● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۶، ص ۷۵۳-۷۴۱، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان BDNF و TrKB در عضله نعلی رت‌های دارای نوروپاتی دیابت

رامین رشیدی‌مولایی[۱]، عبدالرضا کاظمی*[۲]، مسعود رحمتی[۳]

خلاصه

مقدمه: نوروپاتی دیابت می‌تواند منجر به آتروفی و ضعف عضلات اسکلتی اندام تحتانی گردد و فقدان حمایت نروتروفیک، در توسعه این پیامدها درگیر است. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی بیان ژن BDNF و TrkB در عضله نعلی رت‌های نر ویستار دارای نوروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی بود.

روش: در این پژوهش، ۱۶ سر رت صحرایی بالغ نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی در چهار گروه چهارتایی: دیابت تمرین کرده (DT)، دیابت تمرین نکرده (DNT)، سالم تمرین‌کرده (NT) و کنترل سالم (NC) قرار گرفتند. ۲هفته پس از تزریق STZ (۴۵ mg/Kg)، با اثبات نروپاتی دیابت توسط آزمون‌های آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژزیا حرارتی، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌مدت ۶ هفته اجرا گردید. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها تشریح و عضله نعلی استخراج گردید. بیان ژن BDNF و TrkB نیز به روش Real time-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: وزن عضله نعلی در گروه‌های دیابتی کاهش یافت (P=۰/۰۰۱)، اگرچه در گروه DT نسبت به گروه DNT بالاتر بود (P=۰/۰۰۱). بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DNT نسبت به گروه NC بالاتر بود (P=۰/۰۰۱). همچنین تمرین منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن BDNF و TrkB و سطوح گلوکز خون در گروه DT نسبت به گروه DNT شد (به‌ترتیب p=۰/۰۰۱، P=۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: تنظیم افزایشی BDNF mRNA و TrkB در عضله نعلی رت‌های دیابتی، در توسعه آتروفی عضلانی درگیر بوده و ورزش به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی، می‌تواند آن را تعدیل نماید. بنابراین، پیشنهاد می‌شود BDNF و TrkB به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، BDNF، TrkB، دیابت، فعالیت ورزشی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات، دانشگاه آزاد کرمان، کرمان، ایران ۲- استادیار فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، دانشگاه ولیعصر رفسنجان، رفسنجان، ایران ۳- استادیار فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، دانشگاه لرستان

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: a.kazemi@vru.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۶/۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۵/۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۲۸

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ و میر در دنیاست که اختلالات متعددی از جمله نوروپاتی (Neuropathy)، نفروپاتی (Nephropathy)، رتینوپاتی (Retinopathy) ، بیماری‌های قلبی عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را به‌دنبال دارد (۱). تغییرات آتروفیک و دژنراسیون سلولی، از مهمترین ضایعات عضلانی ناشی از بیماری دیابت هستند که با کاهش مشخص قطر و طول رشته عضلانی و شکل‌گیری واکوئل‌ها در سارکوپلاسم سلول عضلانی همراه می‌باشند. ایجاد شرایط هایپرگلیسمی در بافت عضلانی، شرایط متابولیکی را فراهم می‌کند که تولید محصولات نهایی گلیکوزیله پیشرفته، افزایش استرس اکسیداتیو و تغییر در حمایت نروتروفیکی را به‌عنوان مهمترین عوامل درگیر در توسعه مرگ سلولی به همراه دارد (۲).

فاکتورهای نروتروفیک شامل گروه نامتجانسی از ملکول‌های تولید شده توسط نرون‌ها، سلول‌های شوان، پایانه‌های عصبی و عضلات هدف هستند. در انسان خانواده نوروتروفین‌ها از شش پروتئین، شامل فاکتور رشد عصبی (Nerve growth factor: NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)، نوروتروفین ۳- (NT-3)، NT-4/5 و NT-6 تشکیل شده است. این پروتئین‌ها به لحاظ ساختاری و عملکردی به هم نزدیک بوده و تقریباً در ۵۰٪ از اسیدهای آمینه همسانی دارند (۳). این نوروتروفین‌ها تأثیراتشان را از طریق گیرنده نوروتروفین P75 (p75NTR یا p75 neurotrophin receptor) و خانواده گیرنده‌های تیروزین کیناز (Tyrosine kinase (Trk) Receptors) اعمال می‌کنند. اگرچه همه نوروتروفین‌ها می‌توانند به P75 متصل شده و آن را فعال کنند اما گیرنده‌های Trk دارای اولویت‌هایی بوده و به‌صورت ویژه لیگاند (Ligand – specific) عمل می‌کنند، به این ترتیب که TrkA برای NGF، TrkB برای BDNF و NT-4/5، و TrkC برای NT-3طراحی شده‌اند (۴).

