به‌طور قابل ملاحظه‌ای در گروه DCG کمتر از گروه HCG بود(P=۰/۰۲۹). همچنین، گروه‌های تمرینی سالم و دیابت به‌طور قابل توجهی نسبت به گروه HCG سطوح بالاتری از NGFmRNA را داشتند($P\leq$۰/۰٥). سطوح NGFmRNA در گروه DTG نسبت به HTG بیشتر بود ولی به لحاظ آماری این اختلاف معنادار نبود($P>$۰/۰٥) (نمودار ۱).

در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه‌های تمرین و کنترل دیابتی نسبت به گروه‌های تمرین و کنترل سالم به‌طور معنی‌دار کمتر بود (به ترتیبP=۰/۰۰۰۱ و P=۰/۰۰۱). همچنین، میانگین وزن گروه DTG نسبت به DCG به‌طور معنی‌دار کمتر بود (P=۰/۰٤). اگرچه، میانگین وزن گروه HTG نسبت به گروه HCG کمتر بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۱) (نمودار ۲).

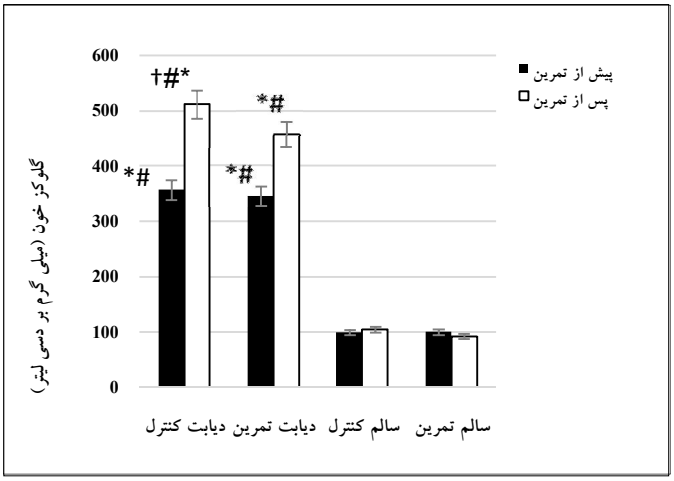
[1] Two Way ANOVA
[2] Post Hoc LSD Test

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنادار بالاتر بود (P=۰/۰۰۰۱) و پس از ٦ هفته تمرین استقامتی نیز هم‌چنان از اختلاف معنادار برخوردار بود (P=۰/۰۰۰۱). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه DTG نسبت به گروه DCG به‌طور معنی‌دار پایین‌تر بود (P=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۳).

نمودار ۱- مقدار NGFmRNA در گروه‌ها.
***اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<۰/۰۰۱)،**
 # اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین (P<۰/۰۰۱)،
† اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت کنترل (P<۰/۰۰۱)



نمودار ۲- تغییرات توده بدن در گروههای مختلف
*** اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین نکرده (P<۰/۰۱)،**
 # اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین کرده (P<۰/۰۱)،
† اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت تمرین نکرده (P< ۰/۰۱).



نمودار۳- تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف
*** اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین نکرده (P<۰/۰۱)،**
 # اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین کرده (P<۰/۰۱)،
† اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت تمرین نکرده (P< ۰/۰۱).

