فیزیولوژی ورزشی شماره ۲۸، زمستان ۱۳۹۴. صص ۱۴۶-۱۳۱

تأثیر دیابت و تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در بخش حسی نخاع موش‌های صحرایی

رسول اسلامی[۱]، غزاله سرخ کمان‌زاده[۲]، رضا قراخانلو[۳]، عبدالرضا کاظمی[۴]، عبدالعلی بنایی‌فر[۵]

۱. استادیار دانشگاه علامه طباطبایی*
۲. کارشناس ارشد دانشگاه آزاد کرمان
۳. دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۴. استادیار دانشگاه ولی عصر رفسنجان
۵. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۹

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن عامل تغذیهٔ عصبی مشتق از مغز (BDNF) در ریشه‌های حسی عصب سیاتیک موش‌های صحرایی دارای نوروپاتی دیابت بود. ۲۸ سر رت از نژاد ویستار با میانگین تودهٔ بدنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم به‌طور تصادفی در چهار گروه دیابت کنترل، دیابت تمرین، سالم کنترل و سالم تمرین قرار گرفتند. جهت القای نوروپاتی دیابت، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، از روش تزریق درون صفاقی محلول STZ (45 mg/kg) استفاده گردید. دو هفته پس از تزریق STZ، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌مدت شش هفته انجام گشت و ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی، حیوانات تشریح شدند. بیان ژن BDNF با استفاده از تکنیک Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کورسکال والیس و یو من ویتنی استفاده شد (P≤0.05). نتایج نشان داد که دیابت باعث کاهش ۱۰ برابری در بیان ژن BDNF در بخش حسی عصب سیاتیک شده است. بااین‌حال، شش هفته تمرین استقامتی توانست این کاهش بیان BDNF ناشی از دیابت را تاحدودی جبران کند (P=0.043). پژوهش حاضر نشان داد که دیابت می‌تواند باعث کاهش بیان BDNF در ریشه‌های حسی عصب سیاتیک گردد که تاحدودی با تمرین استقامتی قابل‌جبران است. درمجموع، نتایج این پژوهش می‌تواند نقطهٔ روشنی بر اثبات فرضیهٔ کاهش حمایت نروتروفیکی در نوروپاتی دیابت باشد.

واژگان کلیدی: نوروپاتی دیابت، تمرین ورزشی، عامل تغذیهٔ عصبی مشتق از مغز، نخاع شوکی

* نویسنده مسئول Email: Eslami.rasul@gmail.com

مقدمه

نروپاتی دیابت[1]، از شایع‌ترین عوارض دیابت است که در ۶۰٪ بیماران دیابتی اتفاق می‌افتد (۱). اگرچه مکانیسم‌های آسیب‌شناختی نروپاتی دیابت به‌طور کامل روشن نیست، بااین‌حال این بیماری با تباهی سلول‌های شووان و تارهای نورونی میلین‌دار و نیز کاهش جمعیت‌های نورونی همراه است (۲). این نشانگرهای تباهی نورونی، پژوهشگران را به سمت پژوهش درمورد تأثیر عوامل رشدی به‌عنوان روشی بالقوه در درمان نوروپاتی دیابت سوق داده است (۳). خانوادهٔ نوروتروفین از جمله این عوامل رشدی است که از نقش بسیار زیادی در احیا و حفاظت عصبی برخوردار است. نوروتروفین‌ها برای شکل‌گیری و عملکرد سیستم عصبی محیطی حیاتی بوده و کاهش سیگنالینگ آن‌ها باعث تأثیرات مخربی خواهد شد (۳). این احتمال وجود دارد که در نتیجهٔ آسیب به نورون‌ها و سلول‌های شووان در حالت دیابت، تغییراتی در سطوح بیان و سنتز عوامل رشدی در سیستم عصبی محیطی اتفاق بیافتد (۳). تغییر بیان فاکتور رشد عصبی[2](NGF) در حالت دیابت مشاهده شده است. در رت‌هایی که با تزریق[3]STZ دیابتی شده بودند، سطوح NGF در ارگان‌های عصب‌رسانی‌شده توسط سیستم عصبی سمپاتیک کاهش یافت (۴). به‌علاوه، کاهش تولید NGF در موش‌هایی مشاهده شد که به‌لحاظ ژنتیکی دارای دیابت بودند (۵). هرچند، بیشتر پژوهش‌ها در زمینهٔ تغییرات فاکتورهای رشدی در حالت دیابت مربوط به NGF می‌باشد، بااین‌حال، عامل تغذیهٔ عصبی مشتق از مغز[4](BDNF) نیز از تأثیرات بالقوهٔ بسیاری در احیا، رشد و حفظ جمعیت‌های نورونی برخوردار است (۶،۷). در مقایسه با NGF، BDNF از نورون‌های حسی بیشتری محافظت می‌کند (۳). به‌علاوه، BDNF در بقا و رشد نورون‌های حرکتی نیز نقش مهمی دارد که بر نقش تغذیه‌ای گسترده‌تر آن نسبت به NGF اشاره دارد (۳).

