Sport Physiology **Volume 13, No 49, 2021, Page 89-106**

Research Paper

Effect of Swimming Training on Ganglion Cell and Expression NeuN Protein in the Dorsal Root Ganglion of Male Wistar Rats

Sh. Rostami Poor[1], M. Fathi[2], M. Rahmati[3]

1. MSc. in Exercise Physiology, Faculty of Humanity Sciences, Lorestan University, Lorestan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanity sciences, Lorestan University (Corresponding Author)
3. Associate Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanity sciences, Lorestan University

Received: 2019/04/06 **Accepted: 2019/09/25**

Abstract

Neuronal nuclear (NeuN) proteins are one of the neuronal differentiation markers expressed in mature neurons. The purpose of the present study was to investigate the effect of 20-day swimming training on NeuN protein and ganglion cell number in the dorsal root ganglion (DRG) in male Wistar rats. In this experimental study, 16 male Wistar rats (200-250 g) were prepared from the Pasteur laboratory, and the animals were randomly divided into two groups (control and experimental). The experimental group performed a swimming exercise program for 20 days (30 min/day equal 65% Vo_2max), and 48 hours after the end of the last session, the experimental and control rats were anesthetized and sacrificed in an unconscious state. The DRG was isolated from the lower limb region. Cresyl violet assay and hemotoxylin-eosin staining were used to assess the ganglion population and NeuN protein to assess the ganglion population and NeuN protein, respectively. An independent t-student test was used to determine between-group differences. The results of this study showed that swimming exercises significantly increased NeuN protein ($p<0.05$). Additionally, the number of ganglion cells in the exercise group significantly increased ($p<0.05$). This study indicated for the first time that the swimming exercise caused an increase in the number of sensory neurons and induced their differentiation, leading to the development of mature sensory neurons in the DRG in the spinal cord.

Keywords: NeuN Protein, Swimming Exercise, Dorsal Root Ganglion, Sensory Neurons

1. Email: rostami@gmail.com
2. Email: m_fathi723@yahoo.com
3. Email: rahmati.mas@lu.ac.ir

Extended Abstract

Background and Purpose

Neuronal nuclear (NeuN) protein was discovered as a neuronal differentiation marker in 1992 (1). NeuN is expressed in the cytoplasm of most neurons in the mammalian central nervous system (2). Aerobic *physical training* is associated with the expression of genes related to neuronal plasticity and *enhances neurogenesis in sensory and motor neurons (3)*. Several studies have investigated the effect of physical activity on motor neurons (4, 5), but the effect of physical activity on sensory neuron changes is small. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the effect of 20-day swimming training on NeuN protein and ganglion cell number in the dorsal root ganglion (DRG) in male Wistar rats.

Methods

In this experimental study, 16 male Wistar rats weighing 200-250 g were prepared from the Pasteur laboratory. The animals were randomly divided into two groups according to the treatment protocol (control and experimental). The training protocol was carried out by an experimentalist. Habituation to the *Exercise* Training *Program* was done in four days for two groups, after habituation, the experimental group performed a swimming exercise program for 20 days. The main exercise program consisted of 30-minute swimming daily (equal to 65% Vo_2max of rats) for 16 days. At the end of the exercise protocol and 48 hours after the end of the last session, the experimental and control rats were anesthetized with *ketamine (90mg/kg)* and *xylazine (10mg/kg)* and sacrificed in an unconscious state. The DRG was isolated from the lower limb region. Cresyl violet assay and hemotoxylin-eosin staining were used to assess the ganglion population and NeuN protein in DRG, respectively. An independent t-student test was used to determine group differences at significant level of 0.05.

Results

The results of the hemotoxylin-eosin staining test showed that swimming exercises significantly ($p<0.05$) increased NeuN protein in the DRG region of trained rats compared to control rats. Moreover, the result of the cresyl violet test indicated that the number of ganglion cells of the DRG region in the training group was significantly ($p<0.05$) higher than that in the control group.

Discussion

This study suggested for the first time that swimming exercise caused an increase in the number of sensory neurons and induced their differentiation, leading to the development of mature sensory neurons in the DRG in the spinal cord. It seems that an increase in mature sensory neurons in the DRG in the spinal cord due to swimming training is the response to the increase in sensory stimuli induced by training, and similar to motor neurons, neurogenesis enhances sensory neurons in the DRG of the spinal cord. In the ongoing study, the factors that increased NeuN protein and the population of ganglionic cells in the DRG of the trained rat were still unknown, so it could be describe that according to various studies, factors such as Nitric oxide (NO), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), and Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (4, 6) seemed to play a role in these processes.

Keywords: NeuN protein, swimming exercise, dorsal root ganglion, sensory neurons.

1. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development. 1992;116(1):201-11.
2. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. Acta naturae. 2015; 7(2):4-7-2.
3. Eadie BD, Redila VA, Christie BR. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. The Journal of comparative neurology. 2005;486(1):39-47.
4. Keeler BE, Liu G, Siegfried RN, Zhukareva V, Murray M, Houle JD. Acute and prolonged hindlimb exercise elicits different gene expression in motoneurons than sensory neurons after spinal cord injury. Brain Res. 2012;1438:8-21.
5. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. Neuroscience. 2003;122(3):647-57.
6. Liao CF, Yang TY, Chen YH, Yao CH, Way TD, Chen YS .Effects of swimming exercise on nerve regeneration in a rat sciatic nerve transection model. BioMedicine. 2017;7(1):16-24.

فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۳، شماره ۴۹ ،بهار ۱۴۰۰ .صص ۱۰۶-۸۹

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر تمرین شنا بر سلول‌های گانگلیونیک و میزان بیان پروتئین NeuN در گانگلیون ریشهٔ خلفی رت‌های نر ویستار

شکوفه رستمی‌پور[۱]، محمد فتحی[۲]، مسعود رحمتی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
۲. دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران (نویسندهٔ مسئول)
۳. دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

چکیده

پروتئین‌های NeuN یکی از نشانگرهای تمایز نورونی‌اند که در نورون‌های بالغ بیان می‌شوند. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر ۲۰ روز تمرین استقامتی شنا بر پروتئین NeuN و تعداد سلول‌های گانگلیونیک در گانگلیون ریشهٔ خلفی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. در این پژوهش تجربی ۱۶ رت نر ویستار با شش هفته سن و با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به‌عنوان نمونهٔ پژوهش از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاه پاستور تهیه شدند و به‌طور تصادفی به دو گروه (کنترل و تجربی) تقسیم شدند. گروه تجربی به‌مدت ۲۰ روز فعالیت شنا را (۳۰ دقیقه در روز برابر با ۶۵ درصد Vo_2max) انجام دادند. چهل‌وهشت ساعت بعد از آخرین جلسهٔ تمرینی، حیوانات بی‌هوش شدند و گانگلیون ریشهٔ خلفی مناطق اندام تحتانی آن‌ها جدا شد. به‌ترتیب برای ارزیابی جمعیت گانگلیونیک و پروتئین NeuN از تست کریزیل ویوله و ایمونوهیستوشیمی استفاده شد، برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آماری تی مستقل استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد که تمرین استقامتی شنا باعث افزایش معناداری در بیان پروتئین NeuN می‌شود ($P < 0.05$). علاوبراین، تعداد سلول‌های گانگلیونیک در گروه تمرین ورزشی استقامتی شنا افزایش معناداری را نشان داد ($P < 0.05$). این مطالعه برای اولین بار نشان داد که تمرین شنا موجب افزایش تعداد سلول‌های حسی و همچنین افزایش تمایز آن‌ها و درنتیجه توسعهٔ نورون‌های حسی بالغ در گانگلیون ریشهٔ خلفی نخاع می‌شود.

واژگان کلیدی: پروتئین NeuN، تمرین شنا، گانگلیون ریشهٔ خلفی، نورون‌های حسی.

1. Email: rostami@gmail.com
2. Email: fathi.m@lu.ac.ir
3. Email: rahmati.mas@lu.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌های ویژه‌ای در سیستم عصبی بیان می‌شوند که برخی از آن‌ها نشانگر هستند. از جملهٔ این پروتئین‌ها می‌توان به NeuN[1] اشاره کرد. این پروتئین یکی از پروتئین‌هایی است که در تمایز نورونی و تکامل سلول‌های عصبی به نورون بالغ نقش دارد (۱) و تقریباً در بیشتر سلول‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی مشاهده می‌شود (۲). در مطالعات دربارهٔ تمایز نورونی، از نشانگر NeuN برای ارزیابی وضعیت عملکردی نورون در شرایط سالم و پاتولوژیک استفاده می‌شود (۳). گزارش شده است که میزان پروتئین NeuN در برخی شرایط پاتولوژیک کاهش می‌یابد که اغلب به‌عنوان نورون‌های ازدست‌رفته محسوب می‌شود (۴).

فرایند تمایز عصبی در سیستم عصبی توسط مکانیسم‌های کنترل‌کنندهٔ مختلفی تنظیم می‌شود (۱) که بیان آن‌ها به ویژگی‌های ساختاری و عملکردی سلول عصبی بستگی دارد (۵). بیماری‌های مانند هانتینگتون (۶) آلزایمر (تحلیل‌کنندهٔ نورونی که تمایز نورونی در سیستم عصبی را مختل می‌کند) (۷) و همچنین آسیب و تروما به سیستم عصبی بر بیان پروتئین NeuN تأثیر می‌گذارند و مقادیر آن را کاهش می‌دهند (۸). علاوه‌بر آسیب به تمایز سلول عصبی، هرگونه آسیب به سیستم عصبی موجب کاهش تعداد سلول‌های عصبی گانگلیونیک و همچنین مرگ نورونی آن‌ها می‌شود (۹-۱۱).

ریشهٔ خلفی اعصاب نخاعی[2] (DRG) حاوی اعصاب حسی است که جسم سلولی این اعصاب در عقده‌هایی با نام گانگلیون قرار دارد که این گانگلیون‌ها در مسیر ریشهٔ خلفی با عنوان «گانگلیون ریشهٔ خلفی» شناخته شده‌اند. هرگونه آسیب پاتولوژیک به دستگاه عصبی محیطی ممکن است به مرگ نورونی منجر شود و تغییراتی را در پروتئین‌ها و ساختار سیستم عصبی به‌وجود آورد (۱۱، ۹) که مرگ نورونی با کاهش سلول‌های زندهٔ عصبی DRG در ارتباط است (۹). مطالعات اخیر در زمینهٔ بررسی مرگ سلولی نورون‌های حسی DRG به‌دنبال آسیب سیستم اعصاب محیطی در موش‌های صحرایی بالغ نشان داد که مرگ نورون‌های حسی باعث القای برخی تغییرات دژنراتیو در سلول‌های گانگلیونیک می‌شود (۹-۱۱). علاوه بر این گزارش شده است که نوروپاتی دیابتی بر نورون‌های واقع در گانگلیون ریشه خلفی تأثیر می‌گذارد و اندازهٔ سلول‌های گانگلیونیک را کاهش می‌دهد (۱۲).

