

اثر تمرین هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 در شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرائی نر دارای درد نوروپاتی دیابت

اکرم بتوندی^۱، احمد کاکي^{۱*}

چکیده

مقدمه: اختلال در عملکرد سلول‌های شوان توسط دیابت، عواقب گسترده‌ای بر ساختار و عملکرد اعصاب محیطی دارد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 در شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرائی نر دارای درد نوروپاتی دیابت است.

روش‌ها: ۲۴ سر موش صحرائی نر ویستار ۸ هفته‌ای (محدوده‌ی وزنی $20.4 \pm 11/3$ گرم) به‌طور تصادفی در سه گروه ($n = 8$) شامل: نوروپاتی دیابت (50 mg/kg استرپتوزوسین تزریق درون صفاقی)، نوروپاتی دیابت تمرین (30 دقیقه تمرین هوازی با شدت 15 متر در دقیقه، 5 روز در هفته به‌مدت 6 هفته)، و کنترل سالم قرار گرفتند. پس از تأیید ایجاد درد نوروپاتی دیابت توسط تست‌های رفتاری، پروتکل تمرین هوازی اجرا گردید. میزان بیان ژن‌های Nrg1 و ErbB2 با تکنیک ریل تایم اندازه‌گیری شد. آزمون آنالیز واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید.

یافته‌ها: تمرین هوازی موجب کاهش حساسیت سیستم عصبی به هایپرالژزیا حرارتی و آلودینای مکانیکی گردید. القاء دیابت باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن Nrg1 و ErbB2 شد. همچنین افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های فوق در گروه تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت وجود داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد، تمرین هوازی با افزایش بیان نوروگلین ۱ و گیرنده‌ی آن روند تخریب عصبی ناشی از دیابت را کند می‌کند. پیشنهاد می‌شود از تمرین هوازی برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش درد نوروپاتی استفاده شود.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، Nrg1، ErbB2، درد نوروپاتی دیابت

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

***نشانی:** اهواز، بزرگراه گلستان، فرهنگ شهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، گروه فیزیولوژی ورزشی، کد پستی ۶۱۳۴۹-۳۷۳۳۳۳، صندوق پستی ۱۹۱۵، تلفن: ۰۹۱۶۶۰۳۹۴۳۹-۳۹، ۳۳۴۸۳۳۶-۳۹، نامبر: ۳۳۲۹۲۰۰، پست الکترونیک: ahvaz.kaki@yahoo.com

مقدمه

نوروپاتی محیطی دیابت^۱ (DPN) آسیبی است که بر اثر هایپرگلیسمی طولانی‌مدت ناشی از دیابت در فیبرهای عصبی رخ می‌دهد. این عارضه با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی در اثر دمیلیناسیون و دژنراسیون آکسون‌ها رخ می‌دهد [۱]. مطالعات نشان داده‌اند که اولین تغییر در DPN در سطح فیبرهای حسی اتفاق می‌افتد. به طوری که حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا افزایش می‌یابد [۲]. محققین این عامل را در نتیجه‌ی اختلال در عملکرد سلول‌های نوروگلیای شوان در سیستم عصبی محیطی می‌دانند. سلول‌های شوان^۲ (SC) فراوان‌ترین سلول‌های PNS هستند که باعث تمایز، تکثیر، مهاجرت، بیان فاکتورهای نوروتروفیک و تشکیل میلین در آکسون‌ها هستند [۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که سلول‌های شوان بسیار بیشتر از یک عایق غیر فعال برای آکسون‌ها هستند. همچنین سلول‌های شوان سنسورهای حیاتی فعالیت آکسون هستند که ساختار و عملکرد سلول‌های عصبی محیطی را حفظ می‌کنند و انرژی مورد نیاز برای عملکرد آکسون را فراهم می‌کنند [۳]. عملکرد اصلی این سلول‌ها حمایت از رشد آکسون‌ها با ساختن غلاف میلین و تولید فاکتورهای نوروتروفیک است. همچنین سلول‌های شوان با تولید غشاء پایه‌ای که حاوی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن و است، می‌توانند بستر بیولوژیک مناسبی را برای پیش برد رشد آکسونی فراهم کنند، سلول‌های شوان فعال شده در سیستم عصبی محیطی، فاکتورهای رشدی که برای بازسازی آکسون‌ها لازم است را ترشح کرده و محیط مناسب برای ترمیم آکسون‌ها ایجاد می‌کنند [۳]. شواهد زیادی حاکی از آن است که دیابت بیان فاکتورهای نوروتروفیک سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های شوان را کاهش می‌دهد [۳]. نوروگلین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های پیام‌رسان بین سلولی از فاکتورهای رشد اپیدرمی^۳ هستند که با فعال‌سازی گیرنده‌های تیروزین کیناز ErbBs، مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی را که در رشد عصبی و هموستاز فعالیت مغزی نقش دارند را فعال می‌

