

علوم زیستی ورزشی - زمستان ۱۳۹۵  
دوره ۸، شماره ۴، ص: ۴۸۰ - ۴۶۵  
تاریخ دریافت: ۹۲ / ۱۲ / ۲۶  
تاریخ پذیرش: ۹۳ / ۰۸ / ۱۸

## تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی بر بیان ژن SYD در نوروون‌های حرکتی رت‌های مبتلا به نوروپاتی دیابت

مریم فولادوند<sup>۱</sup> - رضا قراخانلو<sup>۲\*</sup> - احمد همت فر<sup>۲</sup> - مسعود رحمتی<sup>۴</sup>  
۱. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران ۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۳. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران ۴. استادیار، گروه تربیت بدنی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

### چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی بر بیان ژن SYD در نوروون‌های حرکتی رت‌های مبتلا به نوروپاتی دیابت بود. بدین منظور، دوازده سر رت صحرایی بالغ نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی در سه گروه چهارتایی دیابتی تمرین‌کرده (DT)، دیابتی تمرین‌نکرده (DC) و کنترل سالم (HC) قرار گرفتند. دو هفته پس از تزریق STZ برای القای دیابت، با اثبات نروپاتی دیابت توسط آزمون‌های رفتاری، پروتکل تمرین استقامتی اجرا شد. سپس نوروون‌های حرکتی L4-L6 بافت نخاع استخراج، و بیان ژن SYD به روش Real time-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد میانگین بیان ژن SYD در گروه DC نسبت به گروه HC به‌طور معناداری بالاتر بود. بیان ژن SYD در گروه DT نسبت به گروه DC نیز به‌طور معناداری کمتر بود. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت در نوروون‌های حرکتی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی mRNA SYD در پیام‌رسانی آسیب نوروونی درگیر است و ورزش به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی، می‌تواند آن را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند.

### واژه‌های کلیدی

بیان ژن، تمرین استقامتی، دیابت، نوروپاتی SYD.

## مقدمه

نروپاتی ایجاد شده از طریق بیماری دیابت، توزیع آناتومیکی، دوره‌های درمانی، و احتمالاً سازوکارهای سبب‌شناسی مختلفی را دربرمی‌گیرد. هر یک از این موارد به‌وسیله آسیب متمرکز یا پراکنده به تارهای عصبی خودمختار یا سوماتیک محیطی ویژگی می‌یابند که ناشی از دیابت است. براساس نتایج مطالعات اختلالات پروتئین کینازهای عصبی، از اصلی‌ترین مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در توسعه نروپاتی ناشی از بیماری دیابت است (۱۸). از سوی دیگر، پروتئین کینازهای c-Jun N-terminal (JNK)، یکی از سه خانواده پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوزن<sup>۱</sup> (MAPK) هستند که ایزوفرم‌های مختلف آن از طریق پیرایش متنوع سه ژن JNK1، JNK2، و JNK3 شکل می‌گیرند (۱۵). JNK1 و JNK2 به‌طور گسترده در همه بافت‌ها بیان می‌شوند؛ درحالی‌که JNK3 به‌صورت انتخابی در مغز، قلب و بیضه‌ها بیان می‌شود (۴۱). پروتئین‌های ساختمانی JNK شامل پروتئین‌های تعامل‌کننده با JNK<sup>۲</sup> (JIP) (۵۲)، IKAP<sup>۳</sup>، بتاآرستین-۲، POSH<sup>۴</sup> (۱۷) و فیلامین هستند. در این میان، خانواده JIP در تعدیل سیگنال‌های استرس، مخروط‌های رشد نورون‌ها، جوانه زدن، نوزایش و انتقال آکسونی شرکت می‌کنند (۱۴،۳۱). پروتئین SYD<sup>۵</sup> از خانواده پروتئین‌های JIP است که با JNK تعامل دارد. همچنین به‌عنوان JIP3 (۳۰) و JSAP1 (۲۷)<sup>۶</sup> شناخته شده است. این پروتئین کیناز در یکپارچگی پیام‌رسانی JNK و انتقال وابسته به کاینزین نقش دارد، به‌طوری‌که از طریق تعامل با کاینزین و افزایش جنبش‌پذیری آن، به تعدیل انتقال آکسونی انواع گونه‌های وزیکولی منجر می‌شود (۶).