مشخص شده است که سیستم عصبی عضلانی از جایگاه‌هایی است که نوروتروفین‌ها تاثیرات ویژه‌ای را در آنجا اعمال می‌کنند (۵،۶). در افراد بالغ، نروتروفین‌های سیستم عصبی محیطی از بافت‌های هدف سنتز شده و رهایش پیدا می‌کنند و در حفظ و احیای بافت‌های عصبی درگیر هستند. به‌علاوه، سطح نروتروفین‌های اعصاب محیطی در پاسخ به آسیب عصبی و به‌ویژه، برهم‌کنش بین بافت‌های هدف و نرون‌های عصب‌رسان آنها تغییر می‌کند (۷). در این میان، عضلات مختط از جمله بافت‌های هدف هستند که نروتروفین تولید می‌کنند (۸). مطالعات انجام شده بر روی عوامل نروتروفیک، حاکی از تغییر سطوح آنها در شرایط پاتولوژیک، به‌ویژه نوروپاتی دیابت هستند. برای مثال نشان داده شده که عصب برداری، سبب تغییراتی در سطح نروتروفین‌های عضله شده است (۹) و در چندین مطالعه حیوانی تغییر سطوح NT-3 mRNA ، BDNF، NGF و نیز پروتئین NGF در عضلات دیابتی دیده شده است (۱۲-۱۰).

از سوی دیگر، تمرین ورزشی به‌عنوان مدلی برای مطالعه نروتروفین‌های مشتق از عضله از توانایی عالی برخوردار است، همچنان‌که در اکثر موارد مشخص شده است که بیان BDNF mRNA به‌دنبال تمرین ورزش در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در شیوه‌ای مرتبط با دوز افزایش می‌یابد (۱۳،۱۴). اخیراً نشان داده شده است که وحله‌های تمرینی مختصر با تردمیل که بیشتر از ۵ روز باشد افزایش زیادی را در بیان BDNF mRNA در عضله سولئوس ایجاد می‌کند (۱۵،۱۶). به‌علاوه، در نوروپاتی دیابت، موتور نرون‌های تحتانی به‌شیوه وابسته به طول متأثر می‌گردند و لذا آسیب عصبی شدیدی در اندام‌های تحتانی یعنی جایی که عصب‌زدایی مشهود است، اتفاق می‌افتد (۱۷). بنابراین، با توجه به امکان آسیب احتمالی بیان نوروتروفین‌ها در

عضله نعلی در بیماری نوروپاتی دیابت و از سوی دیگر تأثیر مثبت تمرین ورزشی بر بیان این نوروتروفین‌ها در عضله نعلی، لذا در پژوهش حاضر به بررسی بیان ژن BDNF و TrkB در عضله نعلی رت‌های نر ویستار دارای نوروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی پرداخته شد.

روش بررسی

در پژوهش حاضر از میان رت‌های موجود در مرکز تحقیقات رازی، ۱۶ سر رت صحرایی بالغ نر ۱۰ هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۵/۴±۲۵۰/۳ گرم استفاده شد. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری گردیدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه لرستان مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، رت‌ها به‌طور تصادفی در چهار گروه چهارتایی قرار گرفتند: گروه دیابت تمرین کرده (DT)، گروه دیابت تمرین نکرده (DNT)، سالم تمرین کرده (NT) و گروه کنترل سالم (NC). دو هفته پس از القای دیابت، آزمایشات رفتاری درد نروپاتیک به‌عنوان شاخص عملکرد نرون‌های حسی و حرکتی (۱۶) اجرا گردید و پس از اطمینان یافتن از حصول نوروپاتی حسی و حرکتی در رت‌ها (۱۷،۱۸)، پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت ۶ هفته انجام شد (۱۹). ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. همچنین، به‌منظور سازگاری جهت آزمایشات رفتاری نیز حیوانات به‌مدت ۳ روز در معرض آزمایشات رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار می‌گرفتند. بدین صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به‌مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می‌گرفتند (۲۰).

القای دیابت

به‌منظور القای دیابت، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ ۴۵ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ mol/L ، pH:۴/۵) به‌صورت درون صفاقی تزریق گردید. به رت‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست بر روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰mg/dL بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۶). همچنین، میزان قند خون رت‌ها به‌صورت هفتگی و تا پایان هفته ششم تمرینات اندازه‌گیری گردید.