کنند [۴] نوروگلین^۴ (Nrg1) عضوی از این خانواده فاکتور رشدی است که با فعال‌سازی گیرنده‌های ErbB4/3/2 عملکردهای بیولوژیکی مختلفی از جمله: بازسازی، تمایز سلول‌های عصبی در سیستم عصبی محیطی، شکل‌پذیری سیناپسی، انتقال عصبی، زنده ماندن سلول‌های عصبی و کاهش التهاب نقش دارد. مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در آکسون‌های PNS یک مسیر اصلی پیام‌رسان، برای بقای سلول‌های عصبی محیطی، تکثیر سلول شوان و در تقویت میلیناسیون و تنظیم ضخامت میلین ضروری است [۵]. شواهد زیادی حاکی از آن است که در افراد دیابتی مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در نتیجه هایپرگلیسمی دچار اختلال شده و این عامل منجر به از بین رفتن سلول‌های SC، دمیلینه شدن و تخریب آکسون در اعصاب پیرامونی می‌شود [۶] Zhou و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که Nrg1 برونزا از طریق افزایش فاکتور رشدی NGF و مهار سیتوکین‌های التهابی توانسته است درد نوروپاتیک دیابتی ناشی از STZ را کاهش دهد [۷]. بنابراین عاملی که بتواند مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 را تنظیم مثبت کند، احتمالاً بر تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی در اثر دمیلیناسیون و دژنراسیون آکسون که در نتیجه تخریب سلول‌های SC در دیابت رخ می‌دهد جلوگیری کرده و از این طریق در کاهش درد نوروپاتیک دیابت اثر گذار است. Xie و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند، داروی گیاهی جین مایتونگ^۵ به‌طور معنی‌داری سطح سرمی Nrg1 را در موش‌های DPN ناشی از STZ را افزایش می‌دهد و از این طریق باعث بهبود در نوروپاتی محیطی ناشی از دیابت می‌گردد [۸]. بنابراین، با توجه به نقش مهم مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در رشد سلول‌های SC و اختلال این مسیر پیام‌رسانی در DPN، عامل غیردارویی که بتواند این نقص فیزیولوژیکی را در دیابت تنظیم مثبت کند، به‌عنوان ابزار درمانی مطرح می‌شود. نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان داده است فعالیت‌های هوازی به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی با افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی، افزایش سطوح سیتوکین

⁴ Neuregulin -1(Nrg1)

⁵ Jinmaitong

¹ Diabetic Peripheral Neuropathy

² Schwann Cells

³ Epidermal growth factor

سیترات $0.05M$ با $pH: 4/5$ به صورت درون صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانس بر روی ورید دم، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) اندازه‌گیری و موش‌های صحرایی که قند خون آن‌ها بیشتر از 250mg/dl بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون، در طول دوره برنامه‌ی تمرینی هر هفته و نیز پایان دوره، قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد [۱۴].

آزمون‌های رفتاری: پیش از القاء دیابت، به منظور سازگاری جهت آزمون‌های رفتاری، حیوانات سه روز در معرض آزمایش (دو بار برای هر آزمون) قرار گرفتند. دو هفته پس از القای دیابت، آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتی به عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و برای تأیید و میزان درد نوروپاتی از تمامی گروه‌ها به عمل آمد [۱۷-۱۵]. به منظور بررسی اثرات طولانی مدت تمرین هر هفته و تا پایان پروتکل تمرین هوازی آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتی اجرا شد، برای اجتناب از عوامل مداخله‌گر نظیر اثرات ضد دردی القاء شده توسط استرس آزمون‌های رفتاری میان ساعت ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد [۱۷].

آزمون‌های پلیت: برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی (هایپرآلژزیای حرارتی) از آزمون‌های پلیت استفاده شد. این آزمون بر اساس روش والف و مک‌دونالد انجام گرفت [۱۸]. برای انجام این آزمون، از دستگاه‌های پلیت (مدل ام اچ - ۹۵۰۰ ساخت شرکت برج صنعت آزما)، که دارای یک صفحه فلزی به قطر ۱۹ سانتی‌متر و محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس ($30 \times 25 \times 25$ سانتی‌متر) استفاده شد. دستگاه مجهز به زمان سنج و ترموستات بود. شدت درجه‌ی گرمایی صفحه‌ی دستگاه در 52 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. قبل از انجام آزمون، برای آشنایی، موش‌ها به مدت ۲ دقیقه بر روی صفحه دستگاه قرار داده شد؛ سپس دستگاه روشن شد تا دمای صفحه‌ی دستگاه به دمای مورد نظر ثابت شود. حیوان بر روی صفحه داغ قرار گرفت و هم‌زمان با آن، زمان سنج دستگاه روشن شد. زمانی که حیوان شروع به لیسیدن، بالا بردن و یا لرزیدن پا کرد، به عنوان نقطه‌ی پایانی و شاخص احساس درد تلقی شد و فوراً زمان سنج متوقف