براساس نتایج مطالعات SYD در استقرار وزیکول‌های سیناپسی (۴۴) و عبور و مرور اندامک‌های غشایی درگیر است. همچنین اندوزوم‌های مرتبط با SYD در حمل پیام‌های آسیب از مکان آسیب به سمت جسم سلولی نقش دارند (۱). مطالعات انجام‌گرفته روی دیگر بیماری‌های تخریب عصبی مانند آلزایمر (۲۸،۳)، هانتینگتون (۲۸) و پارکینسون (۲۸)، نقصان‌های عصبی را به اختلال در پیام‌رسانی SYD نسبت داده‌اند. همچنین هدف‌گیری نورون‌ها در بیماری دیابت، خصوصیات منحصربه‌فردی دارد، به‌گونه‌ای که مطالعه پیشین ما، مبنی بر درگیر بودن SYD در پیام‌رسانی آسیب نورون‌های حسی

1. mitogen-activated protein kinases
2. JNK-interacting protein
3. IKB kinases- complex- associated protein
4. plenty of SH3s
5. Sunday Driver
6. c-Jun NH2- terminal kinase/stress- activated protein kinase- associated protein 1

رت‌های دارای نروپاتی دیابت از طریق تنظیم افزایشی mRNA SYD، بود (۲۰). این در حالی است که در مورد درگیر بودن نورون‌های حرکتی در اختلال انتقال آکسونی مطالعه‌ای انجام نگرفته است. به‌طور کلی، نورون‌های حرکتی در بیماری دیابت هدف اصلی نیستند، اما این موضوع در مطالعات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. کاهش سرعت هدایت عصبی- حرکتی، یکی از مواردی است که این موضوع را تأیید می‌کند؛ اگرچه سرعت هدایت کاهش‌یافته، ضرورتاً منعکس‌کننده تغییرات ساختاری آکسون به‌شمار نمی‌رود (۵۴). به هر حال، شاخص‌های کلینیکی در ارتباط با درگیری آکسون‌های حرکتی در نروپاتی دیابت همچون اتصالات عصبی-عضلانی غیرپایدار وجود دارد. همچنین دوره‌های طولانی‌مدت DPN با کاهش پتانسیل عمل عضلانی ترکیبی حرکتی تحتانی در تلاش‌های انسانی همراه بوده است (۲). از سوی دیگر، اثر ورزش بر بهبود نقصان عملکرد عصبی در شرایط طبیعی و پاتولوژیک به اثبات رسیده است؛ به‌گونه‌ای که فعالیت افزایش‌یافته به شکل تمرین ورزشی منظم می‌تواند شکل‌پذیری مغز (۱۳)، سیستم ضد اکسایشی (۳۸) و تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها را ارتقا بخشد (۳۹) و از آپوپتوز سلول‌های عصبی جلوگیری کند (۱۱). ورزش همچنین می‌تواند بیوسنتز RNA (۲)، افزایش انتقال آکسونی (۲۳)، و افزایش میزان جوانه‌زنی عصبی به‌دنبال برش عصبی را به‌همراه داشته باشد (۱۳).

با توجه به درگیر بودن نورون‌های حرکتی در نروپاتی دیابت و اختلال پیام‌رسانی SYD/JIP3 در بسیاری از اختلالات ناشی از برخی بیماری‌های تخریب عصبی (۲۸،۳)، احتمال می‌رود که در نقصان‌های حرکتی ناشی از بیماری نروپاتی دیابت نیز نقش داشته باشد و از سوی دیگر، ممکن است ورزش به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی نیز آثار سودمندی بر این پروتئین‌کیناز داشته باشد. براساس اطلاعات موجود، تاکنون اختلالات احتمالی SYD در نروپاتی دیابت و اثر ورزش استقامتی بر آن بررسی نشده است. از این‌رو در پژوهش حاضر بیان ژن SYD در نورون‌های حرکتی ریشه‌های نخاعی عصب سیاتیک رت‌های نروپاتی دارای نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی بررسی می‌شود.

