مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۲ خرداد و تیر ۱۳۹۰ صفحات ۴۸-۴۳

نقش فاکتور نوروتروفیک مغزی در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در هیپوکامپ رت‌های دیابتی

ایرج صالحی: گروه فیزیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
مصطفی محمدی: مرکز تحقیقات کاربردیی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
Email: M.Mohammadin@ yahoo.com
صفر فرج نیا: مرکز تحقیقات کاربردیی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محمد رضا بنیادی: مرکز تحقیقات کاربردیی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۸/۷/۲۰ ، **پذیرش**: ۸۹/۵/۶

چکیده

زمینه و اهداف: دیابت ملیتوس منجر به اختلالات گسترده‌ای در سیستم اعصاب محیطی و مرکزی می‌گردد. شیوع اختلالات شناختی در بیماران دیابتی نسبت به افراد غیر دیابتی بیشتر می‌باشد. فاکتور نوروتروفیک مغزی با تحریک سنتز فاکتورهای آنتی‌آپوپتتیک در محیطهای کشت از مرگ سلولی جلوگیری می‌نماید. در مطالعه حاضر اثرات دیابت تجربی بر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در هیپوکامپ و ارتباط آن با میزان و بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۲۰ عدد موش صحرایی نر ویستار (۲۰±۲۰۰ گرم) به ۲ گروه ۱۰ تایی دیابتی و کنترل تقسیم شدند. دیابت بوسیله تزریق تک دوز استرپتوزوتوسین (۵۰ mg/kg) ایجاد گردید. مدت مطالعه ۸ هفته بود. پس از پایان دوره آزمایش، بدنبال بیهوشی حیوانات با تیوپنتال سدیم (۵۰ mg/kg)، مغز خارج و پس از جدا کردن هیپوکامپ در روی یخ، در نیتروژن مایع منجمد و به یخچال ۸۰- درجه تا زمان آزمایش منتقل گردید. هیپوکامپ در بافر تهیه شده هموژن و پس از سانتریفوژ، سوپرناتانت بدست آمده جهت اندازه‌گیری میزان آپوپتوز، محتوای BDNF هیپوکامپ و میزان بیان ژنی BDNF استفاده گردید.

یافته‌ها: افزایش در میزان آپوپتوزیس بدنبال القای دیابت مشاهده گردید. همچنین القای دیابت در رت‌ها موجب افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در غلظت پروتئین BDNF و بیان ژن آن نسبت به گروه کنترل گردید.

نتیجه گیری: القای دیابت باعث افزایش میزان آپوپتوز در هیپوکامپ رتهای دیابتی گردیده و به عنوان مکانیسم دفاعی افزایش مقدار و بیان ژن BDNF از روند آپوپتوز در این بافت جلوگیری می‌نماید.

کلید واژه ها: دیابت، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز ، آپوپتوزیس، هیپوکامپ

مقدمه

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیک می‌باشد که بوسیله بالا رفتن قند خون بدنبال افزایش مقاومت در برابر اثر انسولین، نقص در ترشح انسولین و یا هر دو بطور توام ایجاد می‌گردد (۱). این بیماری منجر به اختلالات گسترده‌ای در سیستم اعصاب محیطی و مرکزی می‌گردد (۲). شیوع اختلالات شناختی در بیماران دیابتی نسبت به افراد غیر دیابتی بیشتر می‌باشد (۳ و ۴). همچنین وقوع بیماری آلزایمر نیز در این بیماران دو برابر افراد غیردیابتی می‌باشد (۵). جنبه‌های مختلف ارتباط بین دیابت و بیماری های نورودژنراتیو هنوز بطور کامل شناخته نشده‌اند. در سالهای اخیر مطالعات تجربی و بالینی نشان داده‌اند که هیپرگلیسمی و یا نقص در ترشح انسولین به تنهایی ممکن است مسئول اختلال در عملکرد شناختی در بیماری دیابت باشند. Kramer و همکاران