های ضد التهابی، کاهش فعالیت میکروگلیاهای نخاع، افزایش بیان نوروترنژین‌ها و کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد در سیستم عصبی توانسته است از تخریب پیشرونده‌ی نورون‌های حسی جلوگیری کند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهد [۹-۱۱]. با این حال بررسی سازوکار اثر تمرین هوازی به عنوان یک مداخله‌ی درمانی غیردارویی و غیرتهاجمی بر درد نوروپاتی ناشی از دیابت در سطح سلولی کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. لذا این سؤال مطرح می‌شود که آیا تمرین هوازی می‌تواند بر مسیر پیام‌رسانی $Nrg1/ErbB2$ در شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرایی نر دارای درد نوروپاتی دیابت اثر گذار باشد؟

روش‌ها

در پژوهش حاضر راهبرد تحقیق از نوع تجربی بود. تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌گی با محدوده‌ی وزنی $11/3 \pm 2.0$ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه و در گروه‌های چهارتایی در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد تحت چرخه‌ی ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه‌ی موش نگه داری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نوارگردان و دست‌کاری موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه ($n = 8$) نوروپاتی دیابت، نوروپاتی دیابت تمرین و سالم کنترل تقسیم شدند. در پژوهش حاضر، کلیه‌ی اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز با کد (IR.IAU.AHVZ.REC.1399.098) مورد تأیید قرار گرفت.

القاء دیابت: پس از اتمام پروتکل آشناسازی و متعاقب ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القاء دیابت با تزریق درون صفاقی محلول استروپتوزوتوسین (STZ, Sigma, St. Louis, MO)؛ حل شده در بافر سیترات $0.05M$ با $pH: 4/5$ ، 50 میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌منظور ایجاد دیابت نوع یک صورت گرفت [۱۲، ۱۳]. به موش‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر

و حیوان از دستگاه خارج می‌شد. مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw withdrawal latency) و یا فاصله زمانی شروع قرار گرفتن حیوان بر روی صفحه‌ی داغ تا پیدایش پاسخ به درد توسط حیوان، در سه مرحله و به فاصله‌ی زمانی ۵ دقیقه در گروه‌های مختلف بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد و میانگین آنها به‌عنوان زمان تأخیر ثبت گردید. زمان عدم واکنش حیوان به صفحه داغ ۳۰ ثانیه (Cut of time) در نظر گرفته شد.

آزمون آلودینبای مکانیکی: به‌منظور اندازه‌گیری، حیوان روی یک شبکه‌ی سیمی و داخل یک محفظه‌ی پلکسی‌گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه‌ی مشبک قرار گرفتند. در ادامه به‌منظور سنجش آلودینبای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Frey محدودی ۲ تا ۶۰ گرم (۶۰، ۲۶، ۱۵، ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲) ساخت شرکت Stoelting Inc جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع می‌شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به‌ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده می‌گردید. همچنین چنانچه دو بار متوالی پاسخ (بلندکردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به‌عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه^۱ (PWT) ثبت و آزمون خاتمه می‌یافت. در مقابل، اگر حیوان به هیچ یک از تارها از جمله تار شماره ۶۰ پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه‌ی پاسخ در نظر گرفته می‌شد. هر آزمایش سه بار و به‌تناوب حداقل سه دقیقه تکرار و میانگین آنها به‌عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه منظور می‌شد [۱۹].

پروتکل تمرین هوازی: پس از اطمینان از حصول نوروپاتی دیابت در موش‌های صحرایی نر، پروتکل تمرین هوازی به‌مدت شش هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر پروتکل تمرین هوازی بر اساس مطالعه‌ی Chae و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت؛ ابتدا به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دست‌کاری حیوانات ۵ روز در هفته به‌مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بروی نوار گردان راه رفتند. سپس گروه ورزشی

نوروپاتی دیابت تمرین در معرض تمرین نوارگردان، ۵ جلسه در هفته و به‌مدت ۶ هفته قرار گرفت [۲۰]. سرعت و مدت تمرین نوارگردان هر هفته به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در هفته‌ی اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته‌ی دوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته‌ی سوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته‌ی چهارم و ۱۷ تا ۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته‌ی پنجم و ششم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته‌ی ششم) ثابت نگه‌داشته شد. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶-۱۸ عصر برگزار شد.

استخراج نمونه و روش اندازه‌گیری: در پایان شش هفته برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، تحت شرایط استریل و مطابق روش گلدرد و چوپین سال ۱۹۷۷ [۲۱] فوری قطعه نخاعی حاوی بخش خلفی نخاع از سطح L4 تا L6، که سگمنت‌های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه‌ی مهره‌های T13-L1 ستون فقرات است، ابتدا ناحیه‌ی مورد نظر مشخص و با برش در پائین‌ترین بخش ممکن از ستون فقرات جدا شد. سپس ستون فقرات با استفاده از کانال مرکزی به‌عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه را به عنوان نمونه، در نیتروژن ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های ملکولی در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگاه‌داری شدند.