### روش تحقیق

در پژوهش حاضر دوازده سر رت صحرائی بالغ نر ده‌هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی  $271/3 \pm 11/2$  گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل‌شده محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، 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 توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس بررسی و تأیید شد. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب  $326/3 \pm 8/4$  گرم برای القای نروپاتی دیابت (۹)، رت‌ها به‌طور تصادفی در سه گروه چهارتایی قرار گرفتند: گروه اول (گروه دیابت تمرین‌کرده)، گروه دوم (گروه دیابت تمرین‌نکرده) و گروه سوم (گروه کنترل سالم). دو هفته پس از القای دیابت، آزمایش‌های رفتاری درد نروپاتیک به‌عنوان شاخص عملکرد نوروپاتی حرکتی (۷) اجرا شد و پس از اطمینان یافتن از حصول نروپاتی نوروپاتی حرکتی در رت‌ها (۳۲)، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گرفت (۱۱). ابتدا در 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 روی نوار گردان راه رفتند. به‌منظور سازگاری جهت آزمایش‌های رفتاری نیز 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 (۴۵). سرانجام، به‌منظور 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 نروپاتیک در گروه‌های دیابتی، پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گرفت (۱۱). تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد. همچنین، به‌منظور اجتناب از عوامل مداخله‌گر مانند آنتی‌نوسیسپشن القا شده از طریق استرس، آزمایش‌های رفتاری نیز میان ساعت‌های ۷ تا ۱۰ صبح به‌عمل آمد (۴۵).

#### القای دیابت

به‌منظور القای دیابت نوع اول، پس از دوازده ساعت محرومیت از غذا، محلول STZ (Sigma, St. )  $45 \text{ mg/Kg}$  حل‌شده در بافر سیترات تازه  $0/5 \text{ mol/L}$ ،  $\text{pH}: 4/5$  به‌صورت درون‌صفاقی تزریق شد. به رت‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک به‌وسیله لانسیت 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 قند خون آنها بالاتر از  $300 \text{ mg/dL}$  بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۹). شایان ذکر است

با توجه به احتمال مرگومیر و عدم دیابتی شدن ناشی از تزریق STZ، تعداد دوازده رت جهت این کار در نظر گرفته شد که دو سر از آنها پس از تزریق از بین رفتند و در نهایت از میان رت‌های باقی‌مانده، هشت سر به‌عنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند. با توجه به اینکه میزان تزریق STZ و وزن حیوانات قبل از تزریق STZ، دو عامل مهمی‌اند که پیدایش دیابت نروپاتیکی را به‌همراه دارند (۱،۳)؛ از این‌رو برای کاهش حساسیت بیماری و تأثیرات جانبی به سطح قابل قبول، از کمترین میزان تزریق STZ و مطابق با وزن حیوانات (۹)، استفاده شد. شایان ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، علائم ناشی از تزریق اشتباه، مانند تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نشد.

#### نحوه اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی

به‌منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفت. به‌منظور عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه مشبک قرار گرفتند. برای سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۶۰، ۲۶، ۱۵، ۸، ۶، ۴، ۲) ساخت شرکت Stoltting, USA جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع می‌شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به‌ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده شد. چنانچه دو بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌شد، همان وزنه به‌عنوان آستانه پس کشیدن پنجه Paw Withdrawal Threshold (PWT) محسوب می‌شد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. چنانچه حیوان به هیچ‌یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. همچنین، هر آزمایش سه بار و به‌تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به‌عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور شد (۸). به‌طور کلی، سنجش آلودینا مکانیکی، قبل از تزریق STZ و چهارده روز پس از تزریق به‌عمل آمد. شایان ذکر است در مطالعات حیوانی از این روش، به‌عنوان روشی کارآمد برای سنجش رفتارهای درد نروپاتیکی (۹،۷) و اثبات نروپاتی نوروهای حرکتی (۹،۱۲،۳۳،۴۲،۴۶) استفاده شده است.

### نحوه اندازه‌گیری هایپرالژیای حرارتی

هایپرالژیای حرارتی با استفاده از روش هارگریوز<sup>۱</sup> با کمی تغییر مورد سنجش قرار گرفت (۲۴). به‌طور خلاصه، با استفاده از دستگاه (Ugo Bassil, Italy) Radiant heat plantar test حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی‌گلاس (طول ۲۲ cm × عرض ۲۲ cm × ارتفاع ۱۳/۳ cm) و روی صفحه پلکسی‌گلاس 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 بین سطح پلکسی‌گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی به‌وسیله 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 پنجه Paw Withdrawal Latency (PWL) میزان تحمل حیوان نسبت 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 هایپرالژیای حرارتی قبل از تزریق STZ و چهارده روز پس از تزریق به‌عمل آمد. شایان ذکر است در مطالعات حیوانی از این روش، به‌عنوان روشی کارآمد برای سنجش رفتارهای درد نروپاتیک (۹۰۷) و اثبات نروپاتی نوروهای حرکتی (۴۶،۴۲،۳۳،۱۲،۹) استفاده شده است.

