

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

رامین رشیدی‌مولایی<sup>۱</sup>، عبدالرضا کاظمی<sup>۲\*</sup>، مسعود رحمتی<sup>۳</sup>

### خلاصه

مقدمه: نوروپاتی دیابت می‌تواند منجر به آتروفی و ضعف عضلات اسکلتی اندام تحتانی گردد و فقدان حمایت نوتروفیک، در توسعه این پیامدها درگیر است. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی بیان ژن BDNF و TrkB در عضله نعلی رت‌های نروویستار 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 تمرین کرده (NT) و کنترل سالم (NC) قرار گرفتند. ۲ هفته پس از تزریق STZ (۴۵ mg/Kg)، با اثبات نروپاتی دیابت توسط آزمون‌های آلودینیای مکانیکی و هاپیرآلژزیا حرارتی، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت 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 ( $P=0/001$ )، اگرچه در گروه DT نسبت به گروه DNT بالاتر بود ( $P=0/001$ ). بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DNT نسبت به گروه NC بالاتر بود ( $P=0/001$ ). همچنین تمرین منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن BDNF و TrkB و سطوح گلوکز خون در گروه DT نسبت به گروه DNT شد (به ترتیب  $p=0/001$ ،  $P=0/0001$ ).

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 شایع ترین بیماری های مزمن و ششمین علت مرگ و میر در دنیاست که اختلالات متعددی از جمله نوروپاتی (Neuropathy)، نفروپاتی (Nephropathy)، رتینوپاتی (Retinopathy)، بیماری های قلبی عروقی و آترومی عضله اسکلتی را به دنبال 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 شکل گیری واکوئل ها در سارکوپلاسم سلول عضلانی همراه می باشند. ایجاد شرایط هایپرگلیسمی در بافت عضلانی، شرایط متابولیکی را فراهم می کند که تولید محصولات نهایی گلیکوزیله پیشرفته، افزایش استرس اکسیداتیو و تغییر در حمایت نورو تروفیکی را به عنوان مهمترین عوامل درگیر در توسعه مرگ سلولی به همراه دارد (۲).

فاکتورهای نورو تروفیک شامل گروه نامتجانسی از ملکول های تولید شده توسط نرون ها، سلول های شوان، پایانه های عصبی و عضلات هدف هستند. در انسان خانواده نورو تروفین ها از شش پروتئین، شامل فاکتور رشد عصبی (Nerve growth factor: NGF)، فاکتور نورو تروفیک مشتق شده از مغز (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)، نورو تروفین ۳- (NT-3)، NT-4/5 و NT-6 تشکیل شده است. این پروتئین ها به لحاظ ساختاری و عملکردی به هم نزدیک بوده و تقریباً در ۵۰٪ از اسیدهای آمینه همسانی دارند (۳). این نورو تروفین ها تأثیراتشان را از طریق گیرنده نورو تروفین P75 (p75 neurotrophin receptor) یا p75NTR و خانواده گیرنده های تیروزین کیناز (Tyrosine kinase (Trk) Receptors) اعمال می کنند. اگرچه همه نورو تروفین ها می توانند به P75 متصل شده و آن را فعال کنند اما گیرنده های Trk دارای اولویت هایی بوده و به صورت ویژه لیگاند (Ligand - specific) عمل می کنند، به این ترتیب که

TrkA برای NGF، TrkB برای BDNF و NT-4/5 و TrkC برای NT-3 طراحی شده اند (۴).

مشخص شده است که سیستم عصبی عضلانی از جایگاه هایی است که نورو تروفین ها تأثیرات ویژه ای را در آنجا اعمال می کنند (۵،۶). در افراد بالغ، نورو تروفین های سیستم عصبی محیطی از بافت های هدف سنتز شده و رهایش پیدا می کنند و در حفظ و احیای بافت های عصبی درگیر هستند. به علاوه، سطح نورو تروفین های اعصاب محیطی در پاسخ به آسیب عصبی و به ویژه، برهم کنش بین بافت های هدف و نرون های عصب رسان آنها تغییر می کند (۷). در این میان، عضلات مختلط از جمله بافت های هدف هستند که نورو تروفین تولید می کنند (۸). مطالعات انجام شده بر روی عوامل نورو تروفیک، حاکی از تغییر سطوح آنها در شرایط پاتولوژیک، به ویژه نورو پاتی دیابت هستند. برای مثال نشان داده شده که عصب برداری، سبب تغییراتی در سطح نورو تروفین های 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 (۱۰-۱۲). از سوی دیگر، تمرین ورزشی به عنوان مدلی برای مطالعه نورو تروفین های مشتق از عضله از توانایی عالی برخوردار است، همچنان که در اکثر موارد مشخص شده است که بیان BDNF mRNA به دنبال تمرین ورزش در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در شیوه ای مرتبط با دوز افزایش می یابد (۱۳،۱۴). اخیراً نشان داده شده است که حله های تمرینی مختصر با تردمیل که بیشتر از ۵ روز باشد افزایش زیادی را در بیان BDNF mRNA در عضله سولئوس ایجاد می کند (۱۵،۱۶). به علاوه، در نورو پاتی دیابت، موتور نرون های تحتانی به شیوه وابسته به طول متأثر می گردند و لذا آسیب عصبی شدیدی در اندام های تحتانی یعنی جایی که عصب زدایی مشهود است، اتفاق می افتد (۱۷). بنابراین، با توجه به امکان آسیب احتمالی بیان نورو تروفین ها در