نشان داده‌اند که بیماران مبتلا به دیابت نوع اول دچار کاهش وابسته به طول مدت بیماری در عملکرد شناختی می‌باشند که ارتباطی با دوره های هیپوگلیسمی در این بیماری ندارد (۶). بطور مشابهی Schoenle و همکاران نشان داده‌اند که اختلال در عملکرد شناختی و نقصان ذهنی در اطفال مبتلا به بیماری دیابت نوع اول بدون تجربه دوره‌های هیپوگلیسمی بوجود می‌آید (۷). اختلالات شناختی با تشخیص در دوران جوانی، جنس مذکر و وضعیت متابولیکی در زمان تشخیص مرتبط می باشد.

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده[1] (آپوپتوزیس) یک فرایند بیولوژیک می‌باشد که اساسا از کرمها به پستانداران رسیده است (۱۰-۸) و به شدت توسط یک برنامه خودکشی کدگذاری شده داخلی که مستلزم تنظیم هماهنگ ژن‌های اختصاصی است، تنظیم می‌شود (۱۱). ضرورت انجام آپوپتوزیس در ارگانیسم‌های پرسلولی بطور گسترده ای پذیرفته شده است زیرا این فرایند برای حفظ سلول‌های بدون عملکرد، اشتباه جایگزین شده، غیرطبیعی و یا آسیب دیده مورد نیاز بوده و بدین شکل نقش غیرقابل اجتنابی در رشد جنینی، تجدید شرایط پایدار بافت و دفاع ایمونولوژیک ایفا می‌کنند (۱۲). آپوپتوزیس در طی بیماری دیابت همانند سایر عوارض طولانی مدت این بیماری رخ می‌دهد. آپوپتوزیس در سلولهای بتای پانکراس بیماران دیابتیک نوع اول (۱۳ و ۱۴)، در رتینوپاتی دیابتی (۱۵)، و نفروپاتی (۱۶) گزارش شده است. بهرصورت گزارشات در خصوص آپوپتوزیس در مغز دیابتی تابحال اندک می‌باشند اگرچه وقوع آپوپتوزیس در اختلالات نورودژنراتیو متعددی مانند بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون و در اسکلروزیس جانبی آمیوتروفیک نشان داده شده است (۱۷).

در سالهای اخیر، توجه ویژه‌ای به نقش احتمالی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز[2] (BDNF) در سیستم اعصاب مرکزی معطوف گردیده است. BDNF بعنوان یکی از فاکتورهای نوروتروفیک اصلی موجود در مغز، نقش محوری در پروسه یادگیری، رفتار، تحرک، حافظه و طیف وسیعی از پاسخ‌های در برابر استرس را بعهده دارد (۱۸). همچنین BDNF نقش مهمی در نگهداری و رشد سیستم‌های عصبی متعدد شامل تنظیم نوروژنزیس، نوروپلاستیسیتی و بقای سلولی را بطور احتمالی بعهده دارد (۱۹). از طرف دیگر BDNF با تحریک سنتز فاکتورهای آنتی آپوپتیک مانند BCL-2 در محیطهای کشت از مرگ سلولی جلوگیری می‌نماید (۲۰). در مطالعه حاضر بدنبال القای دیابت تجربی، اثرات افزایش قند خون بر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در هیپوکامپ و ارتباط آن با میزان محتوای و بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز به عنوان مکانیسم دفاعی مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۲۰ راس موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز که بطور تصادفی در گروه‌های حداقل ۱۰ تایی قرار گرفته بودند استفاده شد، حیوانات محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۳±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند (۲۱).

روش دیابتی کردن

جهت ایجاد دیابت از روش تزریق داخل صفاقی ۵۰ mg/kg داروی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) به صورت تک دوز استفاده شد. طبق این روش ۴۸ ساعت بعد از تزریق، دیابت در رت‌ها ایجاد شده و جهت تشخیص دیابت، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست در دم حیوانات، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفته و سپس توسط دستگاه گلوکومتر (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) نوار خوانده و قندخون بالای ۳۰۰ mg/dl، بعنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد (۲۱).