بااین‌حال، اطلاعات کمتری درمورد BDNF در شرایط دیابت وجود دارد. بعد از آسیب عصب سیاتیک که با شرایط انحطاط اعصاب محیطی اتفاق‌افتاده در دیابت مشابه است، سطح BDNF در گانگالیون‌های ریشهٔ خلفی (DRG) رت‌های بالغ افزایش یافت (۸). همچنین، در رت‌های تغذیه شده با گالاکتوز، که آتروفی آکسونی مشابه‌ای با مدل STZ ایجاد می‌کند، افزایش سطوح پروتئینBDNF در اعصاب محیطی و عضلات آن‌ها مشاهده شد (۹). به‌علاوه، سطوح BDNF در اعصاب بیماران دیابتی که دارای پاتولوژی آکسون افزایش یافت بودند. درحالی‌که سطوح گیرندهٔ تیروزین کیناز (TrkB) در آن‌ها کاهش یافت (۱۰)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد که تنظیم مثبت بیان ژن BDNF ممکن است پاسخی

1. Diabetic neuropathy
2. Nerve growth factor (NGF)
3. Streptozotocin (STZ)
4. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

جبرانی نسبت به کاهش گیرندهٔ آن در جهت بازسازی سیگنالینگ تغذیه‌ای باشد (۱۱). اگرچه، تغییرات پروتئینی BDNF در دیابت و شرایطی مشابه با آن موردبررسی قرار گرفته است، بااین‌حال، اطلاعاتی از بیان ژن این پروتئین به‌دنبال نروپاتی دیابت دردسترس نیست. ازطرفی، کاهش بیان ژن BDNF در بیماری‌هایی مانند آلزایمر و ALS دیده شده است که آن‌ها نیز اساس عصب‌زدایی دارند (۱۲)؛ ازاین‌رو، مطالعهٔ تغییرات بیان BDNF در شرایط دیابت برای تعیین رفتار این عامل رشدی، امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

ازسوی‌دیگر، تمرین ورزشی به‌عنوان مدلی برای مطالعهٔ نروتروفین‌های مشتق از عصب، از توانایی عالی برخوردار است. هم‌چنان‌که در اکثر موارد مشخص شده است که بیان BDNF mRNA به‌دنبال تمرین ورزش در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، در شیوهای مرتبط با حجم تمرین افزایش می‌یابد (۱۷-۱۳). همچنین، افزایش بسیار زیاد بیان BDNF در سراسر سیستم عصبی، متناسب با مسافت پیموده‌شده توسط حیوانات، به‌طور متناوب به‌دنبال دویدن اختیاری بر روی چرخ دوار دیده شده است (۱۸،۱۹)؛ بنابراین، این احتمال وجود دارد که مقادیر BDNF mRNA در دو شرایط دیابت و تمرین ورزشی (به‌شکل استقامتی) دچار تغییر شود؛ ازاین‌رو، این مطالعه می‌تواند اطلاعات سودمندی در این زمینه فراهم آورد.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده و به منظور انجام آن، ۲۸ سر موش صحرایی نر ویستار با ۱۰ هفته سن و میانگین وزنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم از انستیتو رازی خریداری شد. قبل از شروع فرایند پژوهش، مجوز کار با حیوانات از کمیتهٔ اخلاقی دانشگاه تربیت مدرس دریافت شد. کلیهٔ حیوانات در شرایط کنترل‌شدهٔ محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، چرخهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژهٔ موش نگهداری شدند. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به میانگین وزنی ۸/۴±۳۲۶/۳ گرم (۲۰)، حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه هفت‌تایی دیابت تمرین‌کرده، گروه دیابت کنترل، گروه سالم تمرین‌کرده و گروه سالم کنترل تقسیم شدند. در طول مرحلهٔ آشناسازی، به‌منظور سازگارشدن با شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دست‌کاری، حیوانات پنج روز در هفته به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند.

نحوهٔ القای دیابت توسط STZ: پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ 45 mg/Kg حل‌شده در بافر سیترات تازه 0.5 mol/L، PH: 4.5) دیابت القا گردید (۲۱) . به حیوانات غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ۴۸ 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 توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قندخون آن‌ها بالاتر از 300 mg/dL بود، به‌عنوان حیوانات دیابتی وارد مطالعهٔ حاضر شدند (۲۰). لازم‌به‌ذکر است که در پژوهش حاضر پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه علائم ناشی از تزریق اشتباه نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید و دو هفته پس از القای دیابت، پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت شش هفته انجام شد و تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار گشت (۲۲).

در پژوهش حاضر، از شدت تمرینی متوسط (٪۵۰-۵۵ اکسیژن مصرفی بیشینه) و درعین‌حال، کارامد از لحاظ فیزیولوژیک (۲۲) استفاده گردید. بدین‌صورت که گروه‌های ورزشی به‌مدت شش هفته در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و با تواتر سه روز تمرین و یک روز استراحت قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به‌تدریج افزایش یافت که برنامهٔ آن در جدول۱ نمایش داده شده است. جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفتهٔ پایانی ثابت نگه داشته شدند (۲۲). همچنین، از هیچ‌گونه شوک تمرینی در طول برنامهٔ تمرین استقامتی استفاده نگردید و درصورت لزوم، با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات وادار به ادامهٔ تمرین گردیدند.