نحوه اندازه گیری آلودینیای مکانیکی

به‌منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار می‌گرفت. برای عادت کردن به محیط جدید، حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار می‌گرفتند. سپس از تارهای Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲،۴،۶،۸،۱۵،۲۶،۶۰) ساخت شرکت Stolting، USA استفاده شد. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به‌عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (Paw Withdrawal Threshold: PWT) محسوب می‌شد. همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به‌عنوان آستانه پس کشیدن

پنجه منظور گردید (۲۱،۲۲). به‌طور کلی، سنجش آلودینا مکانیکی، قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به‌عمل آمد.

نحوه اندازه گیری‌هایپرآلژزیای حرارتی

هایپرآلژزیای حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران (۱۹۸۸) مورد سنجش قرار گرفت (۲۵). به‌طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil, Italy) حیوانات در محفظه مخصوص قرار می‌گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، بخش میانی کف پای حیوان در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار می‌گرفت و زمان‌سنج فعال می‌شد. سپس با کشیدن پا، تابش نور قطع و زمان‌سنج متوقف می‌گردید و PWL ثبت می‌شد. هر پا به‌طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش می‌شد و میانگین آنها به‌عنوان آستانه درد حرارتی ثبت می‌گردید. همچنین، برای جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به‌طور کلی، سنجش هایپرآلژزیا حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به‌عمل آمد.

پروتکل تمرین

در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک، استفاده گردید (۲۱)؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به‌مدت ۶ هفته قرار گرفت. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت و 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، به ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. برای رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به‌حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند (۱۹).

استخراج و وزن کشی عضله نعلی

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (mg/kg ۱۰) بی‌هوش و عضله نعلی در سمت چپ استخراج شد و پس از وزن کردن بلافاصله در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند. همچنین، پس از جداسازی کامل عضلات و بافت‌های پیوندی از استخوان درشت نی، طول بیشینه استخوان درشت نی توسط کولیس اندازه‌گیری می‌شد. سپس به‌منظور نرمال‌سازی داده، توده عضلانی نسبت به طول درشت نی محاسبه می‌شد (۲۴).

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی گرم بافت عضله نعلی به‌صورت جداگانه، برای استخراج total RNA به نسبت یک به ده در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ^{0}C ۴، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت یک به نیم با کلروفرم مخلوط و به‌مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ^{0}C ۴، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت یک به نیم با ایزوپروپانول مخلوط و به‌مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ^{0}C ۴، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰μL آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با

استفاده از ۱μg از RNA و باستفاده از Random hexamer primer و آنزیم Reverse transcriptase Mmulv انجام گرفت.

Real time – PCR

برای اندازه‌گیری سطوح بیان BDNF mRNA و TrkB از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II استفاده شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰μL و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های BDNF، TrkB و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد (جدول ۱). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ به‌مدت یک دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

جدول ۱. *توالی پرایمرهای BDNF، TrkB و ژن کنترل*

Genes	Primer sequence	Bank code Gen
BDNF	5′- TTGAGCACGTGATCGAAGAGC -3′For: 5′- GTTCGGCATTGCGAGTTCCAG -3′Rev:	NM_012513
TrkB	5′-TTATGCYYGCYGGTCTTGGGCTTC-3′For: 5′-TCTGGGTCAATGCTGTTAGGTTCC -3′Rev:	NC_005116.3
GAPDH	5′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3′For: 5′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT -3′Rev:	NM_017008

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای مورد مطالعه از تحلیل واریانس دو طرفه استفاده شد. برای انجام آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر توکی به‌عمل آمد. سطح معنی‌دار نیز ۵٪ = α در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS/Win نسخه ۱۹ انجام گرفت.

نتایج

تمام رت‌ها در گروه تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین استقامتی را به‌طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین×دیابت) حاکی از اثر معنی‌دار تمرین بر بیان ژن BDNF و TrkB (به‌ترتیب p=۰/۰۰۳، F=۱۰/۴۱ و p=۰/۰۰۴، F=۱۲/۵۵) و اثر تعاملی (به‌ترتیب p=۰/۰۰۶، F=۱۱/۷۹ و p=۰/۰۰۵، F=۱۱/۶۲) بین دو متغیر فوق بود.

میانگین تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار کمتر بود (p=۰/۰۰۰۱). همچنین، در همان زمان، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودینیا مکانیکی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار (p=۰/۰۰۰۱) کمتر بود (جدول ۱).