### پروتکل تمرین

در پژوهش حاضر از سرعت تمرینی ۱۸-۱۰ متر در دقیقه معادل ۶۰-۷۰ درصد  $\dot{V}O_{2max}$  و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک (۱۱)، استفاده شد؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوار گردان با شدت متوسط 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 برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۷-۱۸ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. به‌منظور رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند (۱۱).

### 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) (۳۷) که در رت، میان دنده‌های T10-T12 (۲۵-۲۰ mm) قرار گرفته‌اند (۳۴)، 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 (۵)، در نیتروژن  $-80^{\circ}\text{C}$  منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت حسی به‌صورت جداگانه، برای استخراج total RNA به نسبت یک به ده در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در  $0\text{C}$ ، ۴ min، ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت یک به نیم با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در  $0\text{C}$ ، ۴ min، ۱۵۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش حاوی 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  $0\text{C}$ ، ۴ min، ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در  $20\ \mu\text{L}$  آب RNase-free حل شد. غلظت RNA مورد سنجش واقع 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

اندازه‌گیری سطوح بیان SYD mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام گرفت (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی  $20\ \mu\text{L}$  و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های SYD و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵

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

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Primer sequence	GenBank code
SYD	For: 5'-CCAGCTACCAGTGTCCAAACGAT-3'	NM_001100673
	Rev: 5'-CTTTGTGACACTGCCATAGTCCC-3'	
GAPDH	For: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'	NM_017008
	Rev: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	

### تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای مورد مطالعه از تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد. به منظور آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر LSD به عمل آمد. سطح معنادار نیز  $\alpha = 5\%$  در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS/Win نسخه ۱۶ انجام گرفت.

### نتایج و یافته‌های تحقیق

تمام رت‌ها در گروه تمرینی شش هفته تمرین استقامتی را به‌طور مداوم انجام دادند. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (تمرین  $\times$  دیابت) حاکی از اثر معنادار تمرین بر بیان ژن SYD ( $F=9/01$ ,  $P=0/002$ ) و اثر تعاملی ( $F=9/9$ ,  $P=0/008$ ) بین دو متغیر مذکور بود.

میانگین تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپیرآلزیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنادار کمتر بود ( $P=0/0001$ ). همچنین، در همان زمان، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودینیا مکانیکی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنادار کمتر بود ( $P=0/0001$ ) (جدول ۱).

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم به‌طور معنادار بالاتر بود ( $P=0/0001$ ) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنادار برخوردار بود ( $P=0/0001$ ). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت تمرین‌نکرده به‌طور معنادار پایین‌تر بود ( $P=0/0001$ ) (نمودار ۱).



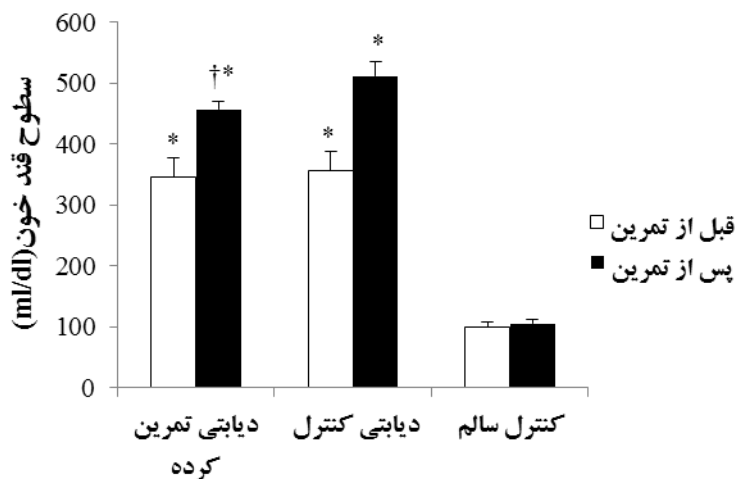
وزن اولیه گروه‌ها نیز اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ( $P=0/7$ ). اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه تمرین و کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم به‌طور معنادار کمتر بود (به‌ترتیب  $P=0/001$  و  $P=0/001$ ). همچنین، میانگین وزن گروه دیابت تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت تمرین‌نکرده به‌طور معنادار کمتر بود ( $P=0/04$ ) (نمودار ۲).