جدول۱ـ برنامهٔ تمرین استقامتی

متغیرهای تمرین	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهام	هفتهٔ پنجم	هفتهٔ ششم
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵-۱۴	۱۵-۱۴	۱۸-۱۷	۱۸-۱۷
مدت (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰

برای استخراج بافت، در پایان شش هفته برنامهٔ تمرینی، ۱۲ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین[1](30-50 mg/kg w) و زایلازین[2](3-5mg/kg w) بیهوش شدند (۲۳) و تحت شرایط استریل، بخش حسی سگمنت‌های نخاعی L4، L5 و L6 جدا شد. استخراج بافت‌ها با نظارت کارشناس ارشد آناتومی صورت گرفت. ابتدا، ناحیهٔ موردنظر مشخص گشت و به‌دقت از ستون فقرات جدا شد. سپس، بخش خلفی و قدامی مشخص گردید و بعد از آن، نخاع از ستون فقرات بیرون کشیده شد و قسمت حسی از حرکتی جدا گشت. بافت موردنظر، بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و این نمونه تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر $-80^{\circ}c$ منجمد و نگهداری گردید.

به‌منظور استخراج RNA و سنتز cDNA، حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع به‌صورت جداگانه جهت استخراج total RNA به نسبت یک به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در $4^{0}C$، min10، g12000 سانتریفوژ شد. سپس، به نسبت یک به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط گشته و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در چهار درجه سانتی‌گراد، min15، g12000 سانتریفوژ گشته و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت یک به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط گشت و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها گردید و سپس در چهار درجه سانتی‌گراد، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو داده شد و در Lµ20 آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA موردسنجش واقع شد (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا دو به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از gµ1 از RNA و با ستفاده از Random hexamer primer و آنزیم Transcriptase Mmulv Reverse انجام گرفت.

اندازه‌گیری سطوح بیان NGF mRNA با روش کمی Real time-PCR و با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lµ20 انجام شد و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های BDNF و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول۲ گزارش شده است (از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید). برنامهٔ دمایی مورداستفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه،

1. Ketamine
2. Xylazine

۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه به‌مدت یک۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ اندازه‌گیری شد.

همچنین، برای تأیید نتایج ریل تایم نیز بخشی از مسترمیکس از طریق PCR اجراء شد. سپس، محصول بر روی ژل آگاروز برده می‌شد و در صورت نیاز نیز محصول برای تعیین توالی به آزمایشگاه مربوطه فرستاده می‌شد.

جدول۲ـ توالی پرایمرهای مورداستفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence	Product size	Gene Bank
BDNF	For: 5′- CGACGTCCCTGGCTGACACTTTT -3′ Rev: 5′- GTAAGGGCCCGAACATACGATTGG-3′	491bp	NM_012513.3
GAPDH	For: 5′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3′ Rev: 5′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT -3′	92bp	NM_017008

آزمون های رفتاری آلودنیای مکانیکی و هایپر آلژزیای حرارتی: برای اطمینان از وجود نروپاتی در حیوانات دیابتی، آزمون‌های آلودنیای مکانیکی و هایپر آلژزیای حرارتی از گروه‌های دیابت کنترل و دیابت تمرین به‌عمل آمد. هایپرآلژزیای حرارتی با استفاده از روش هارگریوز[1] و همکاران (۱۹۹۸) مورد سنجش قرار گرفت (۲۴). به‌طورخلاصه، 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 صفحهٔ پلکسی گلاس تمیز قرار می‌گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه‌جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار می‌گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال می‌شد و با کشیدن پا، تابش نور قطع شده و تایمر متوقف می‌گردید و با ثبت زمان تأخیر در پس‌کشیدن پنجه Paw Withdrawal Latency (PWL)، میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب‌رسان حرارتی مورد سنجش قرار می‌گرفت. هر پا به‌طور متناوب و با فواصل پنج تا ۱۰ دقیقه برای سه بار آزمایش می شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان آستانهٔ درد حرارتی ثبت می‌گردید. همچنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. درنهایت، پردردی حرارتی به‌عنوان درصد حداکثر اثر ممکن با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌گردید:

1. hargrivese

((تأخیر پایه ـ زمان cut off)/ (تأخیر پایه ـ تأخیر پس از تزریق استرپتوزین) ×۱۰۰) = %MPE.

به‌علاوه، میانگین سه اندازه‌گیری اولیه به‌عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد (۲۵).

