**Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services**
**Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 44-49**

# Gene Expression Modification of Nerve Growth Factor in Motor Spinal Cord of Diabetic Neuropathic Rats During the 6-Week Endurance Training

**Amir Bahador Dakhili[1], Reza Gharakhanlou[1*], Mansoureh Movaheddin[2], Masoud Rahmati[3], Mohammad Keshavarz[1]**

[1]Department of Physical Education and Sport Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Department of Anatomy, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Humanities, Lorestan University, Khoram Abad, Iran

**Received: 9 Sep, 2013 Accepted: 4 Nov, 2013**

## Abstract

**Background and Objectives**: Diabetic neuropathy is one of the most common complications of diabetes mellitus, which is associated with a decrease in the synthesis and transport of neurotrophins. The aim of the present study was to investigate the effect of endurance training on gene expression of Nerve Growth Factor (NGF) in the motor spinal cord of rats with diabetic neuropathy.

**Material and Methods:** In this basic-experimental study, 16 adult male Wistar rats with the mean weight of 326/3±8/4 gr, randomly cathegorized into the four groups (n=4 in each group): diabetic control, diabetic training, healthy control and healthy training. For inducing diabetic neuropathy, after twelve hours of food deprivation, intraperitonealinjection of STZ solution (45 mg/Kg) method was used. Two weeks after STZ injection, the endurance training protocol was performed for six weeks and twenty-four hours after the last training session, rats were sacrificed. Gene expression of NGF in rats spinal motor segments were measured with Real time-Pcr technique and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The two way ANOVA was used for statistical study.

**Results:**The levels of NGFmRNA were significantly decreased in the motor segment of spinal cord after diabetes ($P$=0.038), while the endurance training resulted in modified levels of NGF closed to the normal value. Also, in comparsion with diabetic control, training led to significant decrease in blood glucose levels in diabetic training group ($P$=0.0001).

**Conclusion:** Endurance training after diabetic neuropathy can maintain NGF levels in the normal range. These results suggest that the beneficial therapeutic effects of training after diabetic neuropathy and other neurodegenerative disease might also be atributed to the modulation of NGF.

**Keywords:** Diabetic neuropathy, Endurance training, Neurotrophin, Nerve growth factor, Spinal cord, Rat

corresponding author:
**E-mail:** Ghara_re@modares.ac.ir

**مقاله پژوهشی**

# تعدیل بیان ژن فاکتور رشد عصبی در نخاع حرکتی رت‌های مبتلا به نوروپاتی دیابت در پی ۶ هفته تمرین استقامتی

**امیر بهادر دخیلی[۱]، رضا قراخانلو[۱*]، منصوره موحدین[۲]، مسعود رحمتی[۳]، محمد کشاورز[۱]**

[۱]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

**دریافت: ۹۲/۶/۱۸ پذیرش: ۹۲/۸/۱۳**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** نوروپاتی دیابت یکی از رایج‌ترین عوارض دیابت می‌باشد که با کاهش در سنتز و انتقال نوروتروفین‌ها همراه است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در بخش حرکتی رت‌های با نوروپاتی دیابت می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در یک مطالعه بنیادی-تجربی، ۱۶ سر رت صحرایی بالغ از نژاد ویستار با میانگین توده بدنی ۸/۴ ± ۳۲۶/۳ گرم به طور تصادفی در چهار (n=۴ در هر گروه) گروه دیابت کنترل، دیابت تمرین، سالم کنترل و سالم تمرین قرار گرفتند. جهت القای نوروپاتی دیابت، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از روش تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوسین ( STZ) (۴۵mg/kg) استفاده گردید. دو هفته پس از تزریق STZ پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته انجام گردید و ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها قربانی شدند. و بیان ژن NGF در بخش حرکتی نخاع با تکنیک Real time-Pcr اندازه‌گیری و با روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد.