گروه‌های آزمایشی

گروه‌های مختلف به شرح زیر مورد استفاده بودند:

۱- گروه کنترل بدون تزریق استرپتوزوتوسین

۲- گروه دیابتی

با تزریق استرپتوزوتوسین و نگهداری به مدت دو ماه بعد از القای دیابت.

اندازه گیری گلوکز خون و مقدار پروتئین بافتی

میزان گلوکز خون با روش آنزیمی انجام گرفت. محتوای پروتئین هموژن‌ها با استفاده از کیت پروتئین تام (Randox labs. Crumlin, UK) طبق روش توصیه شده در کیت انجام گرفت.

نمونه برداری و هموژنیزاسیون بافت هیپوکامپ

در انتهای آزمایش، بدنبال بیهوشی حیوانات با تیوپنتال سدیم (۵۰ mg/kg)، مغز خارج و پس از جدا کردن هیپوکامپ در روی یخ، در نیتروژن مایع منجمد و به یخچال ۸۰- درجه تا زمان آزمایش منتقل گردید. در هنگام هموژنیزاسیون، بافت مغزی توسط هموژنایزر شیشه‌ای با ۳ ضربه، در بافر مخصوص بر روی یخ هموژن شده و برای آزمایشات بعدی نگهداری گردید (۲۲).

اندازه‌گیری پروتئین BDNF

پروتئین BDNF با استفاده از کیت BDNF E-max ELISA system (Promega, USA) بر طبق دستورالعمل سازنده‌ی کیت اندازه گیری گردید. به طور خلاصه، برای جداسازی پروتئین، بافت هیپوکمپ جدا شده در بافر لیز کننده (100mM Leupeptin, 1mM EDTA,1mM dithiohreitol(DDT), 25mM Tris-Hcl, pH=7.4) هموژن گردیده، و NaOH یک نرمال به همه‌ی نمونه‌ها برای رسیدن به PH تا حد ۷/۵ اضافه گردید. سپس نمونه‌ها برای ۳ دقیقه (۱۴۰۰۰ rpm در ۴° C) سانتریفوژ گردیدند و محلول

1. Apoptosis
2. Brain-Derived Neurotrophic Factor

رویی جمع آوری گردید. چاهک های ELISA به مدت یک شب با بافر پوشاننده کربنات انکوبه و سپس به مدت یک ساعت با بافر بلوک و نمونه (B&S) و به دنبال آن همراه با نمونه ها و استاندارد به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اطاق همراه با تکان دادن انکوبه شدند. منحنی استاندارد با استفاده از مقادیر شناخته شده BDNF رسم و غلظت BDNF نمونه از طریق مقایسه و توسط دستگاه قرائت خودکار ELISA (Stat Fax-2100, USA) اندازه‌گیری و سپس با توجه به غلظت پروتئین نمونه‌ها مقادیر بصورت پیکوگرم در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

اندازه گیری میزان بیان ژن BDNF

میزان بیان ژن BDNF توسط روش نیمه کمی یا (RT-PCR) Revers Transcription PCR اندازه گیری شد. بطور خلاصه RNA توتال از بافت هیپوکمپ با استفاده از محلول RNAX -Plus (سیناژن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردیده و سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (تهیه شده از شرکت Fermentas)، cDNA سنتز گردید. در مرحله بعد پرایمرهای طراحی شده برای ژنBDNF، شامل پرایمرهای Forward 5'GAATTCATGACCATCCTTTTCCTTACTATG3' و پرایمرهای Revers، 5'AAGCTTTCTTCCCCTTTTAATGGTCAG3' و نیز ژن بتا اکتین بعنوان ژن Houskeeping جهت کنترل و مقایسه شامل پرایمر Forward، 5'CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG3' و پرایمر Revers ، 5'GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG3' ،در واکنش PCR وارد گردید. برنامه PCR (Eppendorf AG, Germany) شامل درجه حرارت ۹۴°c به مدت ۴ دقیقه،۹۴°c به مدت ۱ دقیقه، ۵۵°c به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °c به مدت ۴۵ ثانیه برای ۳۳ سیکل و ۷۲ °c به مدت۵ دقیقه بود. پس از PCR، از محصولات PCR حاصله در ژل آگاروز یک درصد (eurobio) الکتروفورز بعمل آمده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از آن عکسبرداری گردید. عکس‌های حاصله با استفاده از برنامه Scion Image (Scion corporation USA) آنالیز گردیده و بشکل عددی محاسبه و میانگین اعداد بدست آمده در گروه‌های مختلف با همدیگر مقایسه گردیدند.