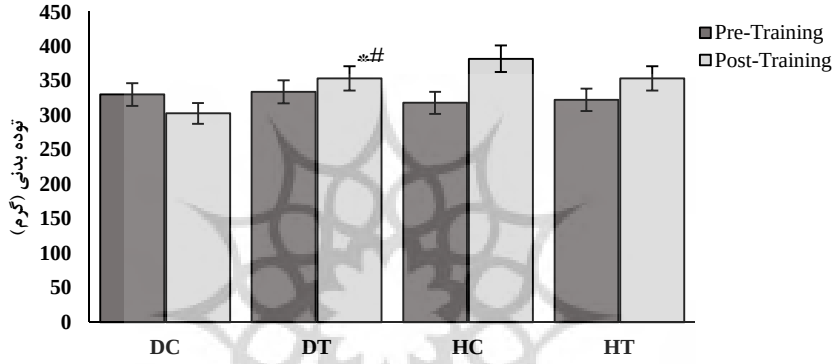
همچنین، به‌منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکهٔ سیمی و در داخل یک محفظهٔ پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفت. جهت عادت‌کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش درون محفظهٔ شفاف و بر روی صفحهٔ مشبک قرار می‌گرفتند. جهت سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدودهٔ دو تا ۶۰ گرم (۲،۴،۶،۸،۱۵،۲۶،۶۰) ساخت شرکت USA Stolting به منظور 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. چنانچه دو بار متوالی پاسخ (بلندکردن پا توسط حیوان) مشاهده می شد، همان وزنه به عنوان آستانهٔ پس‌کشیدن پنجه Paw Withdrawal Threshold (PWT) محسوب می‌گردید و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. چنانچه حیوان به هیچ‌یک از تارها از جمله تار شمارهٔ ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانهٔ پاسخ در نظر گرفته می‌شد. همچنین، هر آزمایش سه بار و به‌تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان آستانهٔ پس‌کشیدن پنجه منظور گردید (۲۶). به‌طورکلی، سنجش آلودینای مکانیکی و هایپرآلژزیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد. نتایج نشان داد که از بین ۱۴ حیوان مبتلا به دیابت، همگی نشانه‌های نروپاتی را از خود بروز دادند؛ بنابراین، این دو آزمون وجود نروپاتی دیابت را در حیوانات گروه دیابت کنترل و دیابت تمرین تأیید کرد.

تمامی داده‌ها براساس میانگین ± انحراف استاندارد توصیف شده‌اند. جهت تعیین طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ـــ ویلک[1] و برای تعیین همسان‌بودن واریانس‌ها از آزمون Leven استفاده شد. با توجه به این‌که فرض برابری واریانس‌ها حاصل نشد، از آزمون کروسکال والیس[2] برای تعیین اختلاف بین گروهی استفاده شد. به‌علاوه، از آزمون یومن ویتنی نیز برای مقایسهٔ دوبه‌دوی گروه‌ها استفاده شد. سطح معناداری نیز $\alpha=0.05$ در نظر گرفته شد. کلیهٔ بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس نسخهٔ ۲۰ انجام گرفت.

1. Shapiro –wilk
2. Kruskal– Wallis

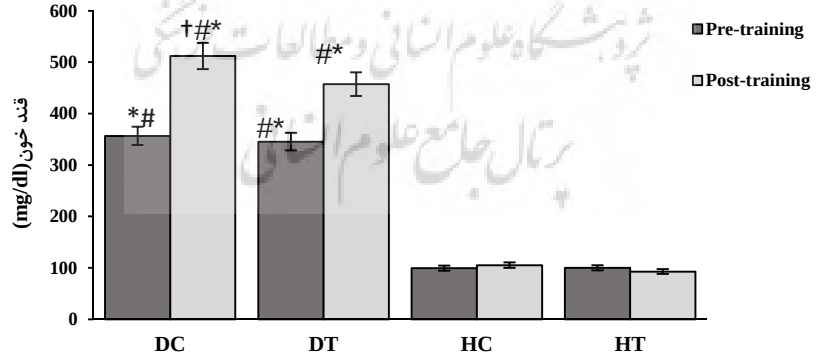
نتایج

نتایج مربوط به تغییرات تودهٔ بدنی طی شش هفته برای هر چهار گروه در شکل۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که شش هفته دیابت، باعث کاهش وزن معناداری در این گروه نسبت به پیش‌آزمون شده است (P<0.01) که نشان‌دهندهٔ آتروفی ناشی از دیابت می‌باشد. همچنین، اختلاف معناداری بین گروه دیابت تمرین‌کرده با دیابت کنترل (P<0.01) و گروه سالم کنترل و تمرین‌کرده وجود دارد (P<0.01).



شکل۱ـ تغییرات تودهٔ بدن در گروه‌های مختلف

* اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین‌نکرده (P<0.01)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین‌کرده (P<0.01)
† اختلاف معنادار با گروه دیابت تمرین‌نکرده (P<0.01)

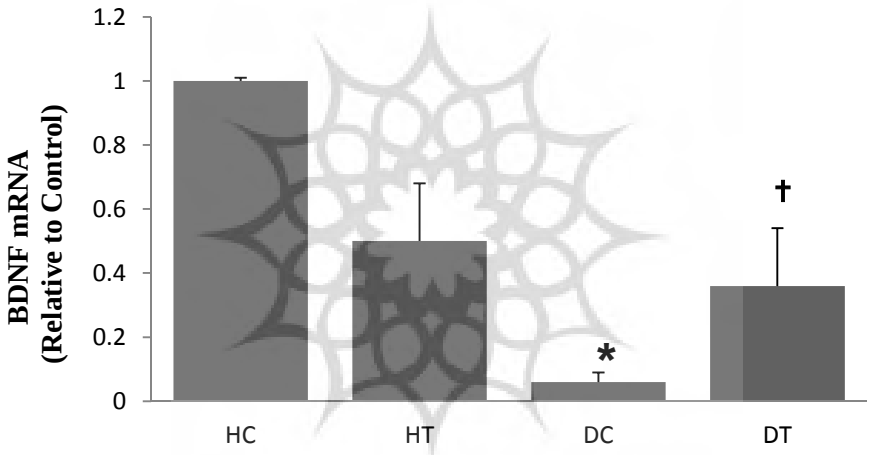


شکل۲ـ تغییرات‌گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف

* اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین‌نکرده (P<0.01)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین‌کرده (P<0.01)
† اختلاف معنادار با گروه دیابت تمرین‌نکرده (P<0.01)