**یافته‌ها:** سطوح mRNA NGF به طور معناداری پس از دیابت کاهش یافته بود (P=۰/۰۳۸) که تمرین استقامتی آن را به سطوح طبیعی بازگرداند. همچنین، تمرین کاهش معنادار سطوح گلوکز خون در گروه دیابت کنترل نسبت به گروه دیابت تمرین را به همراه داشت (P=۰/۰۰۰۱).

**نتیجه‌گیری:** تمرین استقامتی می‌تواند بعد از نوروپاتی دیابت سطوح NGF را در دامنه طبیعی حفظ نماید. نتایج نشان می‌دهد که اثر درمانی سودمند تمرین ورزشی بعد از نوروپاتی دیابت و دیگر بیماری‌های تخریب عصبی می‌تواند با تعدیل NGF نیز مرتبط باشد.

**کلید واژه‌ها:** نوروپاتی دیابت، تمرین استقامتی، نوروتروفین، فاکتور رشد عصبی، نخاع، موش صحرایی

*ایمیل نویسنده رابط: ghara_re@modares.ac.ir

## مقدمه

نوروپاتی محیطی دیابت (Diabetic Peripheral Neuropathy) شایع‌ترین عارضه و عامل خطر زای کیفیت زندگی در بیماران دیابتی و یکی از علل اصلی قطع پا بدون سانحه می‌باشد (۳-۱)، که با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی اکسون، میلین‌زدایی، کاهش تارهای عصبی و کند شدن بازسازی تارهای عصبی همراه می‌باشد (۴). شیوع DPN با افزایش مدت دیابت و میزان هایپرگلیسمی افزایش می‌یابد (۳). اطلاعات جمع‌آوری شده از مدل‌های حیوانی دیابت نشان داده است، کمبود و نقص فاکتورهای نوروتروفیکی و گیرنده‌های آنها در پیشرفت نوروپاتی دیابت دخیل می‌باشد (۵). در دیابت، تولید نوروتروفین‌ها و نقش حمایتی آنها کاهش می‌یابد، که این می‌تواند تا حدودی ثبات و بازسازی آکسون را دچار اختلال نماید و عاملی برای بیماری‌زایی نوروپاتی دیابت باشد (۶).

نوروتروفین‌ها (Neurotrophins) خانواده‌ای از فاکتورهای رشدی می‌باشند که رشد و بقا و تمایزپذیری سیستم عصبی محیطی و مرکزی را کنترل می‌کنند (۸و۷)، همچنین شکل‌گیری و پلاستیسیتی سیناپسی را تنظیم می‌کنند (۸). خانواده نوروتروفین‌ها شامل ۵ مولکول فاکتور رشد عصبی (NGF)، فاکتور رشدی مشتق شده از مغز (BDNF)، نوروتروفین ۳ (NT-3)، نوروتروفین ۴/۵ (NT-4/5) و نوروتروفین ۶ (NT-6) می‌باشد که این مولکول-