اندازه گیری میزان آپوپتوزیس در بافت هیپوکامپ

میزان آپوپتوز در بافت هیپوکمپ با استفاده از کیت تعیین مرگ سلولی بروش الیزا (Cell death detection ELISA) kit 1544675, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ، بروش تعیین میزان قطعات DNA همراه با هیستون سیستولیک، طبق روش توضیح داده شده در کیت اندازه گیری گردید.

روش آماری

نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار (±SE) Mean ارائه شده‌اند. حداقل تعداد حیوانات در گروه های مورد مطالعه برای محاسبات آماری ۱۰ عدد بود. تفاوت آماری تغییرات سطح قند خون و میزان بیان ژن و پروتئین BDNF در بین دو گروه مختلف با کمک آزمون آزمون تی جفت نشده (unpaired t-student) برآورد شد. مقادیر P<۰/۰۵ بعنوان حداقل سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

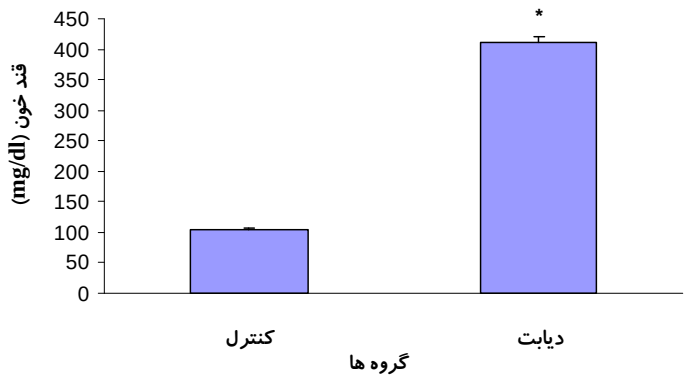
تاثیر تزریق استرپتوزوتوسین بر قند خون حیوانات

میزان قند خون ناشتا ۴۸ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، در گروه‌های درمان‌شده با استرپتوزوتوسین بطور معنی‌داری (P<۰/۰۰1) با گروه‌های درمان نشده با استرپتوزوتوسین تفاوت داشت (شکل ۱).

تاثیر دیابت برمقدار و بیان ژن BDNF در هیپوکمپ

القای دیابت با استرپتوزوتوسین موجب ایجاد افزایش هماهنگی در غلظت پروتئین BDNF با میزان بیان ژن BDNF در بافت هیپوکمپ گردید که این افزایش معنی دار بود (جدول۱).

همچنین میزان آپوپتوز در بافت هیپوکمپ به دنبال القای دیابت افزایش یافت.