همچنین، داده‌های مربوط به گلوکز پلا سمای پیش‌آزمون و پس‌آزمون چهار گروه ن شان می‌دهد که در شـروع برنامهٔ تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسـبت به گروه‌های سـالم به‌طور معناداری بالاتر بود (P=0.0001) و پس از شـش هفته تمرین اسـتقامتی نیز همچنان از اختلاف معناداری برخوردار بود (P=0.0001).

همچنین، در پایان برنامهٔ تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابتی تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به‌طور معناداری پایین‌تر بود (P=0.0001) که نشـان می‌دهد شـش هفته تمرین اسـتقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی رت‌های دیابتی شود (شکل۲).



شکل۳ـ مقدار BDNFmRNA در گروه‌ها

※ اختلاف معنادار با گروه تمرین سالم (P=0.05)، † اختلاف معنادار با گروه دیابت (P=0.01)

به‌علاوه، نتایج آزمون کروسکال والیس نشان داد که برای BDNFmRNA بین گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد (P=0.034). همچنین، نتیجهٔ آزمون یومن ویتنی نشان داد که بیان BDNF در گروه دیابت کنترل نسبت به گروه سالم، ۱۰ برابر کاهش یافته است؛ یعنی دیابت باعث کاهش بیان ژن BDNF در ریشه‌های حسی عصب سیاتیک شده است. همچنین، بین گروه دیابت و سالم تمرین، اختلاف معناداری مشاهده شد (P=0.036)؛ یعنی تمرین استقامتی به‌تنهایی و دیابت به‌تنهایی، بیان ژن BDNF را به‌گونه‌ای متفاوت تنظیم می‌کنند. بااین‌حال، این نتایج نشان داد که بین مقادیر

BDNFmRNA گروه دیابتی تمرین‌کرده با گروه دیابت کنترل تفاوت معناداری وجود دارد (P=0.043). به‌عبارت‌دیگر، ۶ هفته تمرین استقامتی توانسته است بیان BDNF را تا ۳/۸ برابر در گروه دیابتی افزایش دهد (شکل۳).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر شش هفته فعالیت بدنی به‌شکل تمرین استقامتی بر بیان ژن BDNF در بخش حسی نخاع موش‌های صحرایی دارای دیابت بود. در بخش اول؛ یعنی بررسی تأثیر دیابت بر تودۀ بدنی، نتایج نشان داد که بین گروه دیابت در پیش‌آزمون و پس‌آزمون اختلاف معناداری وجود دارد و ازطرفی، بین گروه کنترل سالم و دیابت نیز اختلاف معناداری در تودۀ بدنی مشاهده می‌شود (شکل۱). این نتایج نشان می‌دهد که دیابت به‌تنهایی توانسته است وزن حیوانات را کاهش دهد که می‌تواند نشانه‌ای از آتروفی ناشی از دیابت باشد. بااین‌حال، زمانی که مقادیر پیش‌آزمون و پس‌آزمون گروه دیابتی تمرین‌کرده را با یکدیگر مقایسه می‌کنیم، اختلاف معناداری بین آن‌ها مشاهده نمی‌گردد؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کاهش وزن در گروه دیابتی که تمرین استقامتی انجام می‌داده‌اند کمتر بوده است.

همچنین، غلظت گلوکز خون گروه دیابتی تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت کنترل در پایان برنامۀ تمرینی به‌طور معناداری پایین‌تر بود که نشان می‌دهد شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی موش‌های دیابتی شود (شکل۲). این یافته با نتایج پژوهش‌های متعددی هم‌سو است (۲۶،۲۷). سازوکارهای احتمالی برای این کاهش وجود دارد که می‌توان به افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های گلوکز (Glut4) اشاره کرد (۲۶،۲۷).

همچنین، نتایج نشان داد که دیابت باعث کاهش معنادار بیان ژن BDNF در ریشه‌های حسی عصب سیاتیک شده است. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش‌های انجام‌شدۀ پیشین هم‌راستا است (۳۳-۲۹). این پژوهش‌ها کاهش معنادار بیان ژن BDNF را در بافت‌هایی مانند عضلۀ اسکلتی نشان داده‌اند. اگرچه سایر نوروتروفین‌ها در احیای نورونی نقش دارند، بااین‌حال، BDNF متفاوت از سایر نوروتروفین‌ها است. ازاین‌جهت‌که از طریق خود نورون‌های DRG[1] سنتز می‌شود و بیان آن در این نورون‌ها بعد از آسیب به‌صورت گذرا تنظیم مثبت می‌شود. نقش احتمالی برای تنظیم مثبت BDNF، افزایش بقای نورون حسی می‌باشد. در کشت‌های نورونی ایزوله‌شده، زمانی که سنتز BDNF از طریق الیگونوکلئوتیدهای ضدحس ممانعت شد، بقای نورون کاهش یافت (۳۴). ایجاد آنتاگونیست برای