پس از شش هفته تمرین استقامتی، میانگین بیان ژن SYD در گروه دیابت تمرین‌نکرده نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنادار بالاتر بود ( $P=0/001$ ). بیان ژن SYD در گروه دیابتی تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت تمرین‌نکرده نیز به‌طور معنادار کمتر بود ( $P=0/001$ ). بین میزان بیان ژن SYD در گروه دیابت تمرین‌کرده نسبت به گروه کنترل سالم نیز اختلاف معنادار مشاهده نشد ( $P=0/9$ ) (نمودار ۳).

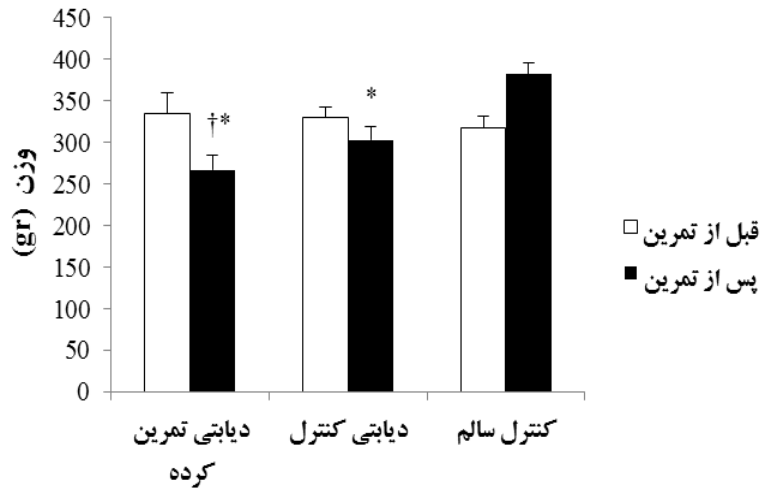
جدول ۲. مقادیر آلودینیا مکانیکی و هایپرآلژیا حرارتی در گروه‌های سه‌گانه (Mean±SD)

گروه	کنترل سالم	دیابت تمرین نکرده	دیابت تمرین کرده
متغیر			
آلودینا مکانیکی	$60 \pm 0$	$21/28 \pm 5/87$	$19/71 \pm 8/17$
هایپرآلژیا حرارتی	$12/68 \pm 0/62$	$8/88 \pm 1/12$	$8/98 \pm 1/28$

\* اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم ( $P < 0/01$ )



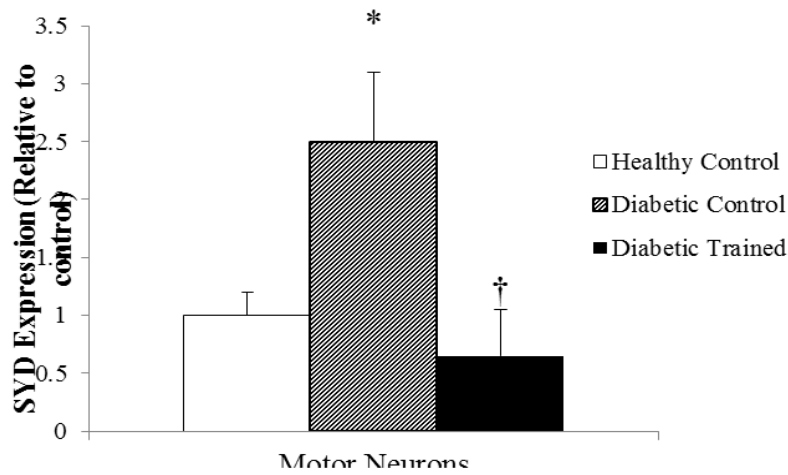
نمودار ۱. تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف  
 \* اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم ( $P < 0/01$ )  
 † اختلاف معنادار با گروه دیابت تمرین نکرده ( $P < 0/01$ )



نمودار ۲. تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف

\* اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم ( $P < 0.01$ )

† اختلاف معنادار با گروه دیابت تمرین نکرده ( $P < 0.01$ )



نمودار ۳. میزان بیان ژن SYD در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل

\* اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین نکرده ( $P < 0.05$ )

† اختلاف معنادار با گروه دیابت تمرین نکرده ( $P < 0.05$ )

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیماری دیابت به افزایش mRNA SYD در نورون‌های حرکتی رت‌های دیابتی منجر می‌شود. همسو با این نتیجه، مطالعاتی مبنی بر درگیر بودن SYD/ JIP3 در دیگر بیماری‌های تخریب عصبی به انجام رسیده است. برای مثال، پرین و همکاران نشان دادند که فعال‌سازی JNK در بیماری هانتینگتون (HD) درگیر بوده و مسدود کردن این مسیر بهبود بسیاری از اختلالات عصبی را در این بیماری به‌همراه داشته است (۳۶). پن و همکاران نیز نشان دادند که فعال‌سازی JNK در بیماری پارکینسون نیز درگیر بوده و مهار انتخابی فعال‌سازی مسیر میتوکندریایی خانواده JNK در درمان این بیماری مؤثر است (۳۶). همچنین، نشان داده شده SYD با تبدیل کاینزین-۱ از حالت غیرفعال به فعال، به افزایش جنبش‌پذیری آن و تنظیم مثبت انتقال آکسونی رو به جلو منجر می‌شود (۶). این در حالی است که تغییر و تبدیل‌های پس‌ترجمه‌ای پس از وقوع آسیب‌دیدگی در عصب سیاتیک، موجب تضعیف اتصال SYD به کاینزین و تقویت اتصال آن به مجموعه داینین-داین اکتین می‌شود (۱۰). این موضوع نشان می‌دهد که در شرایط آسیب‌دیدگی عصبی، SYD با تغییر توازن جهت انتقال آکسونی، به اختلال در انتقال آکسونی رو به جلو منجر می‌شود. از این رو با توجه به نتایج پژوهش حاضر، می‌توان گفت که احتمال می‌رود SYD در انتقال آکسونی رو به جلو اختلال یافته در بیماری نروپاتی دیابت درگیر باشد. در تأیید این موضوع، نشان داده شده انتقال آکسونی رو به جلو BDNF (۱۹) و P75 (۱۶) در عصب سیاتیک رت‌های دیابتی شده توسط STZ کاهش یافته است.

نتایج همچنین نشان داد تمرین استقامتی موجب تعدیل و به سطوح نرمال رساندن بیان ژن SYD در نورون‌های حرکتی رت‌های دیابتی تمرین‌کرده می‌شود. این نتیجه همسو با مطالعاتی است که نشان داده‌اند تمرین استقامتی موجب بهبود عملکرد و ساختار نورون‌های حرکتی می‌شود. قراخانلو و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که فعالیت افزایش‌یافته به شکل تمرین استقامتی موجب افزایش در محتوای CGRP آکسون و جسم سلولی موتونورون‌های نخاعی می‌شود (۲۳). از سوی دیگر، گاردینر<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۴) نشان دادند که عصب‌زدایی جزئی عضلات نعلی و پلانتر در رت‌هایی که سابقه ورزش ده‌هفته‌ای تمرین استقامتی داشته‌اند، موجب افزایش جوانه‌زنی در عضله پلانتر شده است. آنها بیان کردند تمرین ورزشی موجب تغییراتی در نورون‌های حرکتی می‌شود و جوانه‌زنی کوتاه‌مدت نورون‌های

حرکتی عضله تندانقباض را ارتقا می‌بخشد (۲۱). همچنین کاندا<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۹۶) پس از بررسی تأثیر فعالیت افزایش‌یافته بر مرگ سلول عصبی در نورون‌های حرکتی عصب‌رسان عضله دوقلوی میانی طبیعی و دچار اضافه‌بار شده در رت‌های سالمند دریافتند که مواجهه‌سازی عضله دوقلوی میانی با اضافه‌بار نمی‌تواند کاهش مرتبط با سن نورون‌های حرکتی عصب‌رسان این عضله را به تعویق اندازد (۲۹).

در زمینه شناسایی سازوکارهای درگیر در بهبود عملکرد نورون‌های حرکتی در اثر تمرین ورزشی نیز مطالعات بسیاری انجام گرفته است. برای مثال، چن و همکاران تأثیر تمرین ورزشی بر بهبود عملکرد نورون‌های حرکتی را به کاهش بیان IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  و افزایش سطوح Hsp72 در عصب سیاتیک نسبت داده‌اند (۱۲). شارما و همکاران این موضوع را به افزایش وابسته به ورزش بیان mRNA و سطوح پروتئین NT-3 در عضله اسکلتی نسبت داده‌اند (۴۵). این مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت افزایش‌یافته به شکل تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش سایتوکاین‌های التهابی و پیش‌التهابی، افزایش محتوای اپوپتیدهای درون‌زا و عوامل نروتروفیک، به بهبود وضعیت نورون‌های حرکتی بینجامد. از سوی دیگر، هایپرگلیسمی مزمن موجب تحمیل استرس‌های اکسایشی و آپوپتوزی به سلول‌ها و بافت‌های دیابتی (۵۱،۳۵) و اختلال در کینتیک موتور پروتئین KIF1A می‌شود (۴). این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد در مقایسه با گروه دیابتی تمرین‌نکرده، تمرین ورزشی با شدت متوسط موجب کاهش معنادار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. همچنین براساس نتایج مطالعات ورزش سبب کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن مفید می‌شود. به‌علاوه، نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را افزایش دهد (۱۲). از این رو در پژوهش حاضر، این احتمال می‌رود که ورزش از طریق تأثیر بر کاهش غلظت گلوکز خون موجب توقف یا تضعیف فرایند آسیب در نورون‌های حرکتی رت‌های دیابتی تمرین‌کرده گشته است. اگرچه این امر در تحقیق حاضر مستقیماً بررسی نشد.