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم به‌طور معنی‌دار بالاتر

بود (p=۰/۰۰۰۱) و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی‌دار برخوردار بود (p=۰/۰۰۰۱). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، اگرچه غلظت گلوکز خون گروه‌های دیابتی نسبت به پیش از تمرین افزایش یافته بود، اما غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به‌طور معنی‌دار (p=۰/۰۰۰۱) پایین‌تر بود (جدول ۱).

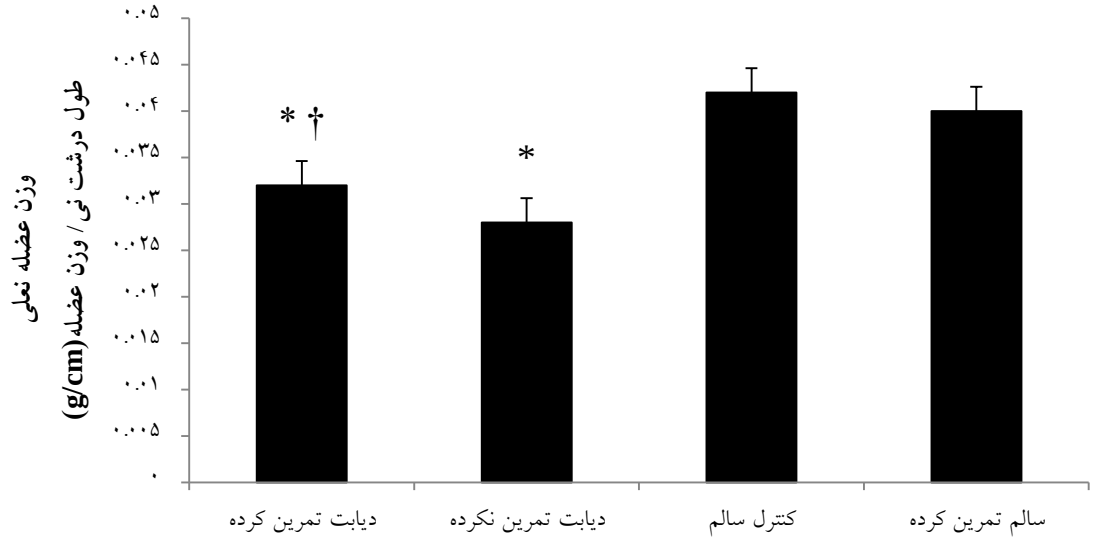
وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشت (p=۰/۷)، اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه تمرین و کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم به‌طور معنی‌دار کمتر بود (به‌ترتیب p=۰/۰۰۰۱ و p=۰/۰۰۱). همچنین، میانگین وزن گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به‌طور معنی‌دار کمتر بود (p=۰/۰۴). همچنین، وزن عضله نعلی در گروه‌های دیابتی کاهش یافت (p=۰/۰۰۱)، اگرچه در گروه DT نسبت به گروه DC بالاتر بود (p=۰/۰۰۱). نتایج در نمودار ۱ دیده می‌شود.

پس از ۶ هفته تمرین استقامتی، میانگین بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DC نسبت به گروه NC به‌طور معنی‌دار بالاتر بود (p=۰/۰۰۱). بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DT نسبت به گروه DC نیز به‌طور معنی‌دار کمتر بود (p=۰/۰۰۱)؛ اگرچه، میزان بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DT نسبت به گروه NC همچنان از اختلاف معنی‌دار (به‌ترتیب p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۰۱) برخوردار بود (نمودار ۲).

جدول ۱. *مقادیر متغیرهای قند خون، وزن، آلودینیا مکانیکی و هایپرآلژزیا حرارتی در گروه‌های چهارگانه (Mean±SD).*