ها در ۵۰٪ توالی، ساختار مشابهی دارند (۷). نوروتروفین‌ها از طریق گیرنده‌های تیروزین کینازی (Tyrosine Kinase Receptor)، گیرنده با میل ترکیبی بالا و گیرنده P75، گیرنده با میل ترکیبی پایین اثرات خود را اعمال می‌نمایند (۹و۸). در وضعیت‌های پاتولوژیکی از قبیل دیابت، بیان NGF و گیرنده آن کاهش می‌یابد (۹). بقا و بهبود عملکرد سلول‌های عصبی محیطی و مرکزی به دلیل فقدان نوروتروفیک فاکتورها از قبیل NGF متوقف می‌شود و تخریب نورون‌ها تسریع پیدا می‌کند. در واقع کاهش سطح NGF و TrkA با اختلال عملکرد نورون‌های کولینرژیک مرتبط است (۱۰). همچنین نشان داده‌اند که استفاده از NGF نه فقط از آسیب اعصاب در دیابتی‌ها جلوگیری می‌کند، بلکه در دوباره‌سازی تارهای عصبی همکاری می‌نماید، همچنین درد نوروپاتیک را کاهش می‌دهد (۷). بر اساس دسته‌بندی مدل نوروتروفیکی، NGF در بافت‌های محیطی تولید و آزاد می‌شود، سپس بوسیله گیرنده‌های ویژه در پایانه اعصاب برداشته شده و به طور رو به عقب (Retrograde Transport) به جسم سلولی منتقل می‌شود و فعالیت نوروتروفیکی خود را اعمال می‌نماید. هرگونه اختلال در مدار نوروتروفیکی، همان‌گونه که در نوروپاتی محیطی توصیف شده است، می‌تواند نقص عملکرد در اعصاب محیطی را به دنبال داشته باشد (۱۱). ادبیات نشان می‌دهد که نورون‌های حرکتی به افزایش فعالیت بدنی از طریق تغییر در برخی از ویژگی‌هایش پاسخ داده و سازگار می‌شوند (۱۳و۱۲). برخی از این پاسخ‌ها شامل تغییر در بیان ژن، افزایش سنتز پروتئین، افزایش انتقال آکسونی می‌باشند. از سوی دیگر، توانایی نورون‌های حرکتی در انتقال پروتئین در آکسون به صورت رو به عقب و رو به جلو متعاقب تمرین استقامتی افزایش می‌یابد (۱۴). در همین راستا، تمرین ورزشی منظم روی بیان NGF (۱۵)، که توسعه و بقا نورون‌ها در سیستم عصبی محیطی و مرکزی را تنظیم می‌کند، اثرات مثبتی دارد (۱۶). فعالیت ورزشی منظم در وضعیت دیابت نه فقط به هموستاز گلوکز کمک می‌کند بلکه اثر مثبت بر بیان NGF دارد، که سلول‌های عصبی را از مسمومیت محافظت می‌کند (۹). مطالعات مختلفی ارتباط مستقیم بین تغییر در NGF و تمرین ورزشی را نشان داده‌اند. بخشی از این NGF در عضلات یا CNS سنتز می‌شود، به‌علاوه تمرین ورزشی پویا گیرنده‌های NGF را افزایش می‌دهد (۱۷). نقش افزایش سطح فعالیت‌بدنی در پیشگیری و بهبود عوارض ناشی از دیابت، بیماری‌های تخریب عصبی و عملکرد نورونی مشخص گردیده و همچنین تجویز (مکمل‌سازی) NGF در این بیماری‌ها برای کاهش عوارض و درمان آن نیز استفاده می‌گردد، حال آن که در مطالعات گوناگون تاثیر مثبت تمرین بدنی بر تنظیم افزایشی NGF در نمونه های سالم و دیابتی را نشان داده‌اند، در این رابطه chae و همکاران (۹) گزارش کردند که در اثر ۶ هفته تمرین استقامتی NGF در عضله رت‌های دیابتی ناشی از STZ تنظیم افزایشی یافته است، ولی تاکنون اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در بخش حرکتی نخاع رت‌های دارای نوروپاتی دیابت گزارش نشده است، بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ۶ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن NGF در نخاع رت‌های نر ویستار دارای نوروپاتی دیابت میباشد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات و شرایط نگهداری

تحقیق حاضر از نوع تجربی بوده که برای این منظور ۱۶ سر موش صحرایی نر ویستار با ۱۰ هفته سن و میانگین توده بدنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم از انستیتو رازی خریداری شد. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتیگراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (شروع چرخه بیداری ساعت ۱۶) و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری گردیدند. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب ۸/۴±۳۲۶/۳ گرم (۱۸) رت‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه چهارتایی، دیابت تمرین کرده (DT)، گروه دیابت کنترل (DC)، گروه سالم تمرین کرده (HT) و گروه سالم کنترل (HC) تقسیم شدند. در طول مرحله آشناسازی، به منظور سازگار شدن به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند.