1. Dorsal root gangalion

BDNF منجر به کاهش بیان ژن‌های مرتبط با احیا یا آسیب در ۸۰٪ از نورون‌های حسی می‌شود. بااین‌حال، تنها ۳۰٪ از نورون‌های DRG سالم، گیرندهٔ trkB را بیان می‌کنند و این بیان بعد از آکسوتومی کاهش می‌یابد (۳۶)؛ بنابراین، بعید است که BDNF بر بیان ژن مرتبط با احیای آسیب به‌تنهایی از طریق سیگنالیگ گیرنده‌های نورونی trkB تأثیر بگذارد. BDNF می‌تواند از طریق گیرندهٔ نوروتروفین متداول؛ یعنی p57 عمل کند که در ۸۰٪ از نورون‌های حسی نمود می‌یابد (۳۴). BDNF می‌تواند القای بیان ژن مرتبط با آسیب یا احیا را از طریق گیرنده‌های trkB تنظیم کند که بر روی سلول‌های اقماری[1] نمود می‌یابد (۳۶)؛ بنابراین، پیوند BDNF با گیرندهٔ trkB، به‌طور غیرمستقیم بیان ژن مرتبط با آسیب یا رژنراسیون را از طریق برهم‌کنش یا تعامل نرون/ سلول اقماری پایین‌دست تنظیم می‌کند. به‌علاوه، شواهدی وجود دارد مبنی بر این‌که BDNF موضعی در آکسون‌های دیستال نورون‌های DRG می‌تواند سطح mRNA سیتواسکلتی حمل‌شده به بخش آکسون را افزایش دهد (۳۷). پروتئین‌های سنتزشده در آکسون از این mRNA می‌توانند سیگنالینگ رو به عقب را تعدیل کنند یا خودشان به‌صورت رو به عقب حمل شوند تا بیان ژن مرتبط با احیای آسیب در جسم سلولی آغاز شود (۳۸).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش بیان ژن BDNF در ریشهٔ حسی عصب سیاتیک می‌شود که این موضوع تأییدی بر نظریهٔ کاهش حمایت تروفیکی به‌عنوان یکی از عوامل بروز نروپاتی دیابت است. فعال‌سازی TrkB ممکن است تأثیرات طولانی‌مدتی را از طریق تنظیم نسخه‌برداری در سطح موتونورون اعمال کند. این احتمال وجود دارد که انتقال رو به عقب کمپلکس گیرندهٔ Trk- نوروتروفین فعال‌شده[2] از پایانه‌های پیش‌سیناپسی تنظیم نسخه‌برداری را در موتونورون‌ها تحت‌تأثیر قرار دهد. این سیگنال‌های رو به عقب[3] ممکن است تنظیم تطبیق موتونورون و فعالیت پایانهٔ پیش-سیناپسی را انجام دهند و بنابراین، به سازگاری‌های مورفولوژیکی[4] مختلف منجر شوند (۳۹). کاهش بیان ژن BDNF به‌دنبال دیابت درصورتی‌که با کاهش پروتئین آن همراه باشد می‌تواند اتصال آن به گیرندهٔ TrkB را کاهش داده و از تأثیرات این کمپلکس بر نسخه برداری در سطح موتونورون بکاهد. بااین‌حال، عدم اندازه‌گیری پروتئین BDNF در پژوهش حاضر، به‌عنوان یک محدودیت از بحث دقیق در این زمینه جلوگیری می‌کند.

1. Satellite cell
2. Activated neurotrophin-receptor complex
3. Retrograde signals
4. Morphological adaptations

همچنین، نتایج نشان داد که مقادیر BDNFmRNA گروه دیابتی تمرین‌کرده در مقایسه با گروه دیابت کنترل، به‌طور معناداری بالاتر است. پژوهش‌های قبلی مشخص کرده‌اند که بیان BDNF به‌سرعت تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که سطوح آن به‌طور معناداری حتی پس از شش ساعت فعالیت ورزشی اختیاری در موش‌ها زیاد شد که این افزایش با ازدیاد سلول‌های عصبی و نورون‌زایی در ارتباط بود (۴۰). درمقابل، در موش‌هایی که فعالیت ورزشی را با شدت زیاد انجام دادند، ارتباط معکوسی بین شدت تمرین و افزایش عوامل نوروتروفیک مشاهده شد که نشان می‌دهد محدودیت‌هایی در نورون‌زایی ناشی از فعالیت ورزشی در برنامه‌های تمرینی وجود دارد و فعالیت ورزشی با شدت متوسط منجر به افزایش BDNF می‌شود (۴۱). به‌تازگی شواهدی به‌دست آمده است که نشان می‌دهد فعالیت ورزشی موجب پیش‌برد شکل‌پذیری نورونی مغز می‌شود که با افزایش فاکتورهای نوروتروفیک مانند BDNF ناشی از فعالیت ورزشی ارتباط دارد؛ ولی سازوکار عمل آن هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است (۴۲). هرچند، پژوهش‌های قبلی تأثیرپذیری BDNF از تمرین ورزشی را نشان داده‌اند؛ اما تاکنون کسی تأثیر تمرین ورزشی بر بیان BDNF در ریشه‌های حرکتی و حسی عصب سیاتیک افراد دیابتی را موردبررسی قرار نداده است؛ ازاین‌رو، پژوهش حاضر به پژوهش این موضوع پرداخته است که نتایج آن حاکی از تأثیر مثبت تمرین ورزشی بر بیان ژن BDNF در افراد دیابتی بود. بااین‌حال، این موضوع نیازمند بررسی بیشتری است.

