

علوم زیستی ورزشی - پاییز ۱۳۹۶
دوره ۹، شماره ۳، ص: ۳۴۹ - ۳۳۳
تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۹

اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن $GSK-3\beta$ در بخش حرکتی نخاع رت‌های نر ویستار با نوروپاتی دیابت

فرانک صادقی پور وجدانی^۱ - رضا قراخانو^{۲*} - مسعود رحمتی^۳ - منصوره موحدین^۴
۱. دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،
ایران ۲. دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۴. استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا، کلید تنظیمی است که خروجی بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی را تعیین می‌کند. مهار آن در افزایش بقای نورونی مؤثر گزارش شده است. از این رو پژوهش حاضر به بررسی اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن $GSK-3\beta$ در بخش حرکتی نخاع رت‌های نر ویستار با نوروپاتی دیابت می‌پردازد. بدین منظور ۱۶ سر رت نر ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه سالم کنترل، سالم تمرین، نوروپاتی کنترل و نوروپاتی تمرین تقسیم شدند. برای القای دیابت از روش تزریق درون‌صفافی محلول استرپتوزوسین (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد. دو هفته پس از تزریق استرپتوزوسین، با اثبات نوروپاتی دیابت توسط آزمون‌های الودینای مکانیکی و هایپرالژیای حرارتی، برنامه تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت شش هفته اجرا شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها تشریح و نورون‌های حرکتی $L4-L6$ بافت نخاع استخراج شد. بررسی بیان ژن نیز با روش Real Time-PCR صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد در مقایسه با گروه نوروپاتی کنترل، نوروپاتی تمرین کاهش بیان $GSK-3\beta$ را تجربه می‌کند ($P = 0/02$)؛ از سوی دیگر اختلاف معناداری بین گروه‌های سالم کنترل و نوروپاتی کنترل دیده شد ($P = 0/02$)، به طوری که بیان ژن در گروه نوروپاتی کنترل افزایش نشان داد، اما اختلاف گروه کنترل سالم و نوروپاتی تمرینی معنادار نبود. براساس نتایج این تحقیق یکی از عوامل احتمالی درگیر در گسترش آسیب نورون‌های حرکتی نوروپاتی دیابت، تنظیم افزایشی $GSK-3\beta$ mRNA است و ورزش به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی، می‌تواند آن را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود $GSK-3\beta$ به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

بخش حرکتی نخاع، تمرین استقامتی، نوروپاتی دیابت، $GSK-3\beta$.

مقدمه

دیابت، از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ‌ومیر در دنیاست که اختلال‌های متعدد از جمله نوروپاتی^۱، نفروپاتی^۲، رتینوپاتی^۳، بیماری‌های قلبی-عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را در پی دارد (۷). نوروپاتی دیابت با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی اکسون، میلین‌زدایی، کاهش تارهای عصبی و کند شدن بازسازی تارهای عصبی همراه است (۷،۲). این عارضه، در اثر هر دو آسیب-های ناشی از هایپرگلیسمی به سلول‌های عصبی و ایسکمی نورونی ناشی از کاهش جریان عروقی-عصبی تحریک‌شده از هایپرگلیسمی رخ می‌دهد (۲). در شرایط پاتولوژیکی مانند نوروپاتی دیابت، تخریب عصبی از نوزایش عصبی پیشی می‌گیرد. در میان مدل‌های حیوانی از تزریق STZ نیز به‌عنوان مدلی کارآمد برای القای دیابت استفاده شده است. STZ موجب هایپرگلیسمی و هیپوانسولینی ماندگار در حیوانات دیابتی می‌شود و سرانجام، ورود و تجمع گلوکز اضافی در نوروها به راه‌اندازی مسیرهای متابولیکی مخرب می‌انجامد (۴۵). در مدل‌های مختلف موش‌های صحرایی و دیگر نمونه‌های حیوانی در پی ایجاد دیابت، علائم نوروپاتی دیابت با ظهور این شرایط تخریبی در نوروها همپوشانی داشته است که ابتدا نوروهای حسی و سپس حرکتی را درگیر می‌کند (۴۷). براساس نتایج مطالعات اختلالات پروتئین کینازهای عصبی، از اصلی‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در توسعه نوروپاتی ناشی از بیماری دیابت است (۲۲). در میان کینازها، GSK-3 β در فعالیت‌های سلولی بسیاری مانند تنظیم فعالیت آنزیم گلیکوژن سنتتاز (۵)، پیام‌رسانی بقا و توسعه نورو (۹) و گسترش دندریتها و شکل‌گیری سیناپس‌ها در نوروهای تازه متولدشده (۱۰) مشارکت می‌کند. گلیکوژن سنتتاز کیناز ۳ (GSK-3) یک کیناز سرین/ترئونین است که به‌صورت دو ایزوفرم آلفا و بتا وجود دارد (۱). وزن مولکولی GSK-3 α ، ۵۱ کیلو دالتون است؛ درحالی‌که وزن GSK-3 β ، ۴۷ کیلو دالتون و شامل ۴۳۳ آمینواسید در انسان و ۴۲۰ آمینواسید در موش است. این دو ایزوفرم دارای سرهای سرینی و تیروزینی‌اند که در تنظیم فعالیت آنها نقش اساسی دارند. GSK-3 برای فعال شدن به فسفوریلاسیون سر تیروزینی نیازمند است؛ یعنی دفسفوریلاسیون سر تیروزینی این کیناز موجب غیرفعال شدن آن می‌شود. انسولین موجب فسفوریلاسیون بخش سرین ۲۱ و سرین ۹ در GSK-3 آلفا و بتا می‌شود که در پی آن غیرفعال شدن این