1. Neuronal Nuclear Protein
2. Dorsal Root Ganglion

تمرین ورزشی بر حفظ و بقای نورون‌های سیستم عصبی موجود زنده تأثیر مثبت دارد (۱۳) و می‌تواند با افزایش انشعابات دندریتی، نوروژنز، شکل‌پذیری سیناپسی و آزادکردن نوروترانسمیترها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم باعث حفاظت از سیستم عصبی شود (۱۴-۱۶). در همین راستا، شین[1] و همکاران (۱۷) نشان دادند که فعالیت ورزشی هوازی تمایز نورونی در هیپوکامپ را افزایش می‌دهد و آپوپتوز را مهار می‌کند. این موضوع در شرایط پاتولوژیک نیز تأیید شده است؛ برای مثال برخی پروتئین‌ها مانند بتاتوبولین III و حتی تعداد سلول‌ها DRG به‌دنبال فعالیت هوازی بقای بیشتری دارند (۱۰).

با توجه به آسیب گانگلیون‌ها که موجب مرگ نورونی می‌شود (۱۱) و همچنین اهمیت فعالیت ورزشی در بقای سلول‌های عصبی (۱۳)، به‌نظر می‌رسد فعالیت بدنی بتواند تغییری در بقای سلول‌های عصبی ریشهٔ خلفی نخاع و همچنین مارکر تمایزی (درنهایت نوروژنز) سلول‌های عصبی ایجاد کند. ازآنجاکه تاکنون در این زمینه مطالعه‌ای انجام نشده‌است، برای بررسی این سؤال که آیا فعالیت‌های ورزشی تأثیری بر تعداد سلول‌های عصبی ریشهٔ خلفی نخاع و همچنین مارکرهای تمایزی آن دارند، انجام‌شدن مطالعه‌ای دقیق ضروری به‌نظر می‌رسد؛ بنابراین این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تمرین شنا بر تعداد سلول‌های گانگلیونیک و میزان بیان پروتئین NeuN در گانگلیون ریشهٔ خلفی رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد.

روش پژوهش

در این پژوهش تجربی ۱۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدودهٔ وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم فراهم شدند و به اتاق نگهداری حیوانات با دمای محیط ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت ۲۴-۲۲ درصد انتقال داده شدند. حیوانات در گروه‌های چهارتایی در قفس نگهداری شدند. نور به‌صورت کنترل‌شده در چرخهٔ روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بود. در تمام مراحل پژوهش موش‌ها توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری می‌شدند و آب و غذای مورد نیاز به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده می‌شد. پس از دورهٔ آشنایی، آزمودنی‌ها به دو گروه کنترل (هشت سر) و تمرین شنا (هشت سر) تقسیم شدند.

برنامهٔ تمرینی مطابق با جدول شمارهٔ یک به دو فاز چهارروزه (تطبیقی) و شانزده‌روزه (اصلی) تقسیم شد. در دورهٔ تطبیقی (با هدف آماده‌سازی و آشناسازی)، در روز اول دو دورهٔ ۳۰ ثانیه‌ای شنا با فاصلهٔ زمانی دوساعته بین دوره‌های شنا، در روز دوم دو دورهٔ دو دقیقه‌ای شنا و یک فاصلهٔ دوساعته، در روز سوم سه دورهٔ ۱۰ دقیقه‌ای شنا با فاصلهٔ پنج دقیقه و در روز چهارم، دو دورهٔ ۱۵ دقیقه‌ای شنا با فاصلهٔ زمانی پنج دقیقه اجرا شد. پس از دورهٔ تطبیقی، موش‌های گروه فعالیت ورزشی وارد فاز اصلی

1. Shin

تمرین شدند و روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در گروه‌های جداگانه در استخر قرار گرفتند و تا آخرین روز دورهٔ تمرینی ملزم به انجام شنا شدند. شایان ذکر است که این پروتکل تمرینی در شرایطی انجام گرفت که غلظت لاکتات اندازه‌گیری‌شده در خون بیشتر از یک میلی‌مول در لیتر بود (۱۸). به استناد رفرنس ذکرشده، این زمان فعالیت در استخر برای رت‌ها برابر است با ۶۵ درصد Vo_2max آن‌ها. گروه کنترل در هیچ‌گونه فعالیت بدنی شرکت نکرد و هیچ مداخله‌ای نیز دریافت نکرد.

جدول ۱- پروتکل برنامهٔ تمرینی شنا

Table 1- Swimming training program protocol

فاز Phase	تطبیقی Comparative				اصلی Main
روزهای تمرین Training days	روز اول First day	روز دوم Second day	روز سوم Third day	روز چهارم Fourth day	(روز پنجم تا روز بیستم) Fifth day to twentieth day
مدت زمان (دقیقه) Duration (minutes)	0.5	2	10	15	30
تکرار Frequency	2	2	3	2	1

چهل‌وهشت ساعت پس از اتمام آخرین جلسهٔ تمرین، با تزریق درون‌صفاقی مادهٔ بی‌هوشی، ترکیبی از کتامین (۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) موش‌های بی‌هوش و DRG مناطق اندام تحتانی آن‌ها در شرایط استریل از طریق شکاف بر پوست ناحیهٔ ستون فقرات رت (بین T10 و L3) جدا شد. پس از جداسازی، نمونه‌های بافتی بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد و به‌منظور مطالعهٔ هیستولوژیکی برای فیکس‌شدن قرار داده شدند.