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، ما اثر ٦ هفته فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در بخش حسی نخاع رت‌های دیابتی با القا STZ را مورد ارزیابی قرار دادیم. همچنین، جهت به حداقل رساندن آسیب‌های ساختاری و اکسایشی ناشی از تمرین بیش از حد، در پژوهش حاضر از فعالیت ورزشی با شدت متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) استفاده گردید. نتایج نشان داد که یک برنامه ٦ هفته‌ای تمرین استقامتی سبب تنظیم افزایشی بیان ژن NGF هم در رت‌ها با نوروپاتی دیابت و هم در رت‌های سالم می‌شود. یافته‌ها از پژوهش‌های گذشته نشان داده که دیابت با کاهش در انتقال رو به عقب NGF و بیان کمتر ژن و پروتئین NGF [۱۱] و گیرنده‌های p75 و TrkA [۱۰]،در بافت‌های هدف نرون‌های حسی محیطی همراه می‌باشد. همسو با مطالعات قبلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح NGF به‌طور معناداری در DCG در مقایسه با رت‌های HCG کاهش یافته است [۱۰،۱۸،۱۹]. دیابت موجب عوارض عصبی مختلف، اختلال عملکرد سیستم عصبی مرکزی و محیطی و تسریع تخریب عصبی می‌شود [۱۰]. نروتروفین‌ها برای بقا و تمایز نرون‌های حسی در طول رشد ضروری می‌باشند، از سوی دیگر نروتروفین‌ها نقش مهمی در حفظ عملکرد فیزیولوژیک و پاسخ‌های نوسازی پس از آسیب آکسونی در نرون‌های بالغ DRG ایفا می‌نماید [۲۰]. این به خوبی مشخص شده که تغییر در سبک زندگی شامل تغذیه سالم، افزایش فعالیت بدنی و ورزش می‌تواند به میزان قابل ملاحظه‌ای شیوع دیابت و عوارض ناشی از آن از قبیل نوروپاتی را کاهش دهد [۳]. در این پژوهش، تمرین استقامتی بیان ژن NGF در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های DCG و HCG را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. مطالعات مختلفی ارتباط مستقیم بین تغییر در سطوح NGF و ورزش را نشان داده‌اند. به‌علاوه تمرین ورزشی پویا گیرنده‌های NGF را نیز افزایش می‌دهد [١٦]. Chae و همکاران [۱۰] نشان دادند که ٦ هفته تمرین استقامتی آپوپتوز سلول‌های عضلانی را از طریق افزایش سطوح NGF در عضله نعلی رت‌های دیابتی با القا STZ متوقف می‌کند [۱۰]. همچنین، تمرین دویدن روی تردمیل و شنا کردن سطوح NGF را به‌طور معناداری پس از اتمام دوره تمرینی برای ٤ هفته بالاتر از گروه کنترل نگه می‌دارد و نرون‌زایی را تحریک می‌کند [۲۱]. بنابراین به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد نرون‌ها به کاهش و افزایش فعالیت به لحاظ زیستی سازگار می‌شوند که چنین تغییراتی می‌تواند به بقای نرون‌ها کمک کند. به‌عنوان مثال افزایش فعالیت عضلانی ممکن است مصرف

مواد تروفیک را افزایش دهد، زیرا گزارش شده است که تمرین استقامتی مزمن سرعت و میزان انتقال آکسونی سریع پروتئین را افزایش می‌دهد [۲۲،۲۳] .

به‌طور جالب توجهی در این مطالعه، تمرین استقامتی موجب بیان بیشتر NGF در گروه DTG نسبت به HTG شده است ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود. به‌دلیل عدم وجود پژوهش دیگری در این زمینه و بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان نروتروفین‌ها در نخاع رت‌های دیابتی سازوکارهای مرتبط با این افزایش بیشتر در گروه DTG ناشناخته باقی مانده است. از این رو، دلایل احتمالی برای این افزایش ممکن است اولاً، نیاز بیشتر به NGF در بخش حسی نخاع رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های سالم باشد. نوروپاتی دیابت همراه با تخریب اعصاب و تغییرات در ساختار اعصاب می‌باشد [۲]. از سوی دیگر NGF برای رشد آکسونی در نرون‌های حسی، بازسازی عصب در پاسخ به آسیب و هم شاخه زایی جانبی پایانه‌های عصبی آسیب ندیده ضروری می‌باشد [۸]. دوماً، به‌علت اختلالات [۱]، یا آسیب به اعصاب محیطی [۲٤]، در بیماران دیابتی [۱] فشار تمرینی در گروه‌های دیابتی مضاعف بوده و همین امر موجب بیان بیشتر NGF در بخش حسی نخاع آنها شده باشد. پژوهشگران گزارش کرده‌اند که در وضعیت دیابت نقص در سنتز NGF می‌تواند به‌دلیل هایپرگلیسمی یا هیپوانسولینی و در نتیجه تجمع پولیول، تغییر در غلظت کورتیکواسترون و ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامینD_3 و نقص سیستم آنتی اکسیدانی اتفاق افتد. کورتیکواسترون سنتز NGF را کاهش، در حالیکه ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامینD_3 افزایش می‌دهد [۷]. در ارتباط با سازوکارهای تاثیر فعالیت بدنی بر سنتز NGF، می‌توان اظهار داشت که ورزش از طریق اثر بر موارد فوق بیان NGF را افزایش می‌دهد. برای مثال، ورزش منظم ترشح گلوکوکورتیکوئیدها را کاهش می‌دهد [۱۰] و از طرفی ظرفیت آنتی اکسیدانی را تقویت می‌نماید [۲۵].