### نحوه القا دیابت توسط STZ

پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ ۴۵ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه ۰.۵ mol/L، PH:۴.۵) دیابت القا گردید. به رت‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قندخون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به‌عنوان رت‌های دیابتی وارد مطالعه حاضر شدند (۱۸). لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ گونه از علائم ناشی از تزریق اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید و ۲ هفته پس از القا دیابت پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته انجام گردید (۹) و تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار گردید.

### برنامه تمرینی

در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) (۱۹) در دو هفته پایانی و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک (۹)، استفاده گردید. بدین صورت که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵-۱۴ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم افزایش یافت تا به شدت متوسط ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم رسید. جهت رسیدن سازگاری‌های بدست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی ثابت نگه داشته شدند (۹).

همچنین، از هیچگونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده نگردید و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین می‌گردیدند.

### استخراج بافت

در پایان ۶ هفته برنامه تمرینی، ۱۲ ساعت پس آخرین جلسه تمرین رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیب زایلازین و کتامین بیهوش شده و تحت شرایط استریل بخش حرکتی سگمنت های نخاعی L4، L5، L6 جدا شد. بافت مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و این نمونه تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر ۷۰°c- منجمد و نگهداری گردید.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ۴°c، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴°c، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴°c، ۱۰min، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در Lµ20 آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از gµ1 از RNA و باستفاده از Random Hexamer Primer و آنزیم transcriptase Mmulv Reverse انجام گرفت.

### Real time – PCR

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان NGF mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (USA Applied Biosystems). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lµ20 و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های NGF و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

**جدول ۱:** توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

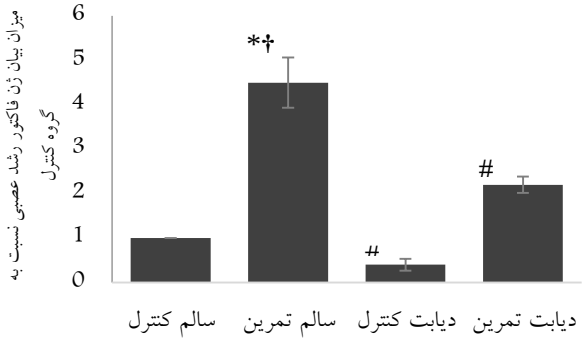
| ژن‌ها | توالی پرایمرها | بانک ژن |
|---|---|---|
| *NGF* | For: 5′- CAC CTC TTC GGA CAC TCT GGA -3′<br>Rev: 5′- CGT GGC TGT GGT CTT ATC TCC -3′ | NM_001277055.1 |
| *GAPDH* | For: 5′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3′<br>Rev: 5′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3′ | NM_017008 |

## تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف استاندارد توصیف شده‌اند. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، همسان بودن واریانس‌ها از آزمون Leven استفاده شد. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیر و تعامل آنها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید. سطح معناداری نیز $P\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

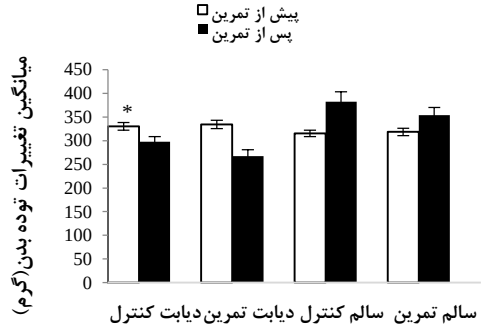
## یافته‌ها

تمام رت‌ها در گروه‌های تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین استقامتی را به طور مداوم انجام دهند و به اتمام برسانند. اختلاف معناداری در توده بدن اولیه گروه‌ها، مشاهده نگردید. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (تمرین×دیابت) تفاوت معناداری بین گروه‌ها در مقدار mRNA NGF ($P$=۰/۰۰۵) را نشان داد ولی بین دو متغیر فوق ($P$>۰/۰۵) تعامل وجود نداشت. سطح mRNA NGF به طور قابل ملاحظه‌ای درگروه DC کمتر از گروه HC بود ($P$=۰/۰۳۸). همچنین، گروه تمرین سالم به طور قابل توجهی نسبت به گروه HC سطوح بالاتری از mRNA NGF را نشان داد ($P$=۰/۰۴۱). سطوح mRNA NGF در گروه DT نسبت به گروه HC بیشتر بود ($P$=۰/۰۳). به‌علاوه، در گروه HT به طور معناداری سطوح NGF در مقایسه با DT بالاتر بود ($P$=۰/۰۴۱) (نمودار ۱).