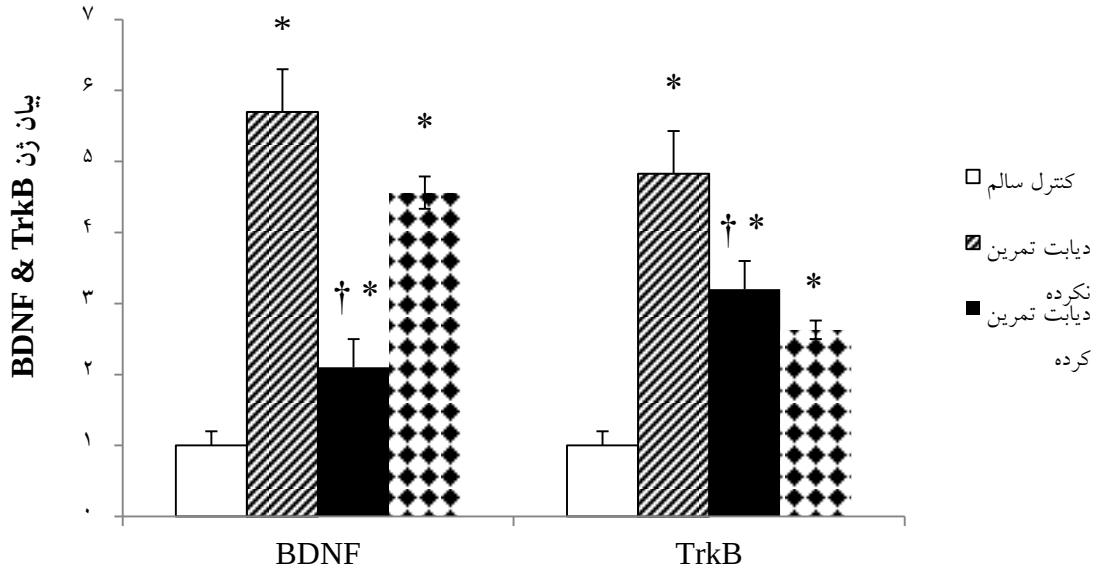
متغیر	گروه	سالم کنترل	دیابت کنترل	سالم تمرین	دیابت تمرین
قند خون	قبل از تمرین	۹۹/۷۱ ± ۷/۵۳	± ۲۳/۱۴	۱۰۰/۲ ± ۸/۲۶	†#*۳۴۵/۴۷ ± ۱۲/۲۱
	پس از تمرین	۱۰۵/۱۴ ± ۷/۸۲	#*۳۵۶/۷۱ ± ۵۱۱/۸۵ ± ۳۲/۱ #	۹۲/۸۵ ± ۶/۱۳	#*۴۵۷/۴۲ ± ۳۱/۶
وزن	قبل از تمرین	۳۱۸/۲۳ ± ۱۴/۴۲	۳۳۰/۲۸ ± ۱۵/۸۸	۳۲۲/۵۷ ± ۱۲/۷۲	۳۳۴/۲۸ ± ۱۷/۷۲
	پس از تمرین	۳۸۲/۱۴ ± ۱۳/۶۷	#*۳۰۲/۸۵ ± ۱۲/۳	۳۵۳/۶۹ ± ۱۸/۷۵	#*۲۶۷/۱۴ ± ۲۶/۳
آلودینا مکانیکی (gr)	قبل از تمرین	۶۰ ± ۰	#*۲۱/۲۸ ± ۵/۸۷	۶۰ ± ۰	#*۱۹/۷۱ ± ۸/۱۷
	پس از تمرین	۵۰/۲۸ ± ۱۶/۵۹	#*۱۶/۵۷ ± ۸/۱۵	۶۰ ± ۰	†#*۲۴/۴۲ ± ۴/۱۲
هایپرآلژزیا حرارتی (ثانیه)	قبل از تمرین	۱۲/۶۸ ± ۰/۶۲	#*۸/۸۸ ± ۱/۱۲	۱۳/۲۱ ± ۱/۱۱	#*۸/۹۸ ± ۱/۲۸
	پس از تمرین	۱۲/۵۷ ± ۱/۰۱	#*۷/۹۵ ± ۰/۹۷	۱۲/۴۵ ± ۰/۹۱	†۱۱/۷۷ ± ۱/۲۴

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (p< ۰/۰۱)، #اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل تمرین (p<۰/۰۱). † اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (p< ۰/۰۱).



نمودار ۱. تغییرات وزن عضله نعلی در گروه‌های مختلف.

** †: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم و دیابت کنترل ($p<۰/۰۵$).*



نمودار ۲. میزان بیان ژن BDNF و TrkB در عضله نعلی گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل.

** †: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم و دیابت کنترل ($p<۰/۰۵$).*

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیماری دیابت منجر به افزایش BDNF mRNA و TrkB در عضله نعلی رت‌های دیابتی می‌شود. همسو با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات نشان می‌دهند که BDNF mRNA در عضله نعلی و DRG رت‌های دیابتی افزایش یافته‌اند و این افزایش با درمان انسولینی برعکس شده است (۱۰،۱۱). همچنین، گزارش شده که TrkB mRNA، در DRGهای رت‌های دیابتی افزایش یافته است (۲۸). اگرچه، انتقال آکسونی رو به جلو و رو به عقب، و سطوح پروتئین BDNF در عصب سیاتیک رت‌های دیابتی تحریک شده توسط STZ کاهش یافته است. این موضوع پیشنهاد می‌کند که انتقال کاهش یافته BDNF در افراد دیابتی، ناشی از ظرفیت نقصان یافته انتقال تسهیل شده توسط گیرنده نمی‌باشد (۲۹). در تایید این موضوع، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح BDNF mRNA و TrkB در عضله نعلی رت‌های دیابتی به موازات یکدیگر افزایش یافته‌اند. به علاوه، تناقض میان کاهش سطوح پروتئین BDNF و افزایش سطوح mRNA آن در شرایط دیابت، ممکن است نشان‌دهنده تولید جبرانی و تنظیم افزایشی BDNF باشد. این در حالی است که نشان داده شده کاهش سطوح پروتئین BDNF و افزایش سطوح mRNA آن، در بخشی ممکن است ناشی از اثر اسمزی هایپرگلایسمی‌باشد، زیرا نتایج مشابهی در رت‌هایی که با گالاکتوز تغذیه رسانی شده بودند گزارش شده است (۲۹).