-
1. Neuropathy
 2. Nephropathy
 3. Retinopathy

آنزیم را خواهیم داشت (۱۰). اگرچه دو ایزوفرم آلفا و بتا از نظر ساختاری نسبتاً مشابه‌اند، از لحاظ عملکردی متفاوت‌اند (۵).

بیماری‌های نورون حرکتی^۱ بیماری‌های تخریب عصبی‌اند که به‌طور خاص بقا و عملکرد نورون‌های حرکتی فوقانی و تحتانی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. از آنجا که موتونورون‌ها عهده‌دار حرکات ارادی عضلات هستند، اختلالات موتونورون‌ها به‌وسیلهٔ شکل‌پذیری، ضعف و آتروفی عضله مشخص می‌شود. ژن‌های متعددی، مسئول افزایش توسعهٔ بیماری‌های موتونورون هستند. به‌نظر می‌آید مکانیزم‌های مولکولی متعددی در پیشرفت انواع بیماری‌های موتونورون (موروثی و غیرموروثی) دخیل باشند. این مکانیزم‌ها شامل ساماندهی اسکلت سلولی، عملکرد میتوکندریایی، ترمیم DNA و فرایند سنتز RNA، تردد و ویزیکولی، تردد و انتشار اندولیزوزومی، مانند بهم پیوستن و تخریب پروتئینی و به‌ویژه تراکم پروتئین‌های تجمع‌پذیر، علائمی از بیماری موتونورون است؛ پیشنهاد می‌کند که سیستم کنترل کیفیت پروتئینی (سیستم‌های محافظتی و تخریب مولکولی: سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم و اتوفازای) اشباع یا ناکافی برای پاکسازی این پروتئین‌های تغییر یافته است. به‌علاوه گزارش شده است اختلال در پروتئین‌های شوک گرمایی (sHSPs/HSPBs)، عملکرد و بقای موتونورون‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند و بالا بردن HSPBs ممکن است از لحاظ درمان بیماری‌های نورون حرکتی مؤثر واقع شود (۱۱).

در سلول‌های عصبی نیز، $GSK-3\beta$ اهمیت زیادی دارد، زیرا در صورت وجود نقص تنظیمی آن در مسیرهایی که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده عمل می‌کند (مانند مسیرهای پیام‌رسانی Wnt و Hedgehog که هر دو در فرم‌های مختلف سرطان و همچنین آلزایمر درگیرند)، شاهد توسعهٔ بیماری‌هایی مانند دیابت، آلزایمر، سرطان، التهاب (۴۴،۱۲) و دیگر اختلالات عصب حرکتی مانند تصلب جانبی آمیوتروفیک (ALS)^۲ (۷) خواهیم بود. همچنین مطالعات زیادی در مورد ارتباط $GSK-3\beta$ با بیماری آلزایمر انجام گرفته است. آلزایمر یک بیماری تخریب عصبی است که از تجمع پلاک پروتئینی بتا آمیلوئید ($A\beta$) توسعه می‌یابد. براساس نتایج تحقیقات $GSK-3$ در تولید پلاک‌ها دخالت دارد که با دستکاری فعالیت $GSK-3$ می‌توان به یک استراتژی درمانی قابل قبول در مبارزه با آلزایمر دست یافت (۷،۲). همچنین مشخص شده است که مهار $GSK-3$ می‌تواند یک استراتژی درمانی بیماری ALS باشد و علائم بیماری و مرگ بیمار را به تعویق بیندازد (۱۴). از سوی دیگر، براساس نتایج برخی پژوهش‌ها

-
1. Motor Neuron Disease (MND)
 2. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

تمرین ورزشی و همچنین انسولین، فعالیت GSK-3 α و بتا را ۴۰ تا ۶۰ درصد کاهش داده است (۲۶). موش‌های صحرایی گروه تمرینی این پژوهش، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بلافاصله پس از دویدن با سرعت ۲۵ متر در دقیقه با شیب ۱۰ درصد مطالعه شدند و نتایج حاکی از آن بود که تمرین ورزشی موجب غیرفعال شدن GSK-3 می‌شود. به‌علاوه مطالعات دیگر نشان داده‌اند که فعالیت بدنی و انقباض عضلانی می‌تواند GSK-3 را فسفوریله و غیرفعال کند (۷،۲).