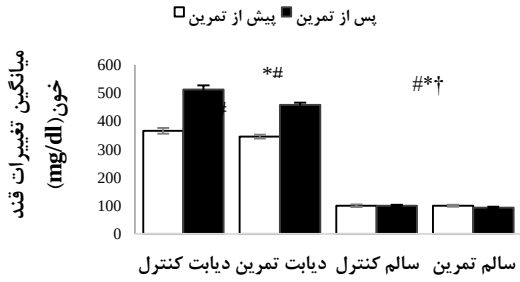



**نمودار ۱:** مقدار mRNA NGF در گروه‌ها. *اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P$<۰/۰۵)، #اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P$<۰/۰۵)، † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل ($P$<۰/۰۵)

در پایان پژوهش، میانگین تغییرات توده بدنی گروه‌های تمرین و کنترل دیابتی نسبت به گروه‌های تمرین و کنترل سالم به طور معنادار کمتر بود (به ترتیب $P$ =۰/۰۰۰۱ و $P$=۰/۰۰۱). همچنین، میانگین توده بدنی گروه DT نسبت به DC به طور معنادار کمتر بود ($P$=۰/۰۴). اگرچه، میانگین توده بدنی گروه HT نسبت به گروه HC کمتر بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود ($P$=۰/۱) (نمودار ۲). در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنادار بالاتر بود ($P$=۰/۰۰۰۱) و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنادار برخوردار بود ($P$=۰/۰۰۰۱). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه DT نسبت به گروه DC به طور معنادار پایین‌تر بود ($P$=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۳).




نمودار ۲: تغییرات توده بدن در گروه‌های مختلف.* اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P<۰/۰۱$)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P<۰/۰۱$)، † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل ($P<۰/۰۱$).




نمودار۳: تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P<۰/۰۱$)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P<۰/۰۱$)، † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل ($P<۰/۰۱$).