همچنین، پژوهش حاضر نشان داد تمرین ورزشی موجب کاهش معنی‌دار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. عضلات اسکلتی عمده‌ترین مکان مصرف سوخت متابولیک در حالت استراحت هستند و فعالیت عضلانی افزایش یافته در طول فعالیت ورزشی هوازی، نیازمندی‌های سوختی را افزایش می‌دهد. لذا مطالعات نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند جهت کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن مفید واقع شود. به‌علاوه، نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد [۲٦]. از سوی دیگر، مطالعات نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت کند [۲۷]، بیان انتقال دهنده‌های گلوکز را افزایش دهد [۲۸] و سرانجام کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به همراه داشته باشد [۲٦]. بررسی ارتباط احتمالی میان این تغییرات با تغییرات مربوط به فاکتور رشد عصبی باید در دستورکار آینده باشد.

به‌طور کلی، افزایش فعالیت بدنی و ورزش می‌تواند به‌طور قوی عوامل پاتولوژیک مرتبط با نوروپاتی دیابت را از طریق افزایش فاکتور رشد عصبی تحت تاثیر قرار دهد. لذا پیشنهاد می‌گردد افراد دیابتی برای پیشگیری از عوارض عصبی دیابت و درمان بیماری‌های عصبی مرتبط با دیابت از ورزش در کنار دیگر راه‌های درمانی استفاده نمایند. همچنین پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های آینده سازوکارهای بیان شده در افزایش NGF را با مداخله تمرین ورزشی مورد بررسی قرار دهند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس و هم‌چنین زحمات بی‌دریغ جناب آقای دکتر سمنانیان که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند سپاسگزاری می‌گردد. این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