پیام مقاله: درمجموع، پژوهش حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش بیان ژن BDNF در ریشهٔ حسی عصب سیاتیک می‌شود. بااین‌حال، شش هفته تمرین استقامتی توانسته است این کاهش بیان BDNFناشی از دیابت را تاحدودی جبران کند. نتایج این پژوهش می‌تواند نقطهٔ روشنی بر اثبات فرضیهٔ کاهش حمایت نروتروفیکی در نروپاتی دیابت باشد. این موضوع می‌تواند در آینده به درمان دارویی و ورزشی نوروپاتی دیابت کمک کند.

منابع

1) Feldman E L, Stevens M J, Russell J W, Greene D A. Diabetic neuropathy. In. Current Review of Diabetes. S. Taylor (Ed.). Current Medicine. Philadelphia; 1999. pp: 71–83.

2) Schmeichel A M, Schmelzer J D, Low P A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes. 2003; 52:165–71.

3) Leinninger G M, Vincent AM and Feld EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. Journal of the Peripheral Nervous System. 2004; 9: 26–53.

4) Hellweg R, Hartung H D. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: A possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. J Neurosci Res. 1990; 26: 258–67.

5) Kasayama S, Oka T. Impaired production of nerve growth factor in the submandibular gland of diabetic mice. Am J Physiol. 1989; 257: 400–4.

6) Nagahara A H, Tuszynski M H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10: 209–19.

7) Vavrek R, Pearse D D, Fouad K. Neuronal populations capable of regeneration following a combined treatment in rats with spinal cord transection. J Neurotrauma. 2007; 24: 1667–73.

8) Foster E, Robertson B, Fried K. TRKB-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia following sciatic nerve injury. Brain Res. 1994; 659: 267–71.

9) Ha S O, Kim J K, Hong H S, Kim D S, Cho H J. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. Neuroscience. 2001; 107:301–9.

10) Mizisin A P, Bache M, DiStefano P S, Acheson A, Lindsay R M, Calcutt N A. BDNF attenuates functional and structural disorders in nerves of galactose-fed rats. J Neuropathol Exp Neurol. 1997; 56: 1290–301.

11) Sobue G, Yamamoto M, Doyu M, Li M, Yasuda T, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75NGFR, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies. Neurochem Res. 1998; 23: 821–9.

12) Weis J, Saxena S, Evangelopoulos ME and Kruttgen A. Trophic factors in neurodegenerative disorders. IUBMB Life. 2003; 55(6): 353–7.

13) Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy R R, Molteni R, Edgerton V R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. J Neurophysiol. 2002; 88: 2187–95.

14) Adlard P A, Perreau V M, Engesser-Cesar C, Cotman C W. The time course of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. Neurosci Lett. 2004; 363: 43–8.

۱۵) برزگر حامد، وسدی الهام، برجیان‌فرد محبوبه. تأثیر تمرین‌های متفاوت ورزشی بر مقادیر عامل نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی. نشریهٔ فیزیولوژی ورزش. ۱۳۹۳؛ (۲۴): ۱۸۰ـ۹۹.

۱۶) میرزایی سعید، فلاح‌محمدی ضیا، حاجی‌زاده مقدم اکبر، فتحی رزیتا، علیزاده رستم، رنجبر روح‌الله. اثر ۸ هفته تمرین استقامتی با مدت‌های مختلف بر سطوح فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از مغز در پلاسمای موش‌های صحرایی نر. نشریهٔ پژوهش در علوم ورزشی. ۱۳۹۰؛ (۱۰): ۲۸ـ۱۱۵.

۱۷) فلاح‌محمدی ضیا، نظری حسین. تأثیر ۴ هفته تمرین پلیومتریک بر غلظت سرمی فاکتور نروتروفیک مشتق از مغز مردان فعال. نشریهٔ فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۲؛ (۲۰): ۳۸ـ۲۹.

18) Deschenes M R, Tenny K A, Wilson M H. Increased and decreased activity elicits specific morphological adaptations of the neuromuscular junction. Neuroscience. 2006; 137: 1277–83.

19) Zhang J Y, Luo X G, Xian C J, Liu Z H, Zhou X F. Endogenous BDNF is required formyelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. Eur J Neurosci. 2000; 12: 4171–80.

20) Calcutt N. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. In Z. D. Luo (Ed.). Pain research methods in molecular medicine. Humana Press. 2004; 99: 55-65.

21) Rajasekar R, Manokaran K, Rajasekaran N, Duraisamy G and Kanakasabapathi D. Effect of Alpinia calcarata on glucose uptake in diabetic rats-an in vitro and in vivo model. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders. 2014; 33(13): 1-13.

22) 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(2): 235-41.