## بحث و نتیجه‌گیری

این پژوهش، تغییر بیان ژن NGF در بخش حرکتی نخاع رت‌های دیابتی بعد از ۶ هفته تمرین استقامتی را مورد ارزیابی قرار داد. مدل‌های حیوانی مختلفی برای مطالعه نوروپاتی دیابت وجود دارد. یکی از رایج‌ترین این روش‌ها برای ایجاد دیابت تزریق STZ (داروی سمی سلول‌های بتا پانکراس) می‌باشد. این مدل رایج‌ترین شیوه‌ای می‌باشد که به عنوان مدل دیابت نوع اول استفاده می‌شود. نوروپاتی حرکتی دیابت در این مدل دیابت ثابت شده است، از این رو، رت دیابتی با القا STZ به‌عنوان مدلی برای مطالعه DPN در انسان به کار گرفته می‌شود (۲۰). بر مبنای در ارتباط بودن ناحیه کمری نخاع با سیستم عضلانی اندام تحتانی ما روی این ناحیه تمرکز نمودیم. همچنین، جهت به حداقل رساندن آسیب‌های ساختاری و اکسایشی ناشی از تمرین بیش از حد، در پژوهش حاضر از فعالیت ورزشی با شدت متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) استفاده گردید. نتایج نشان داد که سطوح NGF به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه DC در مقایسه با رت‌های HC کاهش یافته است، ولی فعالیت افزایش یافته به صورت تمرین استقامتی به تنظیم افزایشی NGF در رت‌های DT کمک کرده و مقادیر آن راافزایش داده است. نوروتروفین‌ها نقش مهمی در توسعه بقا، تمایز، عملکرد و ترمیم نورونی ایفا می‌نمایند. آنها رشد آکسونی در نورون‌های حسی، هم بازسازی عصب در پاسخ به آسیب و هم شاخه زایی جانبی پایانه‌های عصبی آسیب ندیده را تنظیم می‌کنند (۶). NGF برای رشد و حفظ فنوتیپ نورون‌ها در سیستم عصبی محیطی و یکپارچگی عملکردی نورون‌های کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی ضروری می‌باشد. یافته‌ها از پژوهش‌های گذشته نشان داده که دیابت با کاهش در انتقال رو به عقب NGF و بیان کمتر ژن و پروتئین NGF (۲۱) و گیرنده‌های p75 و TrkA (۹) همراه می‌باشد. از این رو، یافته‌های ما با این گزارشات همخوانی دارد به طوری‌که، در مقایسه با گروه سالم کنترل، رت‌های دیابتی سطوح کمتر NGF در ناحیه قدامی نخاع داشتند. مطالعات مختلفی ارتباط مستقیم بین تغییر در NGF و فعالیت ورزشی را نشان داده‌اند. بخشی از این NGF در عضلات یا CNS سنتز می‌شود، به‌علاوه تمرین ورزشی پویا گیرنده‌های NGF را افزایش می‌دهد (۱۷). تمرین دویدن روی نوارگردان و شنا کردن سطوح NGF را به طور معناداری پس از اتمام دوره تمرینی برای ۴ هفته بالاتر از گروه کنترل نگه می‌دارد و نورون زایی را تحریک می‌کند (۱۵). همچنین، نشان داده شده که فعالیت ورزشی ارادی بیان ژن و پروتئین NT-3 و TrkC را در نخاع و عضله نعلی رت‌های بالغ سالم افزایش داده است (۲۲) و گزارشات حاکی از آن است که فعالیت عصبی عضلانی BDNF را در مغز و نخاع افزایش می‌دهد (۲۲). از سوی دیگر، دویدن ارادی روی چرخ گردان بیان فاکتورهای رشدی از قبیل NT-3، BDNF و GAP-43 را در نخاع رت‌های با آسیب نخاعی افزایش می‌دهد (۲۳). قراخانلو و همکاران (۱۳) گزارش کردند متعاقب تمرین استقامتی CGRP در جسم سلولی و آکسون نورون‌های حرکتی تنظیم افزایشی یافته است. از طرفی مشخص شده که NGF فاکتور اصلی در افزایش بیان ماده P و CGRP می‌باشد (۱۶). بنابراین به طور کلی به نظر می‌رسد نورون‌ها به کاهش و افزایش فعالیت به لحاظ زیستی سازگار می‌شوند که چنین تغییراتی می‌تواند به بقای نورون‌ها کمک کند. به‌عنوان مثال افزایش فعالیت عضلانی ممکن است مصرف مواد تروفیکی را افزایش دهد، زیرا گزارش شده است که تمرین استقامتی مزمن سرعت و میزان انتقال آکسونی سریع پروتئین را افزایش می‌دهد (۲۴و ۱۳). تجویز برنامه‌های ورزشی بلندمدت می‌تواند عوامل عصبی عضلانی را در بیماران دیابتی تحت تاثیر قرار دهد و بدین وسیله تغییرات سازشی در سیستم عصبی عضلانی در پاسخ به تمرین ورزشی ایجاد نماید (۲). در این رابطه می‌توان به پژوهش‌هایی اشاره کرد که نشان داده‌اند تمرین استقامتی سطوح NGF را در عضله نعلی رت‌های دیابتی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش داده است (۹). از یافته‌های جالب توجه این پژوهش تعدیل بیان ژنNGF پس از یک دوره ۶ هفته‌ای تمرین استقامتی در رت‌های دیابتی می‌باشد. بنابراین، فعالیت افزایش یافته به صورت تمرین استقامتی با کاهش NGF ناشی از دیابت مقابله کرده است. در ارتباط با شناخت ساز و کارهای پاسخ NGF به تمرین ورزشی می‌توان اشاره نمود، پژوهشگران گزارش کرده‌اند که در وضعیت دیابت نقص در سنتز NGF می‌تواند به دلیل هایپرگلیسمی یا هیپوانسولینی و در نتیجه تجمع پولیول، تغییر در غلظت کورتیکواسترون و ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامین $D_3$ و نقص سیستم آنتی‌اکسیدانی اتفاق افتد. کورتیکواسترون سنتز NGFرا کاهش، در حالی که ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامین $D_3$ افزایش می‌دهد (۲۵). در همین راستا، می‌توان اظهار داشت که فعالیت ورزشی از طریق اثر بر موارد فوق بیان NGF را افزایش می‌دهد. برای مثال، فعالیت ورزشی منظم ترشح گلوکوکورتیکوئیدها را کاهش می‌دهد (۹) و از سوی دیگر ظرفیت آنتی اکسیدانی را تقویت می‌نماید (۲۶). همچنین، پژوهش حاضر نشان داد تمرین ورزشی موجب کاهش معنادار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. عضلات اسکلتی عمده‌ترین مکان مصرف سوخت متابولیک در حالت استراحت هستند و فعالیت عضلانی افزایش یافته در طول فعالیت ورزشی هوازی، نیازمندی‌های سوختی را افزایش می‌دهد. لذا مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند جهت کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول فعالیت ورزشی و پس از آن مفید واقع شود. به‌علاوه، نشان داده شده است که فعالیت ورزشی می‌تواند حساسیت به انسولین را نیز افزایش دهد (۲۷). سرانجام کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به همراه داشته باشد (۲۷). بنابراین، یکی از اهداف فعالیت ورزشی افزایش برداشت گلوکز توسط عضلات، که پیامد آن پایین آوردن قند خون است و اثر مثبت تمرین استقامتی در نظر گرفته می‌شود (۲۰). تخریب سلول‌های β پانکراس ترشح کننده انسولین متعاقب تزریق STZ، موجب