از سوی دیگر، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین استقامتی در رت‌های دیابتی تمرین کرده موجب تعدیل سطوح BDNF mRNA و TrkB نسبت به رت‌های دیابتی در عضله نعلی می‌گردد. مطالعات بسیاری نیز نشان داده‌اند تمرین استقامتی موجب بهبود عملکرد و ساختار عضله اسکلتی در شرایط نوروپاتی دیابت می‌گردد. برای مثال نشان داده شده فعالیت بدنی منجر به افزایش مصرف گلوکز و افزایش انتقال دهنده‌های گلوکز در بافت عضلانی می‌گردد. به علاوه، نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد (۳۰). بهبود عملکرد عضله اسلکتی، به افزایش وابسته به ورزش بیان mRNA و سطوح پروتئین NT-3 و BDNF در عضله اسکلتی نیز نسبت داده شده است (۲۰). این مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق تنظیم سوخت و ساز گلوکز و افزایش عوامل نروتروفیک، به بهبود ساختار و عملکرد عضله اسکلتی در شرایط دیابت منجر شود. این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد تمرین ورزشی با شدت متوسط موجب کاهش معنی‌دار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت منجر به آتروفی عضله اسلکتی می‌گردد و تمرین ورزشی قادر است این روند را معکوس سازد، به گونه‌ای که وزن عضله نعلی در رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت و تمرین ورزشی منجر به افزایش وزن عضله نعلی در رت‌های دیابتی تمرین کرده گردید. این در حالی است که BDNF در عضله اسلکتی در سلول‌های ماهواره‌ای که به‌عنوان تکثیرکننده‌های میوژنیک شناخته شده اند، بیان می‌شود (۳۲). به علاوه، نشان داده شده که تخلیه BDNF در سلول‌های عضله اسکلتی، اختلال در تولید برخی از نشانگرهای تنظیم نوزایش، تفکیک و اندازه سلول عضلانی را به همراه داشته است (۳۳). این نتایج نشان می‌دهند که BDNF یکی از عوامل مهم درگیر در تنظیم توده عضلانی به‌شمار می‌رود. لذا در پژوهش حاضر، این احتمال می‌رود که ورزش از طریق اثراتی که بر کاهش غلظت گلوکز خون و سطوح BDNF mRNA و TrKB داشته است،

موجب توقف و یا تضعیف فرآیند آتروفی در عضله نعلی رت‌های دیابتی تمرین کرده گردیده است. اگر چه این امر در تحقیق حاضر مستقیماً مورد بررسی قرار نگرفت ولی این نتیجه همسو با تحقیقاتی است که هایپرگلایسمی القا شده توسط STZ را در توسعه آتروفی عضلانی و بیان اختلال یافته عوامل نروتروفیک ناشی از نوروپاتی دیابت سهیم دانسته‌اند و نشان داده‌اند که درمان انسولین می‌تواند به بهبود عملکرد عضلانی و سطوح عوامل نروتروفیک بیانجامد (۳۶-۳۴). همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد در رت‌های غیر دیابتی تمرین کرده نیز، تمرین استقامتی موجب تنظیم افزایشی سطوح BDNF mRNA و TrkB نسبت به رت‌های گروه کنترل شد. این نتایج نشان می‌دهند که BDNF یک فاکتور تغذیه‌ای است که تحت شرایط فعالیت فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی تنظیم می‌شود. همسو با این نتایج، نشان داده شده که فعالیت ورزشی موجب افزایش BDNF در مغز و طناب نخاعی می‌شود (۳۷). در مورد طول مدت تمرین نیز نشان داده شده که تمرین بلندمدت و بلافاصله بعد از دویدن سطوح BDNF mRNA و TrkB را در هیپوکمپ افزایش می‌دهند (۳۸،۳۹). در ارتباط با بیان BDNF در عضله اسکلتی، می‌توان گفت که عضله اسکلتی بافت اندوکرینی است که توسط رهایش عوامل شبه هورمونی ممکن است بر متابولیسم سایر بافت‌ها و ارگان‌ها تأثیر بگذارد. از این رو، سایتوکاین‌ها و پپتیدهایی که توسط تارهای عضلانی تولید، بیان و رهایش می‌گردند و اثرات اتوکرین، پاراکرین یا اندوکرینی دارند، به‌عنوان میوکاین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. به‌نظر می‌رسد BDNF مشتق از سلول عضلانی القا شده توسط انقباض، به شیوه وابسته به AMPK، اکسیداسیون چربی در عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد.