ریل تایم (Real Time-PCR): حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت نخاع جهت استخراج RNA کل به نسبت ۱ به ۱۰ با استفاده از کیت QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول در دمای ۴ سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با

¹ Paw withdrawal threshold

تیروزین کیناز ErbB2 به صورت کمی استفاده شد، هر واکنش PCR با استفاده از دستگاه (Applied PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه‌ی Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه‌ی آستانه (- Threshold Cycle) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول $R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

محلول کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت یک به نیم با محلول ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در محلول اتانول شستشو و در ۲۰ Lμ آب RNase-free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد طبق شرکت (Eppendorf - Germany) و به نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تلخیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA تک رشته‌ای از پرایمر (Oligo dt MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. از تکنیک RT-qPCR جهت تأیید بیان ژن Nrg1 و گیرنده‌ی

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Gens	Primer sequence
Nrg1	For: 5'- GAGATGTGGAAATGGCAGAGGA-3'
	Rev: 5'- GAGAAGATGATGTGAGTGTGAGG-3'
ErbB2	For: 5'- CTCTGAGAAATGATGGCGAGGA-3'
	Rev: 5'- GGGAAAGATGGGATGGTTTATGT-3'
GAPDH	For: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'
	Rev: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTAGT-3'

یافته‌ها

نتایج نشان داد که وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت، اما در هفته‌های پایانی پژوهش، میانگین تغییرات وزن موش‌های گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری کمتر بود ($P < 0.05$). همچنین، میانگین تغییرات وزن گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت، در هفته هشتم افزایش معنادار داشتند ($P < 0.05$) (جدول ۲).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف^۱ استفاده شد. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت معنی داری، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌های دو گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-22 در سطح معنی داری ۰/۵ ($P < 0.05$) انجام شد.

¹ Kolmogorov-Smirnov test

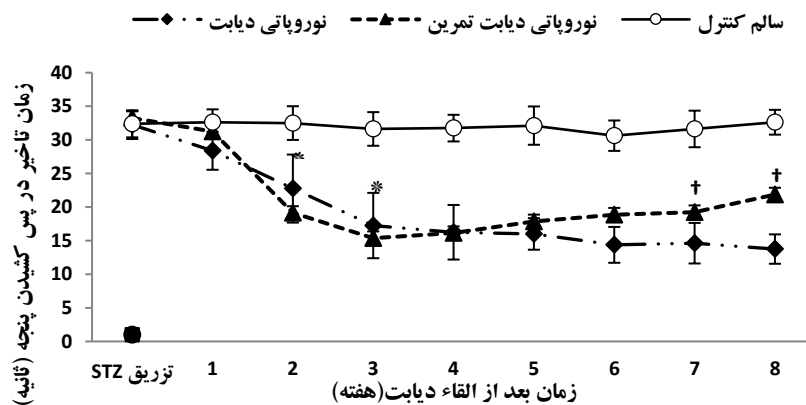
جدول ۲- میانگین و انحراف معیار وزن بدن و سطح گلوکز خون در موش‌های گروه‌های مختلف

متغیر	گروه‌ها			
	نوروپاتی دیابت	نوروپاتی دیابت تمرین	کنترل سالم	
	(n = ۸)	(n = ۸)	(n = ۸)	
وزن (گرم)	القا دیابت	۲۰۵/۴±۱۳/۱	۲۱۰/۶±۹/۶	۲۰۶/۸±۱۱/۴
	هفته‌ی دوم	۱۹۸/۰±۱۰/۲	۲۰۳/۳±۸/۷	۲۱۴/۶±۱۱/۱
	هفته‌ی چهارم	۱۸۵/۵±۱۰/۴*	۱۸۷/۴±۶/۹*	۲۲۹/۳±۹/۱
	هفته‌ی ششم	۱۶۰/۱±۸/۱*	۱۸۶/۰±۶/۴*	۲۴۲/۸±۸/۱
	هفته‌ی هشتم	۱۴۱/۰±۷/۴*	۲۱۰/۴±۹/۸†	۲۵۸/۵±۹/۸
	القا دیابت	۴۲۱/۹±۱۱۳/۱*	۴۹۵/۱±۷۱/۶*	۱۰۶/۸±۱۳/۸
	هفته‌ی دوم	۴۶۵/۴±۸۱/۱*	۵۲۲/۴±۵۷/۹*	۱۰۸/۱±۱۳/۸
	هفته‌ی چهارم	۵۱۵/۹±۶۱/۳*	۵۲۲/۴±۳۴/۸*	۱۰۲/۱±۱۴/۱
گلوکز خون (میلی گرم/دسی لیتر)	هفته‌ی ششم	۵۶۳/۴±۴۱/۰*	۴۳۴/۵±۵۵/۱*	۱۰۱/۶±۱۳/۳
	هفته‌ی هشتم	۶۰۱/۹±۲۴/۱*	۳۵۵/۳±۶۰/۸†*	۱۰۴/۳±۱۷/۷