کاهش شدید سطوح انسولین و بنابراین هایپرگلیسمی می‌شود. از بین رفتن توده عضلانی در مدل‌های کاهش انسولینی شدید (دیابت ایجاد شده با استفاده از STZ) مشاهده شده‌است (۲۹). از بین رفتن توده عضلانی با کاهش سنتز پروتئین و افزایش تجزیه پروتئین در عضله اسکلتی ارتباط دارد. پیشنهاد شده‌است که سطوح بیش از حد بالای گلوکز پلاسما می‌تواند در حضور سطوح انسولین پایین یا مقاومت انسولین منجر به آتروفی عضلانی شود (۳۰). بنابراین می‌توان دلیل اصلی کاهش وزن رت‌های دیابتی در پژوهش حاضر را، کاهش سنتز پروتئین و آتروفی عضلانی دانست.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد نوروپاتی دیابت منجر به کاهش سطوح mRNA NGF می‌گردد و تمرین استقامتی می‌تواند سطوح mRNA NGF را بعد از نوروپاتی دیابت در دامنه طبیعی حفظ نماید، و لذا با توجه به نقش مهم NGF در بازسازی اعصاب و توسعه و بقا نورون ها، انتظار می‌رود که اثر درمانی سودمند فعالیت ورزشی بعد از نوروپاتی دیابت مرتبط با تعدیل mRNA NGF باشد و به طور احتمالی عوامل پاتولوژیک مرتبط با نوروپاتی دیابت را از طریق افزایش فاکتور رشد عصبی تحت تاثیر قرار دهد.

## تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از همکاری گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس و همچنین زحمات بی‌دریغ جناب آقای دکتر سمنانیان که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند سپاسگزاری می‌گردد.