ماخذ

1. Bril V. Treatments for diabetic neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2012;17:22-7.
2. Farmer K. The Effect Of Voluntary Exercise On Neuropathic Pain: University of Kansas; 2010.
3. Kluding PM, Pasnoor M, Singh R, Jernigan S, Farmer K, Rucker J, et al. The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of diabetes and its complications* 2012;26:424-9.
4. Baqiyyah C, Amanda P. Diabetic Neuropathy. In: Escher AP, Li A, editors. Type 1 Diabetes. Croatia: InTech; 2013. p. 331-58.
5. Kiani J MA, Azizkhani H, Kosarifard S. The prevalence and associated risk factors of peripheral diabetic neuropathy in Hamedan, Iran. *Arch Iran Med* 2013;16:9-17.
6. Boucek P. Advanced Diabetic Neuropathy: A Point of no Return? *Rev Diabet Stud* 2006;3:7.
7. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 2003;69:229-85.
8. Karamoysoyli E, Burnand RC, Tomlinson DR, Gardiner NJ. Neuritin Mediates Nerve Growth Factor–Induced Axonal Regeneration and Is Deficient in Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2008;57:181-9.
9. Aloe L, Rocco M, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine* 2012;10:239.
10. Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2011;67:235-41.
11. Delcroix JD, Michael GJ, Priestley JV, Tomlinson DR, Fernyhough P. Effect of nerve growth factor treatment on p75NTR gene expression in lumbar dorsal root ganglia of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1998;47:1779-85.
12. Leinninger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004;9:26-53.
13. Molteni R, Zheng J-Q, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:8473-8.
14. Rahmati M, Khazani A, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Manaheji H. Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. *Physiology and Pharmacology* 2013;16:435-45.
15. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, et al. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of diabetes and its complications* 2006;20:216-23.
16. Tipton CM, Medicine ACoS. Acsm's Advanced Exercise Physiology: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2006.
17. Calcutt N. Modeling Diabetic Sensory Neuropathy in Rats. In: Luo ZD, editor. Pain Research: Humana Press; 2004. p. 55-65.
18. Cheng H, Hayes J, Hong Y, Feldman E. Upregulation of nerve growth factor signaling in painful neuropathy of type 2 diabetes. *The journal of pain* 2008;9:2.
19. Pittenger G, Vinik A. Nerve Growth Factor and Diabetic Neuropathy. *Experimental Diabesity Research* 2003;4:271-85.
20. Shen H, Chung JM, Chung K. Expression of neurotrophin mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve injury. *Molecular Brain Research* 1999;64:186-92.
21. Chae CH, Lee HC, Jung SL, Kim TW, Kim JH, Kim NJ, et al. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 2012;212:30-7.
22. 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;89:1229-39.
23. Kanda K, Hashizume K, Miwa T, Miwa Y. Overloading a muscle does not alter the rate of motoneuronal loss in aged rats. *Neurobiology of Aging* 1996;17:613-7.
24. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology* 2012;11:521-34.
25. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovascular Diabetology* 2011;10:12.
26. 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. *Anesthesia & Analgesia* 2012;114:1330-7.
27. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H, Nakamoto H, et al. Regular Training Modulates the Accumulation of Reactive Carbonyl Derivatives in Mitochondrial and Cytosolic Fractions of Rat Skeletal Muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000;383:114-8.
28. Osborn BA, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD, Paulson DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *Journal of Applied Physiology* 1997;82:828-34.

THE EFFECT OF 6 WEEKS ENDURANCE TRAINING ON GENE EXPRESSION OF NERVE GROWTH FACTOR IN SENSORY SPINAL CORD OF RATS WITH DIABETIC NEUROPATHY

Amir Bahador Dakhili[1], Reza Gharakhanlou[*1], Mansoureh Movaheddin[2], Ali Khazani[1], Mohammad Keshavarz[1]

1. *Dept. Physical education and sport science, Tarbiat Modares University Tehran, Iran.*
2. *Dept. Anatomy, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

ABSTRACT

Background: Diabetic neuropathy is one of the most common complications of diabetes mellitus, which is associated with a decrease in the synthesis and transport of neurotrophins . The aim of present study was to investigate the effect of endurance training on gene expression of nerve growth factor (NGF) in the sensory spinal cord of rats with diabetic neuropathy.
Methods: Twenty eight adult male Wistar rats in the body mass range of 326.3±8.4 gr, randomly assigned in to four groups: diabetic control, diabetic training, healthy control and healthy training. For inducing diabetic neuropathy, after twelve hours of food deprivation, intraperitoneal injection of STZ solution (45 mg/Kg) method was used. Two weeks after STZ injection, the endurance training protocol was performed for six weeks and Twenty four hours after the last training session, rats were sacrificed. Gene expression of NGF in rat spinal sensory segments were measured with Real time technique. In order to determine the significant differences between groups and Interaction independent variables two way anova and LSD post hoc test were used.
Results: Endurance training, resulted in a significant increase in gene expression of NGF in the rats. Also, in compare with diabetic control, training led to significant decrease in blood glucose levels in diabetic training group.
Conclusion: Increased physical activity and exercise can strongly affect pathological factors associated with diabetic neuropathy by increasing nerve growth factor. It is recommended that for prevention of neurological complications and treatment of diseases associated with diabets exercise training could be used as a non-pharmachological treatment.

Keywords: Diabetic neuropathy, Endurance training, Nerve growth factor, Spinal cord

[*] School of Human Sciences, TarbiatModares University, Nasre Bridge, Jalal Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran, Email: ghara_re@modares.ac.ir