می 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 می گرفتند (۲۰).

#### القای دیابت

به منظور 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) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. به رت های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانست بر روی ورید دم رت ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت هایی که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۶). همچنین، میزان قند خون رت ها به صورت هفتگی و تا پایان هفته ششم تمرینات اندازه گیری گردید.

#### نحوه اندازه گیری آلودینیای مکانیکی

به منظور اندازه گیری 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 می گرفت. برای عادت کردن به محیط جدید، حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار می گرفتند. سپس از تارهای Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲،۴،۶،۸،۱۵،۲۶،۶۰) ساخت شرکت Stoltz، USA استفاده شد. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (Paw Withdrawal Threshold: PWT) محسوب می شد. همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن

عضله نعلی در بیماری نوروپاتی دیابت و از سوی دیگر تأثیر مثبت تمرین ورزشی بر بیان این نوروتروفین ها در عضله نعلی، لذا در پژوهش حاضر به بررسی بیان ژن BDNF و TrkB در عضله نعلی رت های نروپاتی دارای نوروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی پرداخته شد.

#### روش بررسی

در پژوهش حاضر از میان رت های موجود در مرکز تحقیقات رازی، ۱۶ سر رت صحرایی بالغ نر ۱۰ هفته ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰/۳±۱۵/۴ گرم استفاده شد. کلیه رت ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۲۲±۳ درجه سانتی گراد، 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، رت ها به طور 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 به عنوان شاخص عملکرد نرون های حسی و حرکتی (۱۶) اجرا گردید و پس از اطمینان یافتن از حصول نوروپاتی حسی و حرکتی در رت ها (۱۷، ۱۸)، پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته انجام شد (۱۹). ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به منظور 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 بر روی نوار گردان راه رفتند. همچنین، به منظور سازگاری جهت آزمایشات رفتاری نیز حیوانات به مدت ۳ روز در معرض آزمایشات رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار

هفته چهارم، به ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. برای رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت 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 (۱۰ mg/kg) 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 به منظور نرمال‌سازی داده، توده عضلانی نسبت به طول درشت نی محاسبه می‌شد (۲۴).

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت عضله نعلی به صورت جداگانه، برای استخراج total RNA به نسبت یک به ده در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴°C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت یک به نیم با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴°C، ۱۵ min، 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 به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴°C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰۰ μL آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorf, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با

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

#### نحوه اندازه‌گیری‌های پیر آلترزیای حرارتی

هایپر آلترزیای حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران (۱۹۸۸) مورد سنجش قرار گرفت (۲۵). به طور 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 زمان سنج فعال می‌شد. سپس با کشیدن پا، تابش نور قطع و زمان سنج متوقف می‌گردید و PWL ثبت می‌شد. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش می‌شد و میانگین آنها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت می‌گردید. همچنین، برای جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به طور کلی، سنجش هایپر آلترزیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل 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 به مدت 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، ۱۴-۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۴-۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در

استفاده از  $1 \mu\text{g}$  از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم transcriptase Mmulv Reverse انجام گرفت.

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 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 و ۶۰ به مدت یک دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژنهای مورد نظر نیز با روش  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  اندازه گیری شد.

Real time - PCR

برای اندازه گیری 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  $20 \mu\text{L}$  و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژنهای

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

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

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 به عمل آمد. سطح معنی دار نیز  $\alpha = 5\%$  در نظر گرفته شد. کلیه بررسیهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS/Win نسخه ۱۹ انجام گرفت.