کلیه‌ی مقادیر جدول به‌صورت انحراف استاندارد ± میانگین است. *اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). †اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

میانگین مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw withdrawal latency) در آزمون‌های پلیم دو هفته پس از القا دیابت در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<0.05). همچنین در هفته‌های پایانی اجرای پروتکل تمرین هوازی، میانگین مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون‌های پیرالژزیای حرارتی در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<0.05) (نمودار ۱).

پس از القاء دیابت، سطوح گلوکز خون به‌صورت معناداری در گروه‌های نوروپاتی دیابت افزایش یافت (P<0.05)، و این اختلاف تا پایان دوره پژوهش در مقایسه با گروه کنترل سالم همچنان معنادار بود (P<0.05)، همچنین، در پایان برنامه‌ی تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به‌صورت معناداری پایین‌تر بود (P<0.05) ولی با این حال همچنان اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل سالم وجود داشت (جدول ۲).

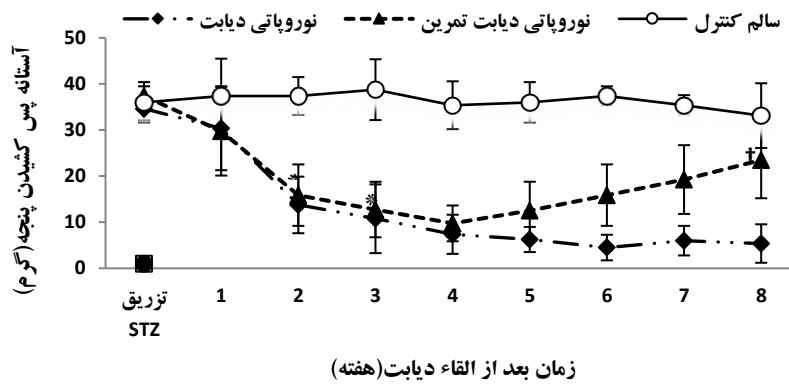


نمودار ۱- تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون‌های پیرالژزیای حرارتی گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه نوروپاتی دیابت تمرین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت داشتند ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

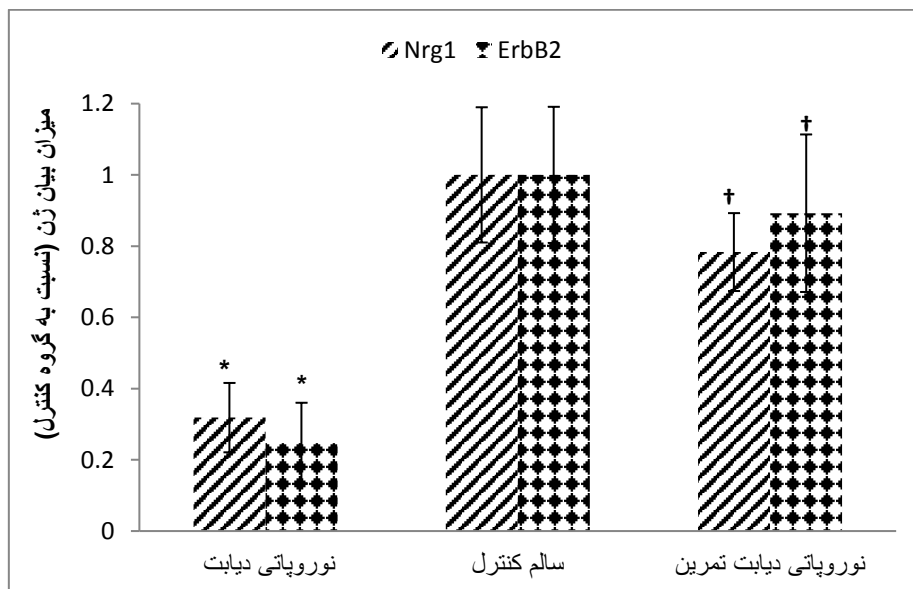
دو هفته بعد از القاء دیابت، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). از طرفی در هفته‌های پایانی اجرای پروتکل، میانگین تغییرات



نمودار ۲- تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی گروه‌های مختلف * اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

ErbB2 در گروه نوروپاتی دیابت تمرین به‌طور معناداری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت بالاتر بود ($P < 0.05$). از طرفی بین گروه‌های نوروپاتی دیابت تمرین و گروه سالم کنترل تفاوت وجود داشت ولی معنی‌دار نبود ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