BDNF به‌عنوان یک مایوکاین در متابولیسم عضله اسکلتی نقش ایفا می‌کند (۴۰). بنابراین، می‌توان ادعا کرد که در پژوهش حاضر تنظیم افزایشی سطوح BDNF mRNA و TrkB در رت‌های غیردیابتی تمرین کرده، احتمالا در تنظیم متابولیسم و توده عضله اسکلتی نقش داشته است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که احتمالا در عضله نعلی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی سطوح BDNF mRNA و TrkB، در توسعه آتروفی عضلانی درگیر بوده و تمرین استقامتی می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد غیر دارویی، این افزایش را تعدیل کند. همچنین، مطالعه حاضر فراهم آورنده شواهد غیرمستقیم بر اختلال در متابولیسم عضله اسکلتی در شرایط نوروپاتی دیابت است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود BDNF و TrkB به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه واقع شود؛ هر چند که نکات متعددی در این ارتباط وجود دارند و در آینده باید مورد مطالعه قرار بگیرند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر برگرفته از یک پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. از اساتید راهنما، مشاور و آزمایشگاه دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120(1):1-34.
2. Frier BC, Noble EG, Locke M. Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF-κB activation and expression. *Cell Stress and Chaperones* 2008; 13(3): 287-296.
3. Ibanez C F, Ebendal T, Persson H. Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. *EMBO J* 1991; 10(8): 2105-10.
4. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994; 25(11):1386-403.
5. Huang EJ, Reichard LF. Neurotrophins: role in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:677-736.
6. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Nakano H, Li YJ, et al. A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. *Brain Res* 2001; 907(1-2):1–19.
7. Griesbeck O, Parsadanian AS, Sendtner M, Thoenen H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* 1995; 42(1): 21–33.
8. Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 1996; 21(8): 929-38.
9. Kust BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2002; 177(2): 419–27.
10. Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, Tomlinson DR. Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats. *J Neurochem* 1995; 64(3): 1231–7.
11. Fernyhough P, Maeda K, Tomlinson DR. Brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are up-regulated in hindlimb skeletal muscle of diabetic rats: effect of denervation. *Exp Neurol* 1996; 141(2): 297–303.
12. Fernyhough P, Diemel LT, Tomlinson DR. Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 1998; 41(3): 300–6.
13. Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 2002; 88(5):2187-95.
14. Adlard PA, Perreau VM, Engesser-Cesar C, Cotman CW. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic

factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci Lett.* 2004; 363(1):43-8.

15. Cuppini R, Sartini S, Agostini D, Guescini M, Ambrogini P, Betti M, et al. BDNF expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise. *Arch Ital Biol.* 2007; 145(2): 99-110.
16. Gomez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 2001; 13(6):1078-84.
17. Andreassen CS, Jakobsen J, Ringgaard S, Ejskjaer N, Andersen H. Accelerated atrophy of lower leg and foot muscles-a follow-up study of long-term diabetic polyneuropathy using magnetic resonance imaging (MRI). *Diabetologia.* 2009; 52(6): 1182–91.
18. Calcutt N, Freshwater J, O'Brien J. Protection of sensory function and antihyperalgesic properties of prosaposin-derived peptide in diabetic rats. *Anesthesiology* 2000; 93(5): 1271-8.
19. Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2009 57(4):456-62.
20. Beyreuther B, Callizot N, Stohr T: Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 2006; 539(1-2): 64-70.
21. Chae C.H., Jung S.L., An S.H., Park B.Y., Wang S.W., Cho I.H., et al. 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* 2009; 164(4): 1665–73.
22. Sharma NK, Ryals JM, Gajewski BJ, Wright DE. Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain. *Phys Ther.* 2010; 90(5):714-25.
23. Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996; 68(2-3): 293-9.
24. Tal M, Bennett GJ. Extra–territorial pain in rat with a peripheral mononeuropathy: mechano–hyperalgesia and mechano – allodynia in the territory of an uninjerd nerve. *Pain* 1994; 57(3): 375-82.
25. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77-88.
26. Farrell PA, Fedele J, Hernandez J, Fluckey JD, Miller JL, Lang CH, et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol* 1999; 87(3): 1075-82.
27. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time

RT–PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29(9): e45-e45.