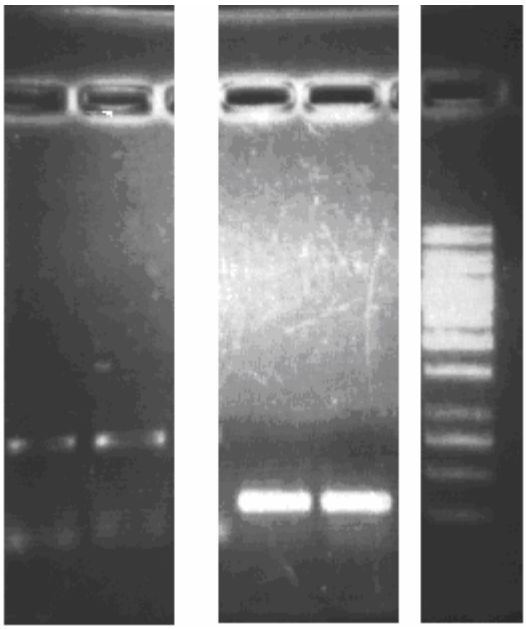
شکل ۱: تاثیر تزریق استرپتوزوتوسین بر قند خون رتهای کنترل و دیابتی. مقادیر بصورت

میانگین±انحراف معیار بوده است. *: اختلاف با گروه کنترل ، P<۰/۰۰۱. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۰ عدد می باشد.

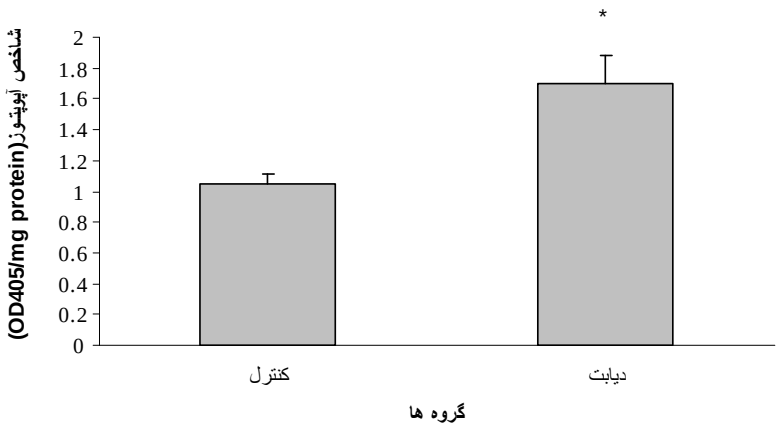
جدول۱: میزان پروتئین BDNF و بیان ژن آن در هیپوکمپ رت‌های کنترل و دیابتی

گروه	مقدار بیان ژن BDNF (۰/۰ Con Group)	مقدار پروتیین BDNF (pg/mg protein)
کنترل	۵۷/۷۵±۴/ ۹۹	۱۵۶/ ۸۳ ±۲۱/۶۸
دیابتی	۱۲۲/۷۵±۱۴/ ۶۴	۲۰۹/۶۱±۱۵/ ۸۶ *

مقادیر بصورت میانگین±انحراف معیار می باشند. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۰ عدد می باشد.
* اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)



شکل۲: تصویر الکتروفورز محصولات PCR در گروه های مورد مطالعه به ترتیب از چپ به راست، کنترل، دیابتی، سمت راست تصویر مربوط به واکنش cDNA نمونه ها با βACTIN و سمت چپ مربوط به ژن BDNF می باشند.



شکل۳: تاثیر القای دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین بر میزان آپتوزیس. در رتهای کنترل و دیابتی .
مقادیر بصورت میانگین±انحراف معیار بوده است. *: اختلاف با گروه کنترل ، P<۰/۰۵. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۰ عدد می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر ما نشان دادیم که آپوپتوزیس در نورونهای هیپوکامپی در دیابت تجربی القاء شده با استرپتوزوتوسین بوجود آمده و همراه با اختلال شناختی و افزایش محتوا و بیان ژن BDNF در این ناحیه از مغز می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش محتوای پروتئینی و بیان ژنی BDNF در هموژنیزاسیون کلی هیپوکامپ بدنبال نگهداری رتهای دیابتیک تجربی بمدت دو ماه می‌باشد.