از روش ایمنوهیستوشیمی به‌صورت زیر برای سنجش پروتئین NeuN استفاده شد. ابتدا پس از ثبوت بافتی در محلول بوئن به‌مدت ۴۸ ساعت مراحل پاساژ بافتی ادامه یافت و نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند و پس از آن با استفاده از میکروتوم دوار برش‌های پنج میکرونی تهیه شد. برای حذف پارافین از گزیلن (زایلن) و برای آب‌دهی از الکل اتیلیک با درجات نزولی استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی زمینه نیز از هماتوکسیلین استفاده شد. سپس اسلایدها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (۱۹).

برای اندازه‌گیری تعداد سلول‌های گانگلیون از روش کریزیل ویوله به این صورت استفاده شد که ابتدا در این روش اجسام نیسلِ داخل سلول‌ها رنگ‌آمیزی شدند و جسم سلولی به رنگ بنفش تغییر کرد.

مراحل این رنگ‌آمیزی به‌طور خلاصه به این ترتیب بود. الف- برداشت پارافین، ب- آب‌دهی، ج- رنگ‌آمیزی، د- آب‌گیری و ه- شفاف‌کردن. پس از انجام‌شدن مراحل ذکرشده، یک قطره چسب روی لام مدنظر ریخته شد و پس از قرارادن لام روی آن در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود (۲۰).

برای تعیین موقعیت و شناسایی جمعیت سلول‌های گانگلیونیک ریشهٔ خلفی از تست هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) استفاده شد. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین هسته‌ها آبی‌رنگ و سیتوپلاسم صورتی رنگ می‌شود. مراحل رنگ‌آمیزی به ترتیب زیر بود: ثابت‌سازی بافت، آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی، قالب‌گیری، برش‌گیری، پارافین‌زدایی، شفاف‌سازی، آب‌دهی، رنگ‌آمیزی (تهیهٔ رنگ هماتوکسیلین هاریس، تهیهٔ کربنات لیتیوم، تهیهٔ رنگ ائوزین)، آب‌گیری، شفاف‌سازی، چسباندن و بررسی بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری (۲۱).

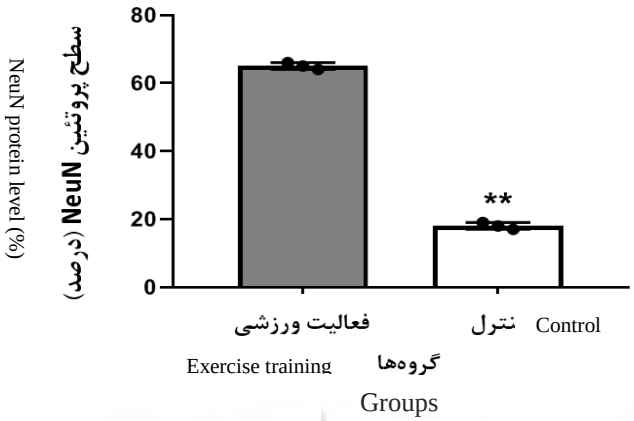
درنهایت برای بررسی اثر متغیر مستقل بر متغیر وابسته از آزمون تی مستقل استفاده شد که عملیات آماری پژوهش با استفاده از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس.[1] نسخهٔ ۲۱ و نرم‌افزار Graphpad Prism نسخهٔ هشت صورت گرفت. همچنین سطح معناداری $P < 0.05$ درنظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین NeuN نشان داد که تفاوت آماری معناداری از نظر میـزان تظاهر پروتئین NeuN در ناحیهٔ DRG بین گروه تمرین‌کرده و کنترل وجود داشت ($P < 0.05$)؛ به این صورت که در پایان ۲۰ روز تمرین شنا، میزان پروتئین NeuN در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت (شکل‌های شمارهٔ یک و شمارهٔ دو).

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

1. SPSS

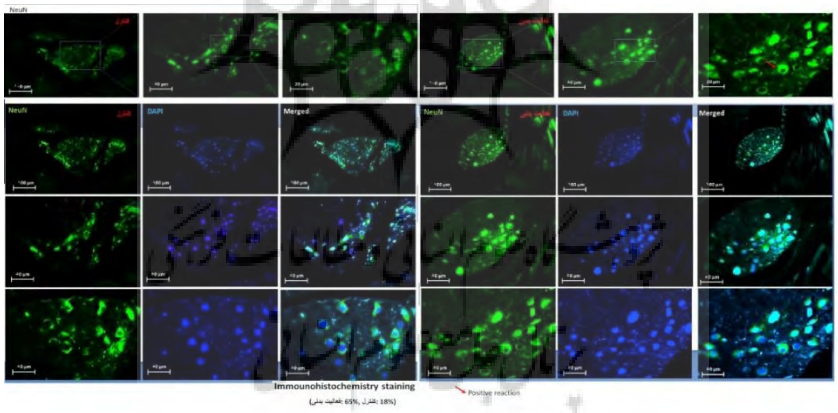


شکل ۱- اندازه‌گیری ایمنوهیستوشیمی پروتئین NeuN درDRG و افزایش آن در رت‌های تمرین‌کرده پس از ۲۰ روز تمرین شنا.