28. Ernfors, P., Rosario C.M., Merlio J.P., Grant G., Aldskogius H., Persson H. Expression of mRNA for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. *Mol Res Mol Brain Res* 1993; 17(3-4): 217-26.
29. Mizisin A.P., DiStefano P.S., Liu X., Garrett D.N., Tonra J.R.. Decreased accumulation of endogenous brain-derived neurotrophic factor against constricting sciatic nerve ligatures in streptozotocin-diabetic and galactose-fed rats. *Neurosci Lett* 1999; 263(1-2): 149-52.
30. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and Type 2 Diabetes The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes care* 2010; 33(12), 2692-6.
31. Sharma NK. Ryals JM. Gajewski BJ. Wright DE. Aerobic Exercise Alters Analgesia and Neurotrophin-3 Synthesis in an Animal Model of Chronic Widespread Pain. *Phys Ther.* 2010; 90(5): 714-25.
32. Clow C, Jasmin B.J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeltal muscle regeneration. *Mol biol cell* 2010; 21(13), 2182-90.
33. Colombo E., Bedogni F., Lorenzetti I., Landsberger N., Previtali S. C., Farina C. Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. *J pathol* 2013; 231(2): 190-8.
34. Lee JH, McCarty R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. *Physiol Behav* 1990; 47(2): 225-30.
35. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain* 1992; 50(2): 231- 6.
36. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57(1): 1-164.
37. Vaynman S., Ying Z., Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European J Neurosci* 2004; 20(10): 2580-90.
38. Van Hoomissen J. D., Chambliss H.O., Holmes P.V., Dishman R.K. Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain research* 2003; 974(1-2), 228-35.
39. Ogborn D I, Gardiner P F. Effects of Exercise and Muscle Type on BDNF, NT-4/5, and TrkB Expression in Skeletal Muscle. *Muscle and Nerve* 2010; 41(3): 385-91.
40. Brandt C., Pedersen B.K. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. J *BioMed Biotechnol International* 2010; 520258.

The Effect of a 6-week Endurance Training on BDNF and TrKB Gene Expression in the Soleus of Rats with Diabetic Neuropathy

Ramin Rashidi Molaei, B.Sc.[1], Abdolreza Kazemi, Ph.D.[2*], Masood Rahmati, Ph.D.[3]

1. Assistant Professor, Physical Education Department, Vali-Asr University, Rafsanjan, Iran
2. Assistant Professor, Physical Education Department, Vali-Asr University, Rafsanjan, Iran
3. Assistant Professor, Physical Education Department, Lorestan University, Khoram abad, Iran

* Corresponding author; e-mail: a.kazemi@vru.ac.ir

(Received: 30 August 2014 Accepted: 18 August 2015)

Abstract

Background & Aims: Diabetic neuropathy can lead to atrophy and weakness of distally located muscles and lack of neurotrophic support is believed to contribute to the development of these consequences. So, the aim of the present study was to investigate BDNF and TrKB gene expression in soleus muscle of Wistar male rats with diabetic neuropathy following endurance training.

Methods: A total of 16 Wistar male rats were randomly assigned in 4 groups: diabetic trained (DT), diabetic Non-trained (DNT), normal trained (NT) and normal control (NC). Two weeks after STZ injection (45 mg/Kg), diabetic neuropathy was demonstrated with mechanical allodynia and thermal hyperalgesia tests. Then, moderate endurance training protocol was performed for 6 weeks and 48 hours after the final training session, rats were dissected and soleus muscle tissues were removed. BDNF and TrkB gene expression was determined with Real time- PCR methods.

Results: Soleus muscle weight decreased in diabetic groups (p=0/001); even though, compared with DNT group, it was higher in DT group (p=0/001). BDNF and TrkB gene expression in DNT group was higher than NC group (p=0/001). Also, training significantly decreased BDNF and TrkB gene expression and blood glucose levels in DT group compared with DNT group (P=0/001 and P=0/0001, respectively).

Conclusion: In soleus muscle of diabetic rats, BDNF and TrkB mRNA up-regulation is involved in the development of muscle atrophy and training as a non-pharmacotherapy strategy can modulate it. So, considering BDNF and TrkB as novel therapeutic targets in diabetes disease is suggested.

Keywords: Gene expression, BDNF, TrkB, Diabetes, Exercise

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(6): 741-753