نتایج مطالعات اخیر شواهدی را مبنی بر تقویت توانایی نورون‌ها در برابر عوامل محرک و آسیب ایسکمیک توسط BDNF درون‌زاد ارایه نموده است (۲۳). اما برخی گزارشات متضاد وجود دارد به طوریکه در یک تحقیق تجویز اسید کینیک (ماده توکسیک برای نورون ها) موجب افزایش BDNF درون‌زاد گردید اما مصرف BDNF برون زا قبل و در طول تجویز اسید کینیک موجب کاهش آسیب وارده به نورون‌های واقع در CA1 هیپوکامپ نگردید (۲۴). همچنین BDNF نورون‌های هیپوکامپی کشت داده شده را در برابر آپوپتوز القاء شده بوسیله گلوتامات محافظت می‌نماید. مکانیسم های در برگیرنده ایجاد استرس اکسیداتیو در هیپرگلیسمی مزمن بدنبال بیماری دیابت و نوروپاتی حاصل از آن در مدلهای جانوری مطالعه گردیده است (۲۵). استرس اکسیداتیو حاصله با توسعه آپوپتوزیس در نورونها و سلولهای گلیال حمایتی همراه بوده و همچنین در نهایت میتواند منجر به آسیب سیستم عصبی در دیابت گردد. از طرف دیگر طبق مطالعات موجود با توجه به افزایش محتوای BDNF و بیان ژنی آن در مقابله با اثرات توکسیک بعضی از عوامل شیمیایی و یا در هنگام ایسکمی مغزی به نظر می‌رسد نتایج حاصله در مطالعه حاضر نشان‌دهنده تحریک بیان ژنی BDNF و افزایش محتوای پروتئینی آن به منظور اعمال اثرات حفاظتی این فاکتور تروفیک در برابر اثرات مخرب این بیماری می‌باشد (۲۶).

در مطالعه حاضر ما افزایش بیان و محتوای پروتئین هیپوکمپ را بدنبال نگهداری حیوانات بمدت ۲ ماه بعد از القای دیابت مشاهده نمودیم. بعضی از مطالعات علت آسیبهای وارده به سیستم اعصاب مرکزی در بیماری دیابت را کاهش BDNF بیان نموده اند. به نظر می‌رسد اختلاف حاصله با توجه به مدت نگهداری حیوانات دیابتی بدنبال القای دیابت باشد. مطالعات نشاندهنده تفاوت در میزان BDNF و گیرنده آن در زمانهای متفاوت از القای دیابت در هیپوکامپ باشد. نیتا و همکاران در مطالعه خود بدنبال نگهداری بمدت ۴ هفته بعد از القای دیابت کاهش BDNF در هیپوکمپ را گزارش نموده اند (۲۷). در حالیکه مطالعات بر روی اعصاب محیطی نیز نشاندهنده نتایج متفاوت در خصوص تاثیر بیماری دیابت بر میزان فاکتورهای نوروتروفیک با توجه به مدت نگهداری بعد از القای دیابت تجربی می باشد (۲۸).

افزایش در میزان آپوپتوزیس بدنبال القای دیابت تجربی چنانچه در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۲۹) نشاندهنده این است که در بیماری دیابت افزایش تولید رادیکالهای آزاد و تولید استرس اکسیداتیو می‌تواند بعنوان یک عامل محرک در آسیب سلولی مطرح باشد. همچنین آپوپتوزیس در این ناحیه می‌تواند به سبب ایجاد یک پاسخ حفاظتی در برابر عامل آسیب‌رسان به منظور جلوگیری از وقوع پاسخ نکروزیس در سیستم اعصاب مرکزی و حفظ تمامیت این سیستم باشد (۳۰). افزایش بیان موضعی BDNF و ایجاد فیدبک مثبت بر روی عملکرد سیناپسی و افزایش بیان نوروتروفین ها بدنبال آسیب نورونی می‌تواند نورون‌ها را از سمیت حاصل از تحریک محافظت نماید (۳۱). در تایید مطالعات اخیر مبنی بر اثرات حفاظتی سیگنالینگ BDNF، نتایج حاصله در مطالعه ما نشان‌دهنده یک پاسخ حفاظتی ودفاعی BDNF در برابر عوامل آسیب‌رسان به منظور جلوگیری از وقوع پاسخ نکروزیس در سیستم اعصاب مرکزی و حفظ تمامیت این سیستم به دنبال ایجاد دیابت می‌باشد.