به‌طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که احتمال می‌رود تنظیم افزایشی SYD/JIP3 mRNA، در پیام‌رسانی آسیب نوروئی درگیر باشد و تمرین استقامتی می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی، این افزایش را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند. از این رو از تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌عنوان یکی از مهارکننده‌های SYD/JIP3، می‌توان برای درمان اختلالات ناشی از بیماری نروپاتی دیابت استفاده کرد.

## سیاسگزاری

در پایان مراتب تقدیر و تشکر خود را از آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ابراز می‌داریم.

## منابع و مأخذ

1. Abe N, Almenar-Queralt A, Lillo C, Shen Z, Lozach J, Briggs SP, Williams DS, Goldstein LS, Cavalli V. (2009). "Sunday driver interacts with two distinct classes of axonal organelles". *J BiolChem*. 284: 34628–34639.
2. Andersen H, Gjerstad MD, Jakobsen J. (2004). "Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy". *Diabetes Care*; 27:2382–5.
3. Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. (2011). "JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases". *J Alzheim Dis*; 24, 633–642.
4. Baptista FI, Gaspar JM, Cristóvão A, Santos PF, Köfalvi A, Ambrósio AF. (2011). "Diabetes induces early transient changes in the content of vesicular transporters and no major effects in neurotransmitter release in hippocampus and retina". *Brain Res.*;1383:257-69.
5. Berger JV, Deumens R, Goursaud S, Schäfer S, Lavand'homme P, Joosten EA, Hermans E. (2011). "Enhanced neuroinflammation and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats expressing mutated superoxide dismutase 1". *J Neuroinflammation*, 13; 8:33.
6. Bowman, A.B., Kamal, B.W. Richtings, A. Philp, M. McGrail, J.G. Gindhardt, and L.S.B. Goldstein. (2000). "Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the Sunday driver (SYD) protein. *Cell*". 103:583-594.
7. 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.
8. 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.
9. Calcutt NA. (2004). "Modeling diabetic sensory neuropathy in rats". *Methods Mol Med*; 99:55-65.
10. Cavalli V, Kujala P, Klumperman J, Goldstein LS (2005). "Sunday Driver links axonal transport to damage signaling". *J Cell Biol* 168:775–787.
11. 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 signalregulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus". *Neuroscience*; 164, 1665–1673.

12. 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". *AnesthAnalg*; 114: 1330-7.
13. Cotman, C.W., Berchtold, N.C. (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity". *Trends Neurosci*; 25: 295-301.
14. Dajas-Bailador F, Jones EV, Whitmarsh AJ. (2008). "The JIP1scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons". *CurrBiol*; 18, 221-226.
15. Davis RJ. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". *Cell*; 103, 239-252.
16. Delcroix, J., Michael, G.J., Priestley, J.V., Tomlinson, D.R., Fernyhough, P. (1998). "Effect of nerve growth factor treatment on p75NTR gene expression in lumbar dorsal root ganglia of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*"; 47, 1779-1785.
17. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, GreenbergME, Sawyers CL, Davis RJ. (1997). "A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway". *Science*; 277, 693-696.
18. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. (2008). "Diabetic neuropathy: mechanisms to management". *PharmacolTher*; 120(1):1-34.
19. Fernyhough, P., Diemel, L.T., Brewster, W.J., Tomlinson, D.R. (2013). "Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats". *J. Neurochem* 1995; 64, 1231-1237.
20. Fouladvand, M., Gharakhanlou, R., Hematfar, A., Rahmati, M. (2013). "
21. Gardiner, P. F., Michel, R., & Iadeluca, G. (1984). "Previous exercise training influences functional sprouting of rat hindlimb motoneurons in response to partial denervation". *Neuroscience letters*; 45(2), 123-127.
22. Gerchman, L., Edgerton, V. and Carrow, R. (1975). "Effects of physical training on the histochemistry and morphology of ventral motor neurons". *Exp. Neurol*; 49:790-801.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Huang SH, Duan S, Sun T, Wang J, Zhao L, et al. (2011). "JIP3 mediates TrkB axonal anterograde transport and enhances BDNF signaling by directly bridging TrkB with kinesin-1". *J Neurosci* 2011; 31: 10602-10614.
27. Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., & Yamamoto, M. (1999). "Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress". *Free Radic Res* 31(4), 319-324.

28. Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Beas-Zarate C, Pallàs M, Auladell C and et al. (2012). "Role of JNK in neurodegenerative diseases". *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II*; 37 (2): 15-28.
29. Kanda K, Hashizume K, Takashi M, Yasuko M. (1996). "Overloading a muscle does not alter the rate of motoneuronal loss in aged rats". *J Neurobio of Aging*, 17: 613-617.
30. Kelkar, N., S. Gupta, M. Dickens, and R.J. Davis. (2000). "Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3". *Mol. Cell. Biol.* 20:1030–1043.
31. Koushika SP. (2008). " "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport". *Bioessays*; 30, 10-14.
32. Kuhad A, Chopra K. (2009). "Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy". *Neuropharmacology* 57(4):456-62.
33. Lee JH, McCarty R. (1990). "Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats". *PhysiolBehav*; 47: 225-230.
34. Liu S, Bréjot T, Cressant A, Bacci J, Saïd G, Tadié M, et al. (2005). "Reinnervation of hind limb extremity after lumbar dorsal root ganglion injury". *ExpNeurol*; 196(2):401-12.
35. Obrosova IG. (2009). "Diabetes and the peripheral nerve. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*".1792(10):931-40.
36. Perrin V, Dufour , N , Raoul , C , Hassig , R , Brouillet , E , et al. (2009). "Implication of the JNK pathway in a rat model of Huntington's disease". *ExpNeurol*; 215: 191–200.
37. 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.
38. Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A.W., Ohno, H., Nakamoto, H., Goto, S. (2000). "Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fraction of rat skeletal muscle". *Arch. Biochem. Biophys*; 383: 114–118.
39. Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S. (2006). "The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain". *Neurochem.Int*; 49, 387–392.
40. Rahmati M, Khazani A, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Manaheji H. (2013). "Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats". *PhysiolPharmacol*; 16 (4): 435-445.
41. Resnick L, Fennell M. (2004). "Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders". *Drug Discov Today*; 9, 932- 939.
42. 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.
43. Said G. (2007). "Diabetic neuropathy: a review". *Nat ClinPractNeurol*; 3:331–340.

44. Sakamoto R, Byrd DT, Brown HM, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y (2005). "The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization". *Mol Biol Cell* 16: 483–496
45. Sharma NK, Ryals JM, Gajewski BJ, Wright DE. (2010). "Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain". *PHYS THER*; 90:714-725.
46. Sluka KA and Rasmussen LA. (2010). "Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle Inflammation". *Pain*; 148(2): 188.
47. Steiner JL, Murphy E A, McClellan JL, Carmichael MD and Mark J. (2011). "Exercise Training Increases Mitochondrial Biogenesis in the Brain". *J Appl Physiol*; 111: 1066–1071.
48. Stokin GB, Goldstein LS. (2006). "Axonal transport and Alzheimer's disease". *Annu Rev Biochem*; 75:607– 627.
49. Szilvássy Z, Németh J, Kovács P, Paragh G, Sári R, Vigh L, Peitl B. (2012). "Insulin resistance occurs in parallel with sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats: differential response to early vs late insulin supplementation". *Metabolism*; 61(6):776-86.
50. Takino T, Nakada M, Miyamori H, et al. (2005). "JSAP1/JIP3 cooperates with focal adhesion kinase to regulate c-Jun N-terminal kinase and cell migration". *J of biological chemistry*; 280(45):37772–81.
51. Tomlinson DR, Gardiner NJ. (2008). "Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*". 9(1):36-45.
52. Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ. (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation". *Science*; 281, 1671-1674.
53. Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E. (2008). "c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons". *J Neurochem*; 104(2):325-35.
54. Zochodne DW, Ramji N, Toth C. (2008). "Neuronal Targeting in Diabetes Mellitus: A Story of Sensory Neurons and Motor Neurons". *The Neuroscientist*. 14(4):311-8.