**** *: تفاوت معنادار با گروه کنترل (P < 0.05)**

Figure 1. Immunohistochemical measurement of NeuN protein in DRG and its increase in trained rats after 20 days of swimming training.

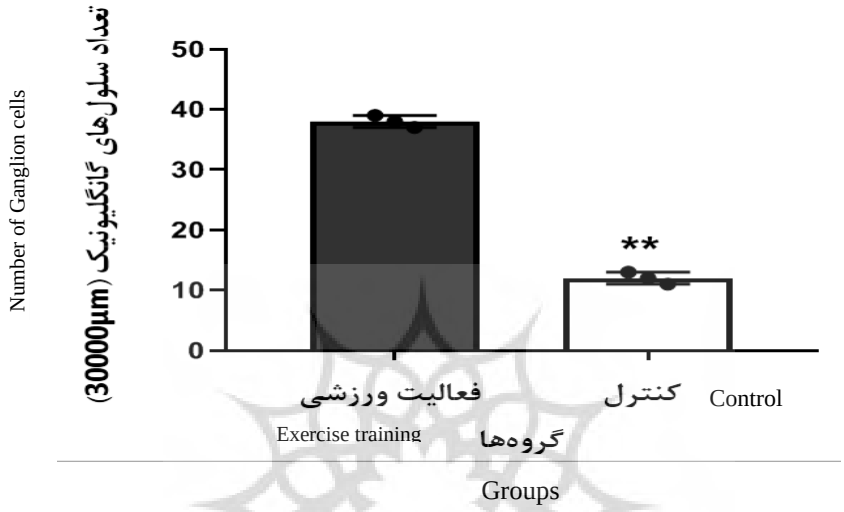
** *: Significant difference with control group (P <0.05)



شکل ۲- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشمی NeuN در DRG رت‌های گروه تمرین شنا و کنترل و افزایش معنادار پروتئین NeuN در DRG گروه تمرین شنا در مقایسه با گروه کنترل (P < 0.05)

Figure 2 - NeuN immunohistochemical staining photomicrographs in DRG rats of swimming and control training group and significant increase of NeuN protein in DRG swimming training group compared to control group (P <0.05)

نتایج رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله برای ارزیابی تعداد سلول‌های گانگلیون نشان داد که تعداد این سلول‌ها در DRG پس از ۲۰ روز تمرین استـقامتی شنا در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد ($P < 0.05$) (شکل‌های شمارهٔ سه و شمارهٔ چهار).



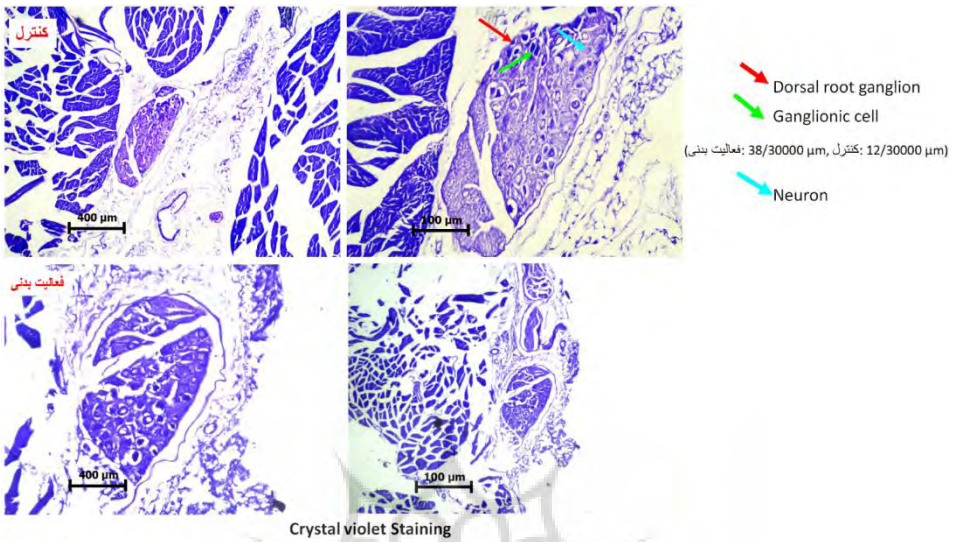
شکل ۳- جمعیت سلول‌های گانگلیونیک در DRG رت‌ها پس از ۲۰ روز تمرین شنا و افزایش معنادار در تعداد سلول‌های گانگلیونیک در DRG رت‌های تمرین‌کرده.

***: **تفاوت معنادار با گروه کنترل ($P < 0.05$)**

Figure 3. Ganglion cell population in DRG rats after 20 days of swimming training and a significant increase in the number of ganglion cells in DRG trained rats.