23) Ghanbari-Niaki A, Khabazian B M, Hossaini-Kakhak S A, Rahbarizadeh F, Hedayati M. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 361, 841–6.

24) 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(1): 77-88.

25) Talbot S, Théberge-Turmel P, Liazoghli D, Sénécal J, Gaudreau P, Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent. Journal of Neuroinflammation. 2009; 6-11. DOI: 10.1186/1742-2094-6-11

26) Tal M, Bennett G J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: Mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. Pain. 1994; 57(3): 375-82.

27) Christ-Roberts C Y, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Metabolism. 2004; 53: 1233–42.

28) Sriwijitkamol A, Coletta D, Estela W, Gabriela B, Sara M, John B, et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: A time-course and dose-response study. Diabetes. 2007; 56: 836 –48.

29) Andreassen C S, Jakobsen J, Flyvbjerg A, Andersen H. Expression of neurotrophic factors in diabetic muscle- relation to neuropathy and muscle strength. Brain. 2009: 132; 2724–33.

30) Boucek P. Advanced diabetic neuropathy: A point of no return? Rev Diabet Stud. 2006; 3(3): 7.

31) Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Progress in Neurobiology. 2003; 69(4): 229-85.

32) Fernyhough P, Diemel L T, Tomlinson D R. Target tissue production and axonal transport of neurotrophin- 3 are reduced in streptozocin-diabetic rats. Diabetologia. 1998; 41: 300–6.

33) Fernyhough P, Diemel L T, Hardy J, Brewster W J, Mohiuddin L, Tomlinson D R. Human recombinant nerve growth factor replaces deficient neurotrophic support in the diabetic rat. Eur J Neurosci. 1995; 7: 1107–10.

34) Acheson A, Conover J C, Fandl J P, DeChiara T M, Russell M, Thadani A, et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. Nature. 1995; 374: 450–3.

35) Karchewski L A, Kim F A, Johnston J, McKnight R M, Verge V M. Anatomical evidence supporting the potential for modulation by multiple neurotrophins in the majority of adult lumbar sensory neurons. J Comp Neurol. 1999; 413: 327–41.
36) Wetmore C, Olson L. Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. J Comp Neurol. 1995; 353: 143–59.
37) Willis D, Li K W, Zheng J Q, Chang J H, Smit A, Kelly T, et al. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. J Neurosci. 1995; 25: 778–91.
38) Perlson E, Hanz S, Medzihradszky K F, Burlingame A L, Fainzilber M. From snails to sciatic nerve: Retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons. J Neurobiol. 2004; 58: 287–94.
39) Zhan W Z, Mantilla C B, Sieck G C. Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins. Acta Physiologica Sinica. 2003; 55(6): 617-24.
40) Van Praag H, Christie B, Sejnowski T, Gage F. Running enhances neurogenesis, learning and long - term potentiaton in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 13427-31.
41) Gold S M, Schulz K, Hartmann S, Mladek M, Lang U, Hellweg R, et al. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain derived neruotropic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. J Neuroimmunol. 2003; 138: 99-105.
42) Egan M F, Kojima M, Calicott J H, Goldberg T E, Kolachana B S, Bertolino A, et al. BDNF val66 net polymorphism affects activity – dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell. 2003; 112: 257-69.

ارجاع دهی به روش ونکوور

اسلامی رسول، سرخ کمان‌زاده غزاله، قراخانلو رضا، کاظمی عبدالرضا، بنایی‌فر عبدالعلی. تأثیر دیابت و تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (*BDNF*) در بخش حسی نخاع موش‌های صحرایی. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۴؛ ۷(۲۸): ۴۶-۱۳۱.

The effects of diabetes and endurance training on BDNF gene expression in sensory spinal cord of rats with diabetic neuropathy

R. Eslami[1], G. Sorkhkamanzadeh[2], R. Gharakhanlou[3], A R. Kazemi[4], A A. Banaifar[5]

1. Assistant professor at Allameh Tabatabai'e University*
2. M.Sc. of Islamic Azad University, Kerman Branch
3. Associated professor at Tarbiat Modares University
4. Assistant professor at Vali-e-Asr Rafsanjan University.
5. Assistant professor at Islamic Azad University, Tehran-Jonob Branch

Received date: 2014/09/01 Accepted date: 2015/05/19

Abstract

The aim of present study was to investigate the effect of 6 weeks of endurance training on gene expression of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) sensory roots of sciatic nerve in rats with diabetic neuropathy. 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 starvation, 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. Real-Time PCR was used for BDNF gene expression measurement. For data Analysis, Kruskal– Wallis and Mann-Whitney U Test were used ($P \leq 0.05$). Results indicate that diabetes decreases BDNF expression (10-folds) in sensory roots of sciatic nerve. However, 6 weeks of endurance training can partly compensate the BDNF expression decrease induced by diabetic neuropathy ($P=0.043$). This study shows that diabetes can decrease BDNF expression in sensory roots of sciatic nerve. however, this decrease can be reversible some deal by endurance. In summary, result of this study support this hypothesis that neurotrophic support decreases in diabetic neuropathy.

Keywords: Diabetic Neuropathy, Exercise training, Brain-drived Neurotrophic factor, Spinal cord

* Corresponding author E-mail: R_eslami1000@yahoo.com