تمام رت ها در گروه تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین استقامتی را به طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین  $\times$  دیابت) حاکی از اثر معنی دار تمرین بر بیان ژن BDNF و TrkB (به ترتیب  $p=0/003$  و  $F=10/41$ ) و اثر تعاملی (به ترتیب  $p=0/006$  و  $F=12/55$ ) بین دو متغیر فوق بود. میانگین تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپیرآلژزیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروههای دیابتی نسبت به گروههای سالم به طور معنی دار 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 به طور معنی دار ( $p=0/0001$ ) کمتر بود (جدول ۱).

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروههای دیابتی نسبت به گروه سالم به طور معنی دار بالاتر

نتایج

تمام رت ها در گروه تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین استقامتی را به طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین  $\times$  دیابت) حاکی از اثر معنی دار تمرین بر بیان ژن BDNF و TrkB (به ترتیب  $p=0/003$  و  $F=10/41$ ) و اثر تعاملی (به ترتیب  $p=0/006$  و  $F=12/55$ ) بین دو متغیر فوق بود. میانگین تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) در آزمون هایپیرآلژزیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروههای دیابتی نسبت به گروههای سالم به طور معنی دار ( $p=0/0001$ ). همچنین، در همان زمان، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) در آزمون آلودینیا مکانیکی در گروههای دیابتی نسبت به گروههای سالم به طور معنی دار ( $p=0/0001$ ) کمتر بود (جدول ۱).

دیابت تمرین نکرده به طور معنی دار کمتر بود ( $p=0/04$ ). همچنین، وزن عضله نعلی در گروه‌های دیابتی کاهش یافت ( $p=0/001$ )، اگرچه در گروه DT نسبت به گروه DC بالاتر بود ( $p=0/001$ ). 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 به طور معنی دار بالاتر بود ( $p=0/001$ ). بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DT نسبت به گروه DC نیز به طور معنی دار کمتر بود ( $p=0/001$ )؛ اگرچه، میزان بیان ژن BDNF و TrkB در گروه DT نسبت به گروه NC همچنان از اختلاف معنی دار (به ترتیب  $p=0/001$  و  $p=0/001$ ) برخوردار بود (نمودار ۲).

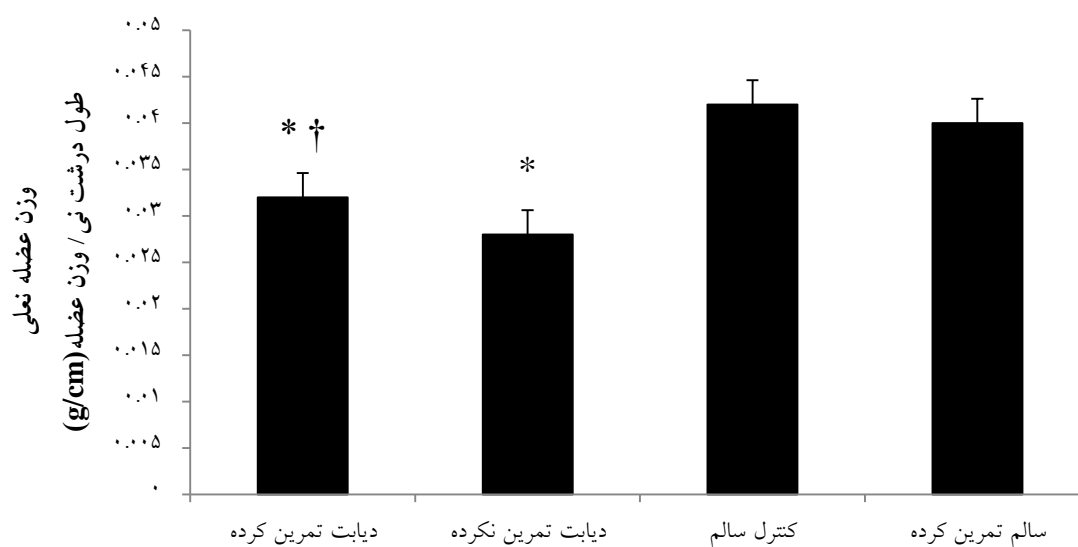
بود ( $p=0/0001$ ) و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی دار برخوردار بود ( $p=0/0001$ ). همچنین، در پایان برنامه تمرینی، اگرچه غلظت گلوکز خون گروه‌های دیابتی نسبت به پیش از تمرین افزایش یافته بود، اما غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به طور معنی دار ( $p=0/0001$ ) پایین تر بود (جدول ۱).

وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معنی دار با یکدیگر نداشت ( $p=0/7$ )، اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه تمرین و کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم به طور معنی دار کمتر بود (به ترتیب  $p=0/0001$  و  $p=0/001$ ). همچنین، میانگین وزن گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه

جدول ۱. مقادیر متغیرهای قند خون، وزن، آلودینا مکانیکی و هایپرآلژزیا حرارتی در گروه‌های چهارگانه ( $Mean \pm SD$ ).

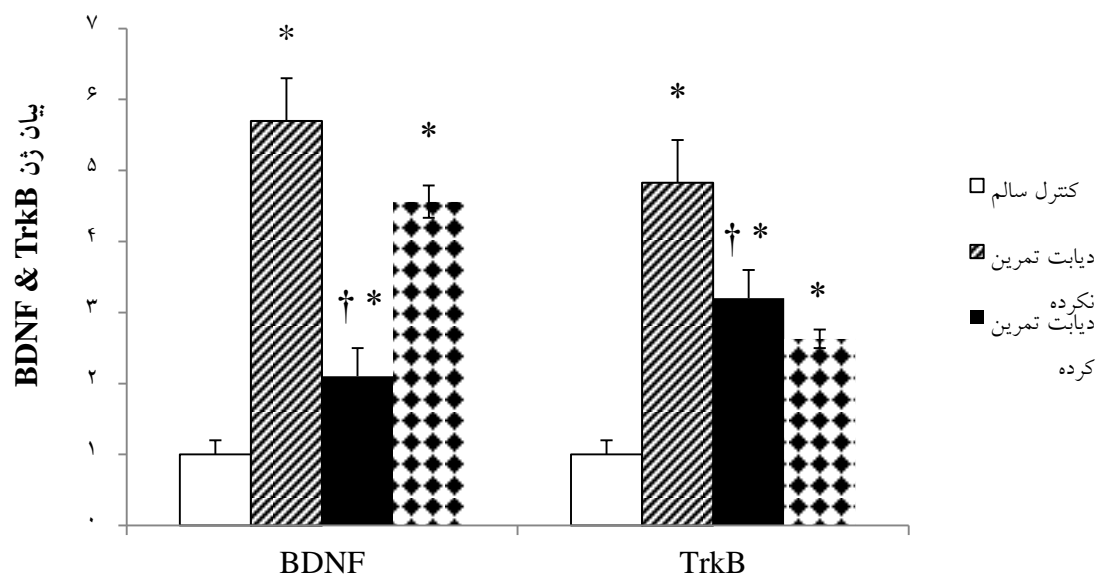
متغیر	گروه			
	دیابت تمرین	سالم تمرین	دیابت کنترل	سالم کنترل
قند خون	قبل از تمرین	۱۰۰/۲ ± ۸/۲۶	۲۳/۱۴ ±	۹۹/۷۱ ± ۷/۵۳
	پس از تمرین	۹۲/۸۵ ± ۶/۱۳	۳۵۶/۷۱ ±	۱۰۵/۱۴ ± ۷/۸۲
وزن	قبل از تمرین	۳۲۲/۵۷ ± ۱۲/۷۲	۳۳۰/۲۸ ± ۱۵/۸۸	۳۱۸/۲۳ ± ۱۴/۴۲
	پس از تمرین	۲۶۷/۱۴ ± ۲۶/۳	۳۰۲/۸۵ ± ۱۲/۳	۳۸۲/۱۴ ± ۱۳/۶۷
آلودینا مکانیکی (gr)	قبل از تمرین	۶۰ ± ۰	۲۱/۲۸ ± ۵/۸۷	۶۰ ± ۰
	پس از تمرین	۶۰ ± ۰	۱۶/۵۷ ± ۸/۱۵	۵۰/۲۸ ± ۱۶/۵۹
هایپرآلژزیا حرارتی (ثانیه)	قبل از تمرین	۱۳/۲۱ ± ۱/۱۱	۸/۸۸ ± ۱/۱۲	۱۲/۶۸ ± ۰/۶۲
	پس از تمرین	۱۲/۴۵ ± ۰/۹۱	۷/۹۵ ± ۰/۹۷	۱۲/۵۷ ± ۱/۰۱

\* اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم ( $p < 0/01$ )، # اختلاف معنی دار با گروه کنترل تمرین ( $p < 0/01$ ). † اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی ( $p < 0/01$ ).



نمودار ۱. تغییرات وزن عضله نعلی در گروه‌های مختلف.

\* †: به ترتیب اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم و دیابت کنترل ( $p < 0.05$ ).



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

\* †: به ترتیب اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم و دیابت کنترل ( $p < 0.05$ ).

## 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 هایپیرگلاسمی باشد، 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 اسکلتی، 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 نروترفیک، 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