***: Significant difference with control group ($P < 0.05$)

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

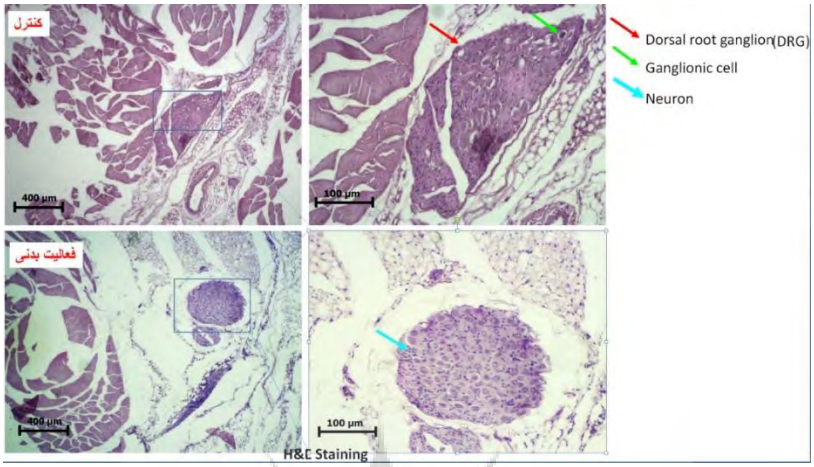


شکل ۴- فتوگراف‌های رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله سلول‌های گانگلیونیک و افزایش معنادار در تعداد سلول‌های گانگلیونیک در DRG رت‌هایی که تمرین شنا داشتند ($P < 0.05$)

Figure 4 - Crystal-violet staining photographs of ganglion cells and a significant increase in the number of ganglion cells in DRG rats that practiced swimming ($P < 0.05$)

در این پژوهش ساختار کلی DRG در دو گروه تمرین شنا و کنترل نیز بررسی شد که نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی H&E در شکل شمارهٔ پنج نشان داده شده است.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی



شکل ۵- فتوگراف‌های رنگ‌آمیزی H&E در DRG رت‌های گروه تمرین شنا و کنترل (در این روش DRG، سلول گانگلیونیک و عصب در دو گروه تمرین شنا و کنترل نمایش داده شده است

Figure 5 - H&E stained photographs in DRG rats of swimming and control training group (in this method, DRG, ganglion cell and nerve are shown in two swimming and control training groups

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تمرین شنا بر NeuN و جمعیت سلول‌های گانگلیونیک و میزان تمایز نورونی از طریق نشانگر NeuN انجام شد. نتایج نشان داد که تمرین شنا باعث افزایش بیان نشانگر رشد عصبی NeuN می‌شود. همچنین مشخص شد که تمرین شنا باعث افزایش تعداد سلول‌های عصبی در DRG می‌شود. در مطالعه‌ای که شین و همکاران انجام دادند، اثر چهار هفته تمرین ورزشی (دویدن روی تردمیل) بر میزان نوروژنز در هیپوکامپ رت‌های سالم و هایپوتیروئیدیسم بررسی شد. نتایج پژوهش آنان نشان داد که پروتکل تمرینی موجب افزایش تولید پروتئین‌های رشد عصبی Brdu/NeuN در هر دو گروه می‌شود. در این مطالعه نویسندگان از القای کم‌کاری تیروئید استفاده کرده بودند و نشان دادند گرچه این بیماری، نوروژنز در هیپوکامپ را مهار کرد، تمرین ورزشی این روند را معکوس و آن را افزایش داد. همچنین مشخص شد که در این مناطق عصبی با افزایش پروتئین NeuN از میزان پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز سلولی کاسته می‌شود(۱۷). در مطالعه‌ای نسبتاً مشابه تأثیر تمرین ورزشی (دوباره دویدن روی تردمیل) بر رت‌های سالم نشان داد که یک هفته دویدن روی تردمیل موجب افزایش تمایز در هیپوکامپ می‌شود که این افزایش به شدت تمرینی وابسته است

(۲۲). ایتو[1] و همکاران (۲۳) نشان دادند که تمرینات کوتاه‌مدت ورزشی (۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل در روز با سرعت ۲۲ متر در دقیقه به‌مدت هفت روز متوالی) تعداد سلول‌های NeuN در رت‌های دچار آسیب ترومای مغزی را در مقایسه با گروه بدون تمرین افزایش می‌دهد. همچنین این تغییر در محل آسیب‌دیده مشاهده شد؛ این در صورتی است که التهاب مغز، سطوح پروتئین NeuN در هیپوکامپ را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد، اما تمرین ورزشی موجب افزایش آن و تولید نورون‌های بالغ می‌شود (۲۴). به‌نظر می‌رسد در سیستم عصبی مرکزی، ورزش با افزایش تمایز نورونی و نوروژنز در هیپوکامپ، توانایی یادگیری و عملکرد حافظه را بهبود می‌بخشد. حال می‌توان گفت در تأیید نتایج پژوهش‌های ذکرشده، پژوهش حاضر نیز تأثیر مطلوب فعالیت ورزشی بر افزایش NeuN را البته در نورون‌های ریشهٔ خلفی، تأیید می‌کند.

تست کریزیل ویوله نشان داده است که تمرین ورزشی موجب افزایش تعداد سلول‌های گانگلیون واقع در DRG می‌شود. تعداد سلول‌های گانگلیون ریشهٔ پشتی نخاع پس از آسیب عصب محیطی کاهش می‌یابند (۲۵) که به کاهش تولید نورون‌های جدید در گانگلیون ریشهٔ خلفی نیز منجر می‌شود (۲۶). در حفظ و بقای این سلول‌ها فاکتور نوروتروفیکی مشتق از مغز (BDNF) نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۸، ۲۷)؛ درصورتی‌که آسیب عصبی (قطع عصب) موجب اختلال در جمعیت این سلول‌ها می‌شود (۲۳). از طرفی مشخص شده است که تمرین استقامتی (در رت‌های با آسیب نخاعی) بیان ژن‌های BDNF، GDNF و NT-4 در DRG را افزایش می‌دهد (۲۹). در مواردی مشاهده شده است که علاوه‌بر افزایش مارکرهای ترمیمی عصبی، فعالیت ورزشی نیز نوسازی آکسونی را در نورون‌های حسی پس از آسیب عصبی افزایش می‌دهد (۱۴). به‌نظر می‌رسد تمرین شنا نیز از این قاعده مستثنا نباشد؛ زیرا با اینکه پروتکل‌ها متفاوت بود (۳۱، ۳۰)، مشاهده شده است که ورزش شنا قادر به افزایش نوسازی عصبی در عصب سیاتیک حیوانات آکسونوتمی است (۳۲، ۳۱).