باتوجه به میانگین گروه‌ها، مشخص شد که القاء دیابت موجب کاهش معنادار در میزان بیان ژن‌های ErbB2 و Nrg1 در بخش خلفی نخاع موش‌های نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه سالم کنترل شد ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان ژن‌های Nrg1 و



نمودار ۳- میزان بیان ژن Nrg1 و ErbB2 در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف * اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر تمرین هوازی بر مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرایی نر دارای درد نوروپاتی دیابت است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی استریتوزوسین باعث تخریب سلول‌های بتای پانکراس و هایپرگلیسمی مزمن در موش‌های صحرایی می‌شود به طوری که سطوح گلوکز خون در گروه دیابتی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود. همچنین نتایج نشان داد که دو هفته بعد از تزریق STZ، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرالژزیا حرارتی) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش یافته بود. تحقیقات متعددی این موضوع را مورد تأیید و نشان داده‌اند که افزایش حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا در اندام‌های محیطی، نشان بر اختلال عملکرد ساختار فیبرهای حسی شامل آتروفی آکسونی و یا میلین زدایی در نتیجه هایپرگلیسمی مزمن است [۲۲، ۲۳]. اگر چه سازوکارهایی که منجر به این گونه اختلالات عصبی در نوروپاتی دیابت می‌شوند به طور کامل درک نشده‌اند، با این وجود در طی سال‌های گذشته، آزمایش‌های حیوانی و مطالعات In Vitro نشان داده‌اند که به دنبال DPN روند فساد والرین^۱ در قطعه‌های آکسون‌های دیستال و غلاف میلین آنها در PNS به وجود می‌آید [۲۴]. در این عارضه، سلول‌های شوان ساکن در قطعه‌ی انتهایی عصب آسیب دیده، وارد روند تکثیر شده و از طریق جذب ماکروفاژهای خونی به محل جراحت سبب پاکسازی بقایای سلولی و میلین ناشی از این تحلیل می‌شوند [۵]. سلول‌های شوان همچنین با ترشح انواع فاکتورهای نوروتروفیک مانند BDNF، NGF، NT-3، GDNF و ساخت مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی، تنظیم پاسخ ایمنی و میلیناسیون آکسون‌های جدید، سبب پیشبرد روند ترمیم اعصاب محیطی و بازیابی عملکردی در DPN می‌شوند [۲۵]. محققین بر این باورند که مسیرهای پیام‌رسانی متعددی در سلول‌های شوان وجود دارند که برای تکثیر سلول‌های شوان، تقویت میلیناسیون،

تنظیم ضخامت میلین و افزایش قطر آکسون ضروری هستند که با هایپرگلیسمی و هیپوانسولینمی مزمن این مسیرهای سیگنالینگ مهار می‌شوند [۲۶]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در سلول‌های شوان یک مسیر اصلی پیام‌رسان است که بسیاری از جنبه‌های عملکرد آکسون را تنظیم می‌کنند و در نتیجه دیابت دستخوش تغییر می‌گردد [۲۷]. مطالعه‌ی حاضر این موضوع را مورد تأیید قرار داد و نشان داد که میزان بیان ژن فاکتور رشد Nrg1 و گیرنده‌ی تیروزین کیناز ErbB2 در نورون‌های حسی بخش خلفی نخاع موش‌های دیابتی القاء شده با STZ کمتر از گروه کنترل سالم بود. محققین اختلال در مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 را عامل اصلی در تخریب آکسون و از بین بردن سلول‌های شوان در DPN می‌دانند [۶]. با این وجود سازوکار دقیقی که در DPN باعث مهار این مسیر پیام‌رسانی می‌شود به روشنی مشخص نشده است، اما تصور بر این است که نوروتوکسیسیته ناشی از غلظت طولانی مدت گلوکز در فیبرهای عصبی محیطی باعث افزایش بی‌رویه گلیکولیز بی‌هوازی در سلول‌های شوان و کاهش دیگر مسیرهای متابولیکی شده که این عوامل اختلال عملکرد میتوکندری‌ها، آسیب عروقی، کاهش فاکتورهای نوروتروفیک، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و هیپوکسی را به دنبال دارد [۲]. این احتمال وجود دارد که عوامل فوق باعث تنظیم منفی در مولکول‌های مسیر سیگنالینگ سلول‌های شوان شده باشند. بنابراین با توجه به نقش مهم مسیر سیگنالینگ Nrg1/ErbB2 در عملکرد سلول‌های SC در سیستم عصبی محیطی و اثرگذاری عوامل ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی بر این مسیر پیام‌رسانی، در این تحقیق اثر فعالیت هوازی را بر این مسیر سیگنالینگ مورد بررسی قرار دادیم. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، اجرای شش هفته تمرین هوازی با شدت متوسط بر موش‌های دیابتی القاء شده با STZ میزان بیان ژن‌های Nrg1 و ErbB2 در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی بیشتر بود. بنابراین داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که تمرین هوازی، مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 را تنظیم مثبت کرده و در نتیجه آن

¹ Wallerian degeneration

مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 ناشی از دیابت را تنظیم مثبت کرده و باعث رشد و تمایز سلول‌های شوان، تقویت میلیناسیون و افزایش قطر آکسون شده و از تخریب پیشرونده‌ی نرون‌های حسی جلوگیری کرده و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش داده است. با این حال، عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئین به‌جای اندازه‌گیری بیان ژن‌های Nrg1 و ErbB2 در پژوهش حاضر به‌عنوان یک محدودیت از بحث دقیق در این زمینه جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که القاء دیابت ناشی از استرپتوزوسین باعث مهار مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 در بخش حسی نخاع شده و این عامل منجر به افزایش حساسیت گیرنده‌های درد می‌شود. با این حال شش هفته تمرین هوازی توانسته است این مسیر سیگنالینگ را تنظیم مثبت و حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک را کاهش دهد؛ لذا پیشنهاد می‌شود با توجه به اینکه درد نوروپاتی یک دیابت به‌شدت کیفیت زندگی فرد را مختل می‌کند و نیز با توجه به عدم کارایی قطعی روش‌های فارماکولوژی معمول که دارای عوارض جانبی زیادی هستند، تغییر سبک زندگی روزانه به شکل فعالیت منظم هوازی ممکن است به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماران درد نوروپاتی دیابت مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر برگرفته از یافته‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم اکرم بتوندی دانشجوی رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی گرایش تغذیه ورزشی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز است. کلیه هزینه‌های این طرح شخصی تأمین شده است.

باعث افزایش نسخه برداری از ژن‌هایی می‌شود که در فرآیند ترمیم یا بازتولید یا جایگزینی بافت‌های ازدست رفته یا آسیب دیده‌ی عصبی در نتیجه هایپرگلیسمی، از طریق نوسازی طبیعی آکسون نرون‌های عصبی نقش دارند. از طرفی، در پاسخ به فعالیت‌های هوازی، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرآلژیا حرارتی) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت کاهش یافت بود. به‌نظر می‌رسد که تمرین هوازی از طریق فعال کردن مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 پتانسیل درمانی مؤثر در مقابل درد نوروپاتی ناشی از دیابت باشد. در طی پژوهش‌های گذشته، چندین سازوکار مانند بهبود آنژیوژنز، کاهش آپوپتوز، افزایش بیان نروتروفین‌ها، مهار سایتوکین‌های التهابی برای توضیح اثرات محافظتی سیستم عصبی توسط تمرین‌های هوازی پیشنهاد شده است [۲۹، ۲۸، ۹]. ولی هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ی، نقش فعالیت هوازی را بر مسیرهای سیگنالینگ رشد و تمایز سلول‌های شوان در سیستم عصبی محیطی بررسی نکرده است. بنابراین با توجه نقش مهم مسیر پیام‌رسانی Nrg1/ErbB2 در رشد سلول‌های SC و اثر گذاری داروهای ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی بر این مسیر، همچنین حساسیت بالای سلول‌های شوان به غلظت گلوکز و انسولین و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی تحت هایپرگلیسمی شامل استرس اکسیداتیو، واکنش‌های التهابی، استرس اکسیداتیو شبکه‌ی آندوپلاسمی، اتوفازی و سایر مسیرهای سیگنالینگ دخیل در DPN، [۶] این احتمال وجود دارد که تمرین هوازی از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ رشد در سلول‌های شوان، افزایش انواع فاکتورهای نورتروفیک مربوط به باسازی اعصاب، کاهش نشانگرهای آپوپتوزی در اعصاب محیطی، افزایش بیان پروتئین‌های میلین‌ساز، کاهش سطح استرس اکسیداتیو در سلول‌های شوان، کنترل قند خون، ترمیم غشاهای میتوکندری‌های آسیب دیده در سلول‌های عصبی، بهبود آنژیوژنز و کاهش هیپوکسی نرونی توانسته است اختلال

مآخذ

- Dewanjee S, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *European journal of pharmacology* 2018; 833: 472-523.
- Feldman EL, et al. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron* 2017; 93(6):1296-1313.
- Gonçalves NP, et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. *Nature Reviews Neurology* 2017. 13(3): p. 135-147.
- Mei L and Nave KA. Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron* 2014; 83(1): p. 27-49.
- Fledrich R, et al. NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nature communications* 2019; 10(1): 1-17.
- Pan P and Dobrowsky RT. Differential expression of neuregulin-1 isoforms and downregulation of erbin are associated with Erb B2 receptor activation in diabetic peripheral neuropathy. *Acta neuropathologica communications* 2013; 1(1): 1-12.
- Zhou F, et al. Exogenous neuregulin-1 attenuates STZ-induced diabetic peripheral neuropathic pain in rats1. *Acta cirurgica brasileira* 2017; 32: 28-37.
- Xie J, et al. Jinmaitong ameliorates diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by modulating gut microbiota and neuregulin 1. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(17): 17436.
- Mee-Inta O, Zhao ZW, and Kuo YM. Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation. *Cells* 2019; 8(7): 691.
- Yoo M, et al. Painful diabetic peripheral neuropathy: presentations, mechanisms, and exercise therapy. *Journal of diabetes & metabolism* 2013.
- Froozandeh E, Tofighi A, and Tolouei Azar J. The Effect of 8 Weeks of Resistance and Aerobic Interval Training on Levels of GLP-1, NRG-1 and IL-33 in Type 2 Diabetic Women. *Sport Physiology* 2020; 12(46): 117-138.
- Yan Je, et al. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. *Neuroscience letters* 2012; 526(1): 54-58.
- Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Current protocols in neuroscience* 2004; 29(1): 9.18. 1-9.18. 11.
- Wei M, et al. The streptozotocin- diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung & Circulation* 2003; 12(1): 44-50.
- Malmberg AB and Bannan AW. Models of nociception: hot- plate, tail- flick, and formalin tests in rodents. *Current protocols in neuroscience* 1999; 6(1): 8.9. 1-8.9. 15.
- Chen YW et al. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesthesia & Analgesia* 2013; 116(2): 482-490.
- Yoon H, et al. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Experimental neurology* 2015; 267: 107-114.
- Rossi DM, Valenti VE, and Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clinics* 2011; 66(9): 1615-1619.
- Gong YH, et al. Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2011; 49(1): 16-20.
- Chae CH, et al. 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. *Journal of physiology and biochemistry* 2011; 67(2): 235-241.
- Gelderd JB. and Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *The Anatomical Record* 1977; 188(1): 45-47.
- Kishore L, Kaur N, and Singh R. Effect of Kaempferol isolated from seeds of *Eruca sativa* on changes of pain sensitivity in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology* 2018; 26(4): 993-1003.
- Bestall SM, et al. Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *Journal of cell science* 2018; 131(14).
- Guertin AD, et al. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *Journal of neuroscience* 2005; 25(13): 3478-3487.
- Eckersley L. Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *International review of neurobiology* 2002; 50: 293-321.
- Liu Yp, Shao Sj, and Guo Hd. Schwann cells apoptosis is induced by high glucose in diabetic peripheral neuropathy. *Life sciences* 2020; 248: 117459.
- Newbern J and Birchmeier C. *Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. in Seminars in cell & developmental biology.* 2010. Elsevier.
- Sharma NK, et al. Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin-3 synthesis in an animal model of chronic widespread pain. *Physical therapy* 2010. 90(5): 714-725.
- Chen YW, et al. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesthesia & Analgesia* 2012; 114(6): 1330-1337.

The Effect of Aerobic Exercise on Nrg1/ErbB2 Signaling Pathway In Male Rats with Diabetic Neuropathic Pain

Akram Batvandi¹, Ahmad Kaki^{1*}

1. Department Of Physical Education, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

ABSTRACT

Background: Dysfunction of Schwann cells by diabetes has far-reaching consequences for the structure and function of peripheral nerves. The aim of the present study was to evaluate the effect of aerobic exercise on the Nrg1 / ErbB2 signaling pathway in male rats with diabetic neuropathic pain.

Methods: Twenty-four 8-week-old male Wistar rats (weight range 204 ± 11.3 g) were randomly divided into three groups (n = 8) including: Diabetic neuropathy (50 mg / kg streptozotocin injection), Diabetic neuropathy Exercise (30 minutes exercise aerobics intensity 15 m/min, 5 days per week for 6 weeks), and healthy controls. After confirmation of diabetic neuropathic pain by behavioral tests, aerobic exercise protocol was performed. The expression of Nrg1 / ErbB2 genes was measured by real-time technique. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis.

Results: Aerobic exercise reduced the nervous system's sensitivity to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Induction of diabetes significantly reduced Nrg1 and ErbB2 gene expression. There was also a significant increase in the expression of the above genes in the exercise group compared to the diabetic neuropathy group ($P < 0.05$).

Conclusion: It seems that aerobic exercise is effective in increasing the nerve repair process by activating growth signaling pathways in Schwann cells. It is recommended that aerobic exercise be used for diabetics to reduce neuropathic pain.

Keywords: Aerobic Exercise, Nrg1, ErbB2, Diabetic Neuropathic Pain

* Golestan Highway, Islamic Azad University, Ahvaz Branch, Department of Sports Physiology, Farhangshahr, Ahvaz, Iran. Postal Code 373333-61349, Tel: +989166039439, +98393348336, Fax: 3329200, E-mail: ahvaz.kaki@yahoo.com