براساس اطلاعات موجود در خصوص نقش اساسی GSK-3 β در اختلالات نورون حرکتی و تأثیرپذیری آن از فعالیت بدنی، می‌توان انتظار داشت فعالیت بدنی تغییرات ایجادشده در بیان این کیناز را تحت تأثیر قرار دهد و موتونورون‌ها را دستخوش تغییر سازد. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن GSK-3 β در بخش حرکتی نخاع رت‌های نر ویستار با نوروپاتی دیابت است.

روش تحقیق

در پژوهش حاضر ۱۶ سر رت صحرایی بالغ نر ده‌هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی $271/3 \pm 11/2$ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه شده و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل‌شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتی-گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، رطوبت نسبی ۴۰ درصد و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب $326/3 \pm 8/4$ گرم جهت القای نوروپاتی دیابت (۱۵)، رت‌ها به‌طور تصادفی در چهار گروه چهارتایی قرار گرفتند: گروه اول (نوروپاتی کنترل)، گروه دوم (نوروپاتی تمرین)، گروه سوم (سالم کنترل) و گروه چهارم (سالم تمرین). دو هفته پس از القای دیابت، آزمایش‌های رفتاری درد نوروپاتیک به‌عنوان شاخص عملکرد نورون‌های حسی (۱۶) اجرا شد و پس از اطمینان یافتن از حصول نوروپاتی حسی در رت‌ها (۱۹)، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گرفت (۲۰). ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوار گردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوار گردان راه رفتند. همچنین، به‌منظور سازگاری جهت آزمایش‌های رفتاری حیوانات به مدت سه روز در معرض آزمایش‌های رفتاری (دو بار برای هر آزمایش) قرار گرفتند. بدین

صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار گرفتند (۱۸). سرانجام، به منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون‌ها، دیابت القا شد. دو هفته پس از القای دیابت، با اجرای مجدد آزمون‌های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نوروپاتیک در گروه‌های دیابتی، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گرفت (۲۱). تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد. همچنین، به منظور اجتناب از عوامل مداخله‌گر مانند آنتی-نوسیسپشن القا شده توسط استرس، آزمایش‌های رفتاری میان ساعت‌های ۷ تا ۱۰ صبح به عمل آمد (۲۳).

القای دیابت

به منظور القای دیابت نوع اول، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ ۴۵ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ mol/L، pH: ۴/۵) به صورت درون‌صفاقی تزریق شد. به رت‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد جراحی کوچکی توسط لانسیت بر روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۴). شایان ذکر است، با توجه به احتمال مرگ‌ومیر و عدم دیابتی شدن ناشی از تزریق STZ، تعداد ۱۲ رت برای این کار در نظر گرفته شد که ۲ سر از آنها پس از تزریق از بین رفتند و در نهایت از میان رت‌های باقی‌مانده، تعداد ۸ سر به عنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند. با توجه به اینکه میزان تزریق STZ و وزن حیوانات پیش از تزریق STZ، دو عامل مهمی‌اند که پیدایش دیابت نوروپاتیک را به همراه دارند (۱۷)؛ از این رو برای کاهش حساسیت بیماری و تأثیرات جانبی به سطح قابل قبول (۲۶)، از کمترین میزان تزریق STZ و مطابق با وزن حیوانات (۲۸)، در مطالعه حاضر استفاده شد. شایان ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه از علائم ناشی از تزریق اشتباه، مانند تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نشد.

نحوه اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی^۱

به منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفت. به منظور عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه پیش از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار گرفتند. به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stolting, USA، 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، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده شد. چنانچه دو بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌شد، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (PWT)^۲ محسوب می‌شد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. چنانچه حیوان به هیچ‌یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. همچنین، هر آزمایش سه بار و به تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور شد (۳۰). به طور کلی، سنجش آلودینیای مکانیکی، پیش از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد. شایان ذکر است که از این روش، به عنوان روشی کارآمد برای سنجش رفتارهای درد نوروپاتیک (۳۱) و اثبات نوروپاتی حسی (۳۹) در مطالعات حیوانی استفاده شده است.

نحوه اندازه‌گیری هایپرآلژیای حرارتی^۳

هایپرآلژیای حرارتی با استفاده از روش هارگریوز و همکاران (۱۹۸۸) با کمی تغییر مورد سنجش قرار گرفت (۳۳). به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه (Ugo Bassil, Italy) Radiant heat plantar test حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول ۲۲ cm × عرض ۲۲ cm × ارتفاع ۱۳/۳ cm) و بر روی یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه‌جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال شده و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف شد و با ثبت زمان تأخیر در پس کشیدن

-
1. Mechanical Allodynia
 2. Paw Withdrawal Threshold
 3. Thermal Hyperalgesia

پنجه^۱ (PWL) میزان تحمل حیوان به محرک آسیب‌رسان حرارتی مورد سنجش قرار گرفت. هر پا به‌طور متناوب و با فواصل پنج تا ده دقیقه، سه بار آزمایش شد و میانگین آنها به‌عنوان آستانه درد حرارتی ثبت شد. همچنین، به‌منظور جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به‌طور کلی، سنجش هایپرالژزیای حرارتی پیش از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به‌عمل آمد. شایان ذکر است که از این روش، به‌عنوان روشی کارآمد به‌منظور سنجش رفتارهای درد نوروپاتی و اثبات نوروپاتی حسی (۳۴) در مطالعات حیوانی استفاده شده است.

پروتکل تمرینی

در پژوهش حاضر از سرعت تمرینی ۱۸-۱۰ متر در دقیقه معادل ۵۵-۵۰ درصد Vo_{2max} و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک (۳۵)، استفاده شد؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوار گردان با شدت متوسط به پنج روز در هفته و به مدت شش هفته قرار گرفت. سرعت و مدت تمرین نوار گردان به‌تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۸-۱۷ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. برای رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند (۳۶) (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرین

مدت	سرعت	هفته
۱۰ دقیقه	۱۰ متر در دقیقه	اول
۲۰ دقیقه	۱۰ متر در دقیقه	دوم
۲۰ دقیقه	۱۵-۱۴ متر در دقیقه	سوم
۳۰ دقیقه	۱۵-۱۴ متر در دقیقه	چهارم
۳۰ دقیقه	۱۸-۱۷ متر در دقیقه	پنجم
۳۰ دقیقه	۱۸-۱۷ متر در دقیقه	ششم

1. Paw Withdrawal Latency

استخراج نمونه

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها از طریق تزریق درون‌صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند و سگمنت‌های نخاعی تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک (L4-L6) (۳۶) که در رت، میان دنده‌های T10-T12 (۲۵-۲۰) قرار گرفته‌اند (۳۷)، با برش در پایین‌ترین بخش ممکن بلافاصله استخراج شد. سپس، بافت نخاع با استفاده از کانال مرکزی به‌عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش قدامی آن که حاوی نورون‌های حرکتی بود (۳۸)، در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت حرکتی به‌صورت جداگانه، به‌منظور استخراج total RNA به نسبت یک به ده در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در 0°C ، ۴ min، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت یک به نیم با کلروفرم مخلوط شده و به مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در 4°C ، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته شده و با نسبت یک به نیم با ایزوپروپانول مخلوط شد و به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در 4°C ، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست‌وشو شده و در $20\ \mu\text{L}$ آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA سنجش شد (Eppendorf, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از $1\ \mu\text{g}$ از RNA و Random hexamer primer و آنزیم Mmuv Reverse transcriptase انجام گرفت.

Real time – PCR

سطوح بیان GSK-3 β mRNA به روش کمی Real time-PCR و به کمک Primix syber green II (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $20\ \mu\text{L}$ و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های GSK-3 β و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

دقیقه- ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence	GenBank code
GSK3B	For: 5'-CAAAGCAGCTGGTCCGAGG -3'	
	Rev: 5'-TCCACCAACTGATCCACACCAC-3'	
GAPDH	For: 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC -3'	NM_017008
	Rev: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف (KS)، استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون Leven ارزیابی شد. به منظور تعیین معناداری تفاوت بین متغیرها و تعامل آنها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 انجام گرفت و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

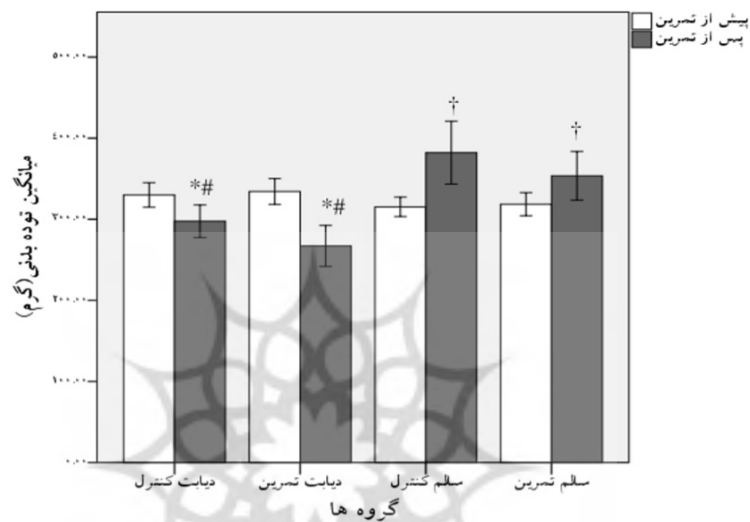
یافته‌ها

میانگین تغییرات وزن گروه‌های تمرین و کنترل نوروپاتی نسبت به گروه‌های تمرین و کنترل سالم به‌طور معناداری کمتر بود (به ترتیب $P=0/0001$ و $P=0/001$)؛ همچنین میانگین وزن گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل به‌طور معناداری کمتر بود ($P=0/04$). اگرچه میانگین وزن گروه سالم تمرین نسبت به گروه سالم کنترل کمتر بود، این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0/01$) (شکل ۱).

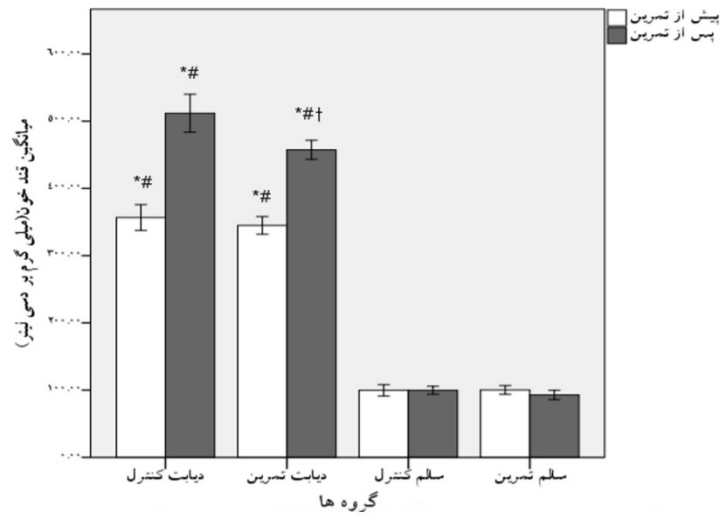
در آغاز برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معناداری بالاتر بود ($P=0/0001$) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان اختلاف معناداری داشت ($P=0/0001$)؛ همچنین در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی تمرین به نسبت نوروپاتی کنترل به‌طور معناداری پایین‌تر بود ($P=0/0001$) (شکل ۲).

تمام رت‌ها در گروه تمرینی توانستند شش هفته تمرین استقامتی را به‌طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (تمرین × دیابت) حاکی از اثر معنادار تمرین، نوروپاتی و اثر تعامل این دو بر بیان ژن $GSK-3\beta$ بوده است (به ترتیب $0/0001$ ، $0/004$ و $0/0001$). نتایج حاصل از تحلیل واریانس یکطرفه

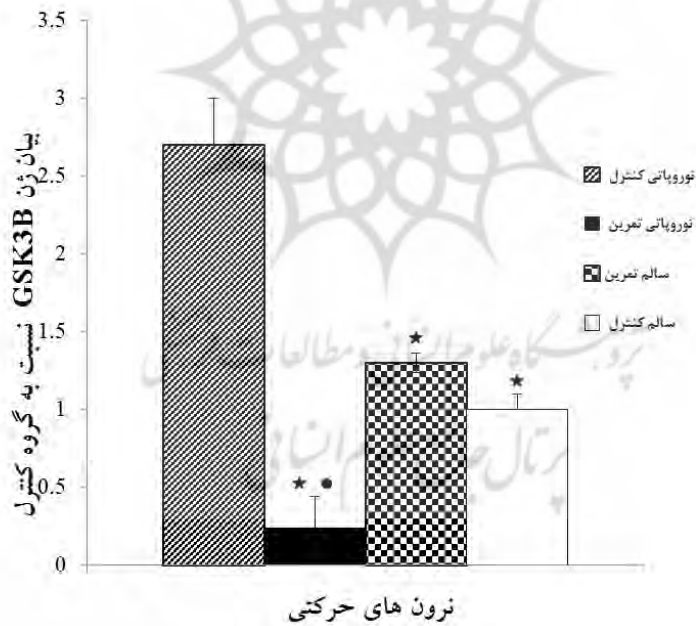
نشان می‌دهد که اختلاف معناداری در میزان بیان ژن GSK-3 β بین گروه‌های نوروپاتی کنترل و نوروپاتی تمرین وجود دارد ($p=0/02$). از سوی دیگر، اختلاف معناداری بین گروه‌های سالم کنترل و نوروپاتی کنترل دیده می‌شود ($p=0/02$) (شکل ۳). اما اختلاف معناداری بین گروه کنترل سالم و گروه دیابت تمرینی وجود نداشت.



شکل ۱. تغییرات توده بدن در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P \leq 0/01$)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P \leq 0/01$)، † اختلاف معنادار با گروه نوروپاتی کنترل ($P \leq 0/01$)



شکل ۲. تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P \leq 0.01$), # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P \leq 0.01$), † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل ($P \leq 0.01$)



شکل ۳. میزان بیان ژن GSK-3 β در بخش حرکتی نخاع پس از دوره تمرینی در گروه‌های پژوهش. * اختلاف معنادار با گروه نوروپاتی کنترل ($P \leq 0.01$), • اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P \leq 0.01$)

بحث

در پژوهش حاضر اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن GSK-3 β در رت‌های با نوروپاتی دیابت بررسی و مشخص شد بیان این ژن در نتیجه تمرین استقامتی در گروه دیابت تمرینی در مقایسه با گروه دیابت بی‌تمرین کاهش یافته و این کاهش معنادار بوده است. این کاهش احتمالاً به دلیل سازگاری ایجادشده به تمرین استقامتی بوده است. تاکنون مطالعات بسیار کمی به بررسی اثر ورزش بر GSK-3 β پرداخته‌اند. نتایج پژوهش‌های انجام‌گرفته، رابطه معناداری را بین تغییرات در بیان GSK-3 β در عضله اسکلتی موش‌های دیابتی و تمرین نشان داده است. برخی مطالعات کاهش این کیناز را با اجرای تمرین ورزشی در عضله دوقلوی رت‌ها نشان داده و بیان کرده‌اند که این کاهش احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت مسیرهای پیام‌رسانی Akt/mTOR است که از مسیرهای فسفوریلاسیون و غیرفعال‌کننده GSK-3 β است (۳). به‌علاوه تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش حاضر نشان داد که میزان بیان ژن GSK-3 β در گروه دیابت بی‌تمرین به نسبت گروه کنترل سالم افزایش معناداری داشت. این افزایش احتمالاً به دلیل آسیب عصبی ایجادشده در اثر نوروپاتی دیابت بوده است. GSK-3 β در پیام‌رسانی، بقا و توسعه نورو (۱۳) و گسترش دندریتها و شکل‌گیری سیناپس‌ها در نوروهای تازه متولدشده (۲) مشارکت می‌کند؛ بنابراین، این کیناز اهمیت زیادی در سلول‌های عصبی دارد و در صورت وجود نقص تنظیمی در مسیرهایی که GSK-3 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده عمل می‌کند، شاهد توسعه بیماری‌های تخریب عصبی^۱ نظیر دیابت، آلزایمر، (۱) و دیگر اختلالات عصب حرکتی مانند تصلب جانبی آمیوتروفیک (ALS) (۷) خواهیم بود. همچنین مطالعات انجام‌گرفته در مورد ارتباط GSK-3 β با بیماری آلزایمر نشان می‌دهد که GSK-3 در تولید پلاک‌های بتا آمیلوئید دخالت دارد که با دستکاری فعالیت GSK-3 می‌توان به راهبرد درمانی قابل قبول در مبارزه با آلزایمر دست یافت (۳۵،۳۰). همچنین مشخص شده است که مهار GSK-3 می‌تواند یک راهبرد درمانی بیماری ALS باشد و علائم بیماری و مرگ بیمار را به تعویق بیندازد (۹). اگرچه میزان بیان ژن GSK-3 β در گروه دیابت تمرینی کمتر از کنترل سالم بود، اختلاف معناداری بین این دو گروه دیده نشد. در واقع می‌توان گفت که تمرین موجب تعدیل بیان این ژن در گروهی که نوروپاتی دیابت داشتند، شده و میزان بیان این ژن را تا حدود طبیعی آن کاهش داده است.

ساکوموتو و همکاران (۲۰۰۴) ، بیان کرده‌اند که ۱. $GSK-3$ در حالت پایه عضله اسکلتی به‌طور مداوم فعال است؛ ۲. هر دو تمرین و انسولین تنظیم‌کننده‌های مؤثر فعالیت $GSK-3$ در حالت *in vivo* هستند؛ ۳. غیرفعال شدن $GSK-3$ ناشی از تحریک انسولینی در پاسخ به افزایش فعالیت Akt و فسفوریلاسیون بخش سرینی $GSK-3$ اتفاق می‌افتد؛ ۴. برای غیرفعال کردن $GSK-3$ در عضله اسکلتی یک مکانیزم مستقل از Akt وجود دارد.

سازوکار غیرفعال کردن $GSK-3$ به‌وسیله تحریک انسولین احتمالاً مسیره‌های فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز ($PI3-K$)، فسفاتیدیل اینوزیتول فسفاتاز ۳ و ۵ وابسته به پروتئین کیناز ۱ و Akt (یا پروتئین کیناز B) را درگیر می‌کند. $PI3-K$ به‌عنوان تنظیم‌کننده بالادست Akt است. شواهد قوی وجود دارد که Akt با فسفوریلاسیون بخش سرین، موجب غیرفعال شدن $GSK-3$ می‌شود (۱۴).

تغییرات ایجادشده در اثر تمرین ورزشی در نورون‌های حرکتی بازتابی از تغییرات ایجادشده در متابولیسم انرژی، فعالیت لیزوزومی، بیوسنتز RNA (۲۸)، افزایش انتقال آکسوپلاسمی استیل کولین (۱۸)، و افزایش نرخ جوانه‌زنی عصبی به‌دنبال برش عصبی است (۱۶). فعالیت ورزشی منظم موجب بهبود عملکردهای مغزی مانند ادراک می‌شود (۱۹) و شکل‌پذیری مغز (۱۶)، سیستم ضد اکسایشی، تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها را ارتقا می‌بخشد و از آپوپتوز سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند (۳۳). ورزش همچنین می‌تواند بیوسنتز RNA (۳۱)، افزایش انتقال آکسوپلاسمی استیل کولین (۲۶)، و افزایش نرخ جوانه‌زنی عصبی در پی برش عصبی را به‌همراه داشته باشد (۳۰). ورزش مزمن قادر است تغییراتی را در نورون‌های حرکتی ایجاد کند که عبارت‌اند از: افزایش نرخ نوزایش آکسون، افزایش انتقال آکسوپلاسمی (۴۲، ۴۰)، و بهبود عملکرد سیناپسی (۲۶). گزارش شده است فعالیت ورزشی حاد و مزمن، تغییراتی را در متابولیسم نورون‌های حرکتی ایجاد می‌کند. به‌نظر می‌رسد که نورون‌های حرکتی به فعالیت کاهش یا افزایش‌یافته از لحاظ بیوشیمیایی سازگار می‌شوند. چنین تغییرات بیوشیمیایی ممکن است به حفظ بقای نورون‌های حرکتی کمک کنند (۲۳). به‌علاوه نتایج پژوهش‌های انجام‌گرفته در زمینه بررسی اثر ورزش بر $GSK-3\beta$ ، رابطه معناداری را بین تغییرات در بیان $GSK-3\beta$ در عضله اسکلتی موش‌های دیابتی و تمرین نشان داده‌اند. برخی مطالعات کاهش این کیناز را با اجرای تمرین ورزشی در عضله دوقلوی رت‌ها نشان داده‌اند (۷).

نتیجه گیری

به طور خلاصه با توجه به نتایج پژوهش حاضر می توان گفت که بیان ژن $GSK-3\beta$ در بخش حرکتی تحت تأثیر نوروپاتی دیابت قرار گرفته و میزان بیان آن افزایش یافته است. همچنین تمرین استقامتی تأثیر مثبتی در تعدیل بیان این ژن داشت، چراکه میزان بیان $GSK-3\beta$ در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به دیگر گروهها کاهش معنادار داشته است. از این رو می توان گفت که در نوروپاتی دیابت افزایش بیان $GSK-3\beta$ آسیب و تخریب عصب حرکتی نخاع را تسریع می کند؛ از سوی دیگر، تمرین استقامتی می تواند میزان بیان این ژن را در بخش حرکتی نخاع کاهش دهد و از تخریب پیشرونده عصبی جلوگیری کند. احتمالاً می توان تمرین استقامتی را به عنوان راهبرد مؤثر درمانی نوروپاتی دیابت، به وسیله کاهش بیان ژن $GSK-3\beta$ تلقی کرد.

تقدیر و تشکر

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

منابع و مأخذ

1. Alkon DL, Sun MK, Nelson TJ. (2007) PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*. 28(2):51-60.
2. Aschenbach WG, Ho RC, Sakamoto K, Fujii N, Li Y, Kim YB. (2006) Regulation of Dishevelled and β -catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced $GSK-3\beta$ signaling pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 291(1):E152-E8.
3. Aschenbach WG, Suzuki Y, Breeden K, Prats C, Hirshman MF, Dufresne SD. (2001) The muscle-specific protein phosphatase PPIG/RGL (GM) is essential for activation of glycogen synthase by exercise. *Journal of Biological Chemistry*. 276(43):39959-67.
4. Beyreuther B, Callizot N, Stohr T. (2006) Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 539:64-70.
5. Bijur GN, Jope RS. (2003) Glycogen synthase kinase-3 [beta] is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*. 14(18):2415-9.
6. Cadigan KM, Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & development*. 11(24):3286-305.
7. Cai Q, Sheng ZH. (2009) Moving or stopping mitochondria: Miro as a traffic cop by sensing calcium. *Neuron*. 61(4):493-6.