References:

1. Singh P, Jain A, Kaur G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 2004; **260**(1-2): 153-159.
2. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, Furukawa Y. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicology and Teratology* 2002; **24**(5): 695-701.
3. Berchtold NC, Chinn G, Chou M, Kesslak JP, Cotman CW. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. Neuroscience 2005; **133**(3): 853-861.
4. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H. Oxidative stress measurement by in vivo electron spins resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1998; **41**(11): 1355–1360.
5. McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, etal. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 1991; **40**(3): 344–348.
6. Kramer LP, Fasching C, Madl BB, Schneider P, Damjancic W, Waldhäusl K, etal. Previous

episodes of hypoglycemic coma are not associated with permanent cognitive brain dysfunction in IDDM patients on intensive insulin treatment. *Diabetes* 1998; **47**(12): 1909–1914.
7. Schoenle EJ, Schoenle D, Molinari L, Largo RH. Impaired intellectual development in children with type 1 diabetes: association with HbA1c, age at diagnosis and sex. *Diabetologia* 2002; **45**(1): 108–114
8. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; **7**: 663–698.
9. Yuan J. Molecular control of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**(2): 211–214
10. Yuan J. Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J Cell Biochem* 1996; **60**(1): 4–11.
11. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; **267**(5203): 1445–1449.
12. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267** (5203): 1456–1462.
13. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. Lancet 1993; **341**(8855): 1251–1254.
14. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**(5203): 1456–1462.
15. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998; **102**(4): 783–791.
16. Zhang W, Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH. Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem Mol Med* 1997; **61**(1): 58–62.
17. Stefanis L, Burke RE, Greene LA. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 1997; **10**(4): 299–305.
18. Berchtold NC, Chinn G, Chou M, Kesslak JP, Cotman CW. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2005; **133**(3): 853-861.
19. Phillips HS, Haines JM, Laramie GR, Rosenthal A, Winslow JW. Widespread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 1990; **250**(4978): 290–294.
20. Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F, Duhamel M, Rebollo MP, Alvarez-Franco F, et al. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. Mol Immunol 2006; **43**(8): 1065-1079 .
21. Nadai M, Yoshizumi H, Kuzuya T, Hasegawa T, Johno I, Kitazawa S. Effect of diabetes on disposition and renal handling of cefazolin in rats. *Drug Metab Dispos* 1990; **18**(5): 565–570.
22. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, etal. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology* 1995; **79**(1): 129-135.
23. Elin Larsson, Avtandil Nanobashvili, Zaal Kokaia, Olle Lindvall. Evidence for Neuroprotective Effects of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor after Global Forebrain Ischemia in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**(11): 1220–1228.
24. Rudge JS, Mather PE, Pasnikowski EM, Cai N, Corcoran T, Acheson A, et al. Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp Neurol* 1998; **149**(2): 398-410.
25. Comelli F, Bettoni I, Colleoni M Giagnoni G, Costa B. Beneficial effects of a Cannabis sativa extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stress. *Phytother Res* 2009; **22**(8): 1017-1024.
26. Villani GR, Gargiulo N, Faraonio R, Castaldo S, Gonzalez Y, Reyero E, et al. Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res* 2007; **85**(3): 612-622.
27. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicol Teratol* 2002; **24**(5): 695-701.
28. Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* 2004; **53**(9): 2412-2419.
29. Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2diabetes: a review. Brain Res Rev 2007; **56**(2): 384-402.
30. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann NY Acad Sci* 2002; **959**(4): 368-383.
31. Jourdi H, Hamo L, Oka T, Seegan A, Baudry M. BDNF mediates the neuroprotective effects of positive AMPA receptor modulators against MPP+-induced toxicity in cultured hippocampal and mesencephalic slices. *Neuropharmacology* 2009; **56**(5): 876-885.