روند نوسازی آکسونی پس از آسیب عصبی در نورون‌های حسی پس از فعالیت‌های ورزشی رخ می‌دهد (۳۲)؛ زیرا مشاهده شده است که هم در شرایط آسیب عصبی (۳۱) و هم در آزمودنی‌های سالم تعداد سلول‌های گانگلیونیک به‌دنبال فعالیت‌های ورزشی افزایش می‌یابد. فعالیت‌های ورزشی یک چالش حسی-حرکتی محسوب می‌شوند. این چالش هموستاز بدن را تغییر می‌دهد؛ بنابراین برای سازگاری یا حتی پاسخ به این چالش و ایجاد هموستاز عمومی مناسب جدید، اعصاب حسی و سلول‌های آن

1. Itoh

نیز باید افزایش یابند تا اطلاعات افزایش‌یافته از چالش‌های ایجادشده (به‌دنبال فعالیت‌های بدنی) مانند چالش‌های متابولیکی، همودینامیکی، حرکتی و... به سیستم عصبی مرکز ارسال شود. شاید افزایش تعداد سلول‌های عصبی و پروتئین NeuN (مارکر تمایز و تکامل سلول عصبی) در DRG نشانه‌ای از ایجاد سازگاری باشد.

نتایج مطالعهٔ حاضر و مطالعات پیشین نشان می‌دهند که افزایش تعداد سلول‌های عصبی-حسی در DRG و همچنین افزایش NeuN در اثر فعالیت ورزشی رخ می‌دهد. مکانیزم آن هنوز به‌خوبی روشن نیست، اما برخی پژوهش‌ها به نقش NO به‌عنوان یک عامل نورون‌زا اشاره کرده‌اند (۳۳). احتمالاً فعالیت شنا از طریق افزایش میزان NO موجب افزایش نورون‌زایی می‌شود. نکته‌ای که جالب به‌نظر می‌رسد این است که حتی فعالیت‌های ورزشی کوتاه‌مدت (سه و هفت روز در هفته) موجب افزایش طول آکسون نورون‌های حسی در DRG می‌شود؛ به‌طوری‌که افزایش مدت دویدن رابط مستقیم معناداری با افزایش طول آکسون حسی دارد (۳۲). برای اینکه رشد آکسون اتفاق بیفتد، به مدت کوتاهی نیاز است؛ زیرا پژوهش‌ها نشان داده‌اند رشد آکسون‌های عصبی کشت‌شدهٔ DRG فقط به دو تا چهار روز زمان نیاز دارند؛ این در صورتی است که سنتز RNA آن‌ها تنها در ۱۲ ساعت رخ می‌دهد (۳۴)، اما این فرایند در DRG موش‌ها به زمان بیشتری نیاز دارد که این زمان حدود ۱۵تا ۱۶ روز طول می‌کشد (۳۵). علاوه‌بر NO به‌نظر می‌رسد فعالیت بدنی با افزایش نوروتروفین‌ها نیز موجب فرایند نورون‌زایی می‌شود؛ زیرا مشخص شده است که تزریق مهارکنندهٔ گیرندهٔ نوروتروفین‌ها از افزایش نوروژنز جلوگیری می‌کند و افزایش فعالیت بدنی موجب افزایش mRNA نوروتروفین‌ها در DRG می‌شود (۳۲).

پیام مقاله

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت تمرین شنا نه‌تنها موجب افزایش تعداد سلول حسی می‌شود، بلکه باعث افزایش تمایز در بافت عصبی-حسی نیز می‌شود. احتمالاً افزایش تعداد سلول‌های عصبی-حسی یک مکانیزم سازگاری برای ارسال پیام‌های عصبی افزایش یافته باشد و از این طریق سیستم عصبی مرکزی اطلاعات بیشتری از شرایط هموستاز بدن در حین فعالیت بدنی دریافت می‌کند؛ بنابراین می‌توان گفت با افزایش تعداد سلول‌های حسی ناشی از فعالیت بدنی، احتمالاً اطلاعات دریافتی سیستم عصبی مرکزی از بدن بیشتر و دقیق‌تر صورت می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامهٔ دانشجوی مقطع کارشناسی‌ارشد نویسندهٔ اول در دانشگاه لرستان است. از مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان و تمام افرادی که در اجرای این پژوهش همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. Acta Naturae. 2015;7(2):42-7.
2. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society. 1996;44(10):1167-71.
3. You H, Kim YI, Im SY, Suh-Kim H, Paek SH, Park SH, et al. Immunohistochemical study of central neurocytoma, subependymoma, and subependymal giant cell astrocytoma. Journal of Neuro-Oncology. 2005;74(1):1-8.
4. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. Brain Res. 2004;1015(1-2):169-74.
5. Cannon JR, Greenamyre JT. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. Neurosci Lett. 2009;464(1):14-7.
6. Gil JM, Mohapel P, Araujo IM, Popovic N, Li JY, Brundin P, et al. Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. Neurobiol Dis. 2005;20(3):744-51.
7. Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development. 2001;128(3):353-63.
8. Torres BB, Caldeira FM, Gomes MG, Serakides R, de Marco Viott A, Bertagnolli AC, et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. International Journal of Experimental Pathology. 2010;91(6):530-6.
9. Atlasi MA, Mehdizadeh M, Bahadori MH, Joghataei MT. Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. Iranian Biomedical Journal. 2009;13(2):65-72.
10. Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Survival and regeneration of cutaneous and muscular afferent neurons after peripheral nerve injury in adult rats. Experimental Brain Research. 2008;186(2):315-23.