8. Calcutt N, Freshwater J, O'Brien J. (2000) Protection of sensory function and antihyperalgesic properties of prosaposin-derived peptide in diabetic rats. *Anesthesiology* 93: 1271-1278.
9. Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. (1996) Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 68: 293-299.
10. Calcutt NA. (2004) Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 99:55-65.
11. Carra, S., Crippa, V., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Minoia, M., Giorgetti, E., ... & Poletti, A. (2012). Alteration of protein folding and degradation in motor neuron diseases: Implications and protective functions of small heat shock proteins. *Progress in neurobiology*, 97(2), 83-100.
12. Centeno C, Repici M, Chatton JY, Riederer BM, Bonny C, Nicod P, Price M, Clarke PG, Papa S, Franzoso G, Borsello T. (2007) Role of the JNK pathway in NMDA-mediated excitotoxicity of cortical neurons. *Cell Death Differ* 14, 240- 253.
13. Chae, C.H., Jung, S.L., An, S.H., Park, B.Y., Wang, S.W., Cho, I.H., Cho, J.Y., Kim, H.T. (2009) Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience*; 164, 1665-1673.
14. Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. (2008) The Mood-Stabilizing Agent Valproate Inhibits the Activity of Glycogen Synthase Kinase-3. *Journal of neurochemistry*. 72(3):1327-30.
15. Chen Y-W, Li Y-T, Chen YC, Li Z-Y, Hung C-H. (2012) Exercise Training Attenuates Neuropathic Pain and Cytokine Expression After Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve. *Anesth Analg* 114: 1330-7.
16. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiemermann C, Boccuzzi G. (2009) Insulin Reduces Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in the Hippocampus of Diabetic Rats A Role for Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Diabetes*. 58(1):235-42.
17. Cross DAE, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD. (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *Journal of neurochemistry*. 77(1):94-102.
18. Davis RJ. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
19. Detera-Wadleigh SD. (2001) Lithium-related genetics of bipolar disorder. *Annals of medicine*. 33(4):272-85.
20. Dill J, Wang H, Zhou F, Li S. (2008) Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *The Journal of Neuroscience*. 28(36):8914-28.
21. Doble BW, Woodgett JR. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science*. 116(7):1175-86.

22. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. (2008) Diabetic neuropathy: mechanisms to management *PharmacolTher*;120(1):1-34.
23. Eldar-Finkelman H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends in molecular medicine*. 8(3):126-32.
24. Embi N, RYLATT DB, COHEN P. (2005) Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of biochemistry*. 107(2):519-27.
25. Fernández-Martos CM, González-Fernández C, González P, Maqueda A, Arenas E, Rodríguez FJ. (2011) Differential expression of wnts after spinal cord contusion injury in adult rats. *PloS one*. 6(11):e27000.
26. Frame S, Cohen P, Biondi RM. (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell*. 7(6):1321-7.
27. Frame S, Cohen P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal*. 359(Pt 1):1.
28. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. (1999) 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*. 89(4):1229-39.
29. Gould TD, Manji HK. (2002) The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *The Neuroscientist*. 8(5):497-511.
30. Grimes CA, Jope RS. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3b in cellular signaling. *Progress in neurobiology*. 65(4):391.
31. Hall AC, Brennan A, Goold RG, Cleverley K, Lucas FR, Gordon-Weeks PR. (2002) Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Molecular and cellular neurosciences*. 20(2):257.
32. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
33. Holmberg C, Katz S, Lerdrup M, Herdegen T, Jaattela M, Aronheim A, Kallunki T. (2002) A novel specific role for I kappa B kinase complex-associated protein in cytosolic stress signaling. *J BiolChem* 277, 31918-31928.
34. Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET. (2008) The Wnt pool of glycogen synthase kinase 3 β is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Molecular and cellular biology*. 28(5):1515-27.
35. Kuhad A, Chopra K. (2009) Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 57(4):456-62.
36. Liu S, Bréjot T, Cressant A, Bacci J, Saïd G, Tadié M. (1995) Reinnervation of hind limb extremity after lumbar dorsal root ganglion injury. *65(4):391*.
37. Millan MJ. (1999) The induction of pain: an integrative review. *ProgNeurobiol* 57: 1-164.
38. Pan J, Li H, Ma J-F, Tan Y-Y, Xiao Q, Ding J-Q. (2012) Curcumin inhibition of JNKs prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease through suppressing mitochondria dysfunction. *TranslNeurodegener* 1 (1): 16.

39. Prodanov D, Feirabend HKP. (2007) Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol* 503:85–100.
40. Rossi D M. Valenti V E. Navega MT. (2011) Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *CLINICS* 66(9):1615-1619.
41. Sakamoto, Kei, Arnolds, David EW, Ekberg, Ingvar, Thorell, Anders, & Goodyear, Laurie J. (2004). Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 419-425.
42. Sharma NK. Ryals JM. Gajewski BJ. (2010) Wright DE. Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain. *PHYS THER* 90:714-725.
43. Sluka KA and Rasmussen LA. (2010) Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle Inflammation. *Pain* 148(2): 188.
44. Wan, W., Xia, S., Kalionis, B., Liu, L., & Li, Y. (2014). The Role of Wnt Signaling in the Development of Alzheimer's Disease: A Potential Therapeutic Target?. *BioMed research international*, 2014.
45. Wattiez AS, Barrière DA, Dupuis A, Courteix C. (2012) Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them?. *Diabetes Metab*, 43: 008.
46. Woodgett, J.R. (2001). Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Science Signalling*, 2001(100), re12.
47. Zochodne DW, Ramji N, Toth C. (2008) Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. *Neuroscientist*, 14: 311-8.