## References


1. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology* 2012; **11**(6): 521-534.
2. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, et.al. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal Of Diabetes And Its Complications* 2006; **20**(4): 216-223.
3. Baqiyyah C, Amanda P. Diabetic Neuropathy. *In:*Type 1 Diabetes (Li A, editors). Croatia In Tech 2013; PP: 331-358.
4. Farmer K. The Effect Of Voluntary Exercise On Neuropathic Pain: *University of Kansas*; 2010(thesis).
5. Boucek P. Advanced Diabetic Neuropathy: A Point of no Return? *Rev Diabet Stud* 2006; **3**(3): 7.
6. Karamoysoyli E, Burnand RC, Tomlinson DR, Gardiner NJ. Neuritin Mediates Nerve Growth Factor–Induced Axonal Regeneration and Is Deficient in Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2008; **57**(1): 181-189.
7. Leinninger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004; **9**(1): 26-53.
8. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2006; **361**(1473): 1545-1564.
9. Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2011; **67**(2): 235-241.
10. Chae C-H, Kim H-T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochemistry International* 2009; **55**(4): 208-213.
11. Aloe L, Rocco M, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine* 2012; **10**(1): 239.
12. 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.
13. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. 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* 1999; **89**(4): 1229-1239.
14. Gardiner P, Dai Y, Heckman CJ. Effects of exercise training on α-motoneurons. *Journal of Applied Physiology* 2006; **101**(4): 1228-1236.
15. Chae CH, Lee HC, Jung SL, Kim TW, Kim JH, Kim NJ, et.al. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 2012; **212**(1): 30-37.
16. Cheng H, Hayes J, Hong Y, Feldman E. Upregulation of nerve growth factor signaling in painful neuropathy of type 2 diabetes. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society* 2008; **9**(4): 2.
17. Peter A. Farrell, Michael J. Joyner, Vincent J. Caiozzo. *Acsm's Advanced Exercise Physiology*. lippincott williams & wilkins, 2012. PP:719.
18. Calcutt N. *Modeling Diabetic Sensory Neuropathy in Rats*. In: Luo ZD, editor. Pain Research. Methods in Molecular Medicine. 99: Humana Press, 2004; PP: 55-65.
19. Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1997; **273**(6): H2627-H31.
20. Snow LM, Sanchez OA, McLoon LK, Serfass RC, Thompson LV. Effect of Endurance Exercise on Myosin Heavy Chain Isoform Expression in Diabetic Rats with Peripheral Neuropathy. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 2005; **84**(10): 770-779.
21. Delcroix JD, Michael GJ, Priestley JV, Tomlinson DR, Fernyhough P. Effect of nerve growth factor treatment on p75NTR gene expression in lumbar dorsal root ganglia of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1998; **47**(11): 1779-1785.
22. Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gómez-Pinilla F. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Research* 2003; **987**(1): 93-99.
23. Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gómez-Pinilla F. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2005; **193**(2): 411-419.
24. Kanda K, Hashizume K, Miwa T, Miwa Y. Overloading a muscle does not alter the rate of motoneuronal loss in aged rats. *Neurobiology of Aging* 1996; **17**(4): 613-617.
25. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et.al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 2003; **69**(4): 229-285.
26. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovascular Diabetology* 2011; **10**(1): 12.
27. Chen Y-W, Li Y-T, Chen YC, Li Z-Y, Hung C-H. Exercise Training Attenuates Neuropathic Pain and Cytokine Expression After Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve. *Anesthesia & Analgesia* 2012; **114**(6): 1330-1337.
28. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H, Nakamoto H, et.al. Regular Training Modulates the Accumulation of Reactive Carbonyl Derivatives in Mitochondrial and Cytosolic Fractions of Rat Skeletal Muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; **383**(1): 114-118.
29. Bailey CJ, Puah JA. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Diabete & metabolisme* 1986; **12**(4): 212-218.
30. Russell ST, Rajani S, Dhadda RS, Tisdale MJ. Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemia. *Experimental Cell Research* 2009; **315**(1): 16-25.