11. McKay Hart A, Brannstrom T, Wiberg M, Terenghi G. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. Experimental Brain Research. 2002;142(3):308-18.
12. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes. 2002;51(3):819-24.
13. Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. Protective effects of physical exercise in alzheimer's disease and parkinson's disease: a narrative review. Journal of Clinical Neurology. 2015;11(3):212-9.
14. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J Neurosci. 2005;25(38):8680-5.
15. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. Neuroscience. 2003;122(3):647-57.
16. Eadie BD, Redila VA, Christie BR. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. The Journal of Comparative Neurology. 2005;486(1):39-47.
17. Shin MS, Ko IG, Kim SE, Kim BK, Kim TS, Lee SH, et al. Treadmill exercise ameliorates symptoms of methimazole-induced hypothyroidism through enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 2013;31(3):214-23.
18. Cardoso GH, Petry DM, Probst JJ, de Souza LF, Ganguilhet G, Bobinski F, et al. High-intensity exercise prevents disturbances in lung inflammatory cytokines and antioxidant defenses induced by lipopolysaccharide. Inflammation. 2018;41(6):2060-7.
19. Suvarna SK, Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. Birmingham : Elsevier; 2008. P 540.
20. Kiernan J. Histological and histochemical methods: Theory and practice. Ontario. 2001 P 310.
21. Karim S, Hession C, Marconi S, Gang DL, Otis CN. The identification of ganglion cells in Hirschsprung disease by the immunohistochemical detection of ret oncoprotein. American Journal of Clinical Pathology. 2006;126(1):49-54.
22. Mojtahedi S, Kordi MR, Hosseini SE, Omran SF, Soleimani M. Effect of treadmill running on the expression of genes that are involved in neuronal differentiation in the hippocampus of adult male rats. Cell Biology International. 2013;37(4):276-83.
23. Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, et al. Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. Journal of Neural Transmission. 2011;118(9):1263-72.
24. Kim SE, Ko IG, Park CY, Shin MS, Kim CJ, Jee YS. Treadmill and wheel exercise alleviate lipopolysaccharide-induced short-term memory impairment by enhancing neuronal maturation in rats. Molecular Medicine Reports. 2013;7(1):31-6.

25. Shi TJ, Tandrup T, Bergman E, Xu ZQ, Ulfhake B, Hokfelt T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression. Neuroscience. 2001;105(1):249-63.
26. Lekan HA, Chung K, Yoon YW, Chung JM, Coggeshall RE. Loss of dorsal root ganglion cells concomitant with dorsal root axon sprouting following segmental nerve lesions. Neuroscience. 1997;81(2):527-34.
27. Kalcheim C, Barde YA, Thoenen H, Le Douarin NM. In vivo effect of brain-derived neurotrophic factor on the survival of developing dorsal root ganglion cells. EMBO J. 1987;6(10):2871-3.
28. Hoshi O, Sugizaki A, Cho Y, Takei N. BDNF reduces eEF2 phosphorylation and enhances novel protein synthesis in the growth cones of dorsal root ganglia neurons. Neurochemical research. 2018;43(6):1242-9.
29. Keeler BE, Liu G, Siegfried RN, Zhukareva V, Murray M, Houle JD. Acute and prolonged hindlimb exercise elicits different gene expression in motoneurons than sensory neurons after spinal cord injury. Brain Res. 2012;1438:8-21.
30. Liao CF, Yang TY, Chen YH, Yao CH, Way TD, Chen YS. Effects of swimming exercise on nerve regeneration in a rat sciatic nerve transection model. BioMedicine. 2017;7(1):3.
31. Teodori RM, Betini J, de Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SY, de Lima Montebelo MI. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. Neural Plasticity. 2011;2011:783901.
32. Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(22):8473-8.
33. Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. Journal of Molecular Neuroscience: MN. 2007;32(2):97-107.
34. Smith DS, Skene JH. A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. J Neurosci. 1997;17(2):646-58.
35. Kitao Y, Robertson B, Kudo M, Grant G. Neurogenesis of subpopulations of rat lumbar dorsal root ganglion neurons including neurons projecting to the dorsal column nuclei. J Comp Neurol. 1996; 371(2): 249-57.

استناد به مقاله

رستمی‌پور شکوفه، فتحی محمد، رحمتی مسعود. تأثیر تمرین شنا بر سلول‌های گانگلیونیک و میزان بیان پروتئین NeuN در گانگلیون ریشهٔ خلفی رت‌های نر ویستار. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۴۰۰؛ ۱۳(۴۹): ۱۰۶-۸۹.
شناسهٔ دیجیتال: 10.22089/spj.2019.7246.1893

Rostami Poor Sh, Fathi M, Rahmati M. The Effect of Swimming Training on Population of Ganglion Cell and Expression NeuN Protein in Dorsal Root Ganglion of Male Wistar Rats. Sport Physiology. Spring 2021; 13(49): 89-106. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2019.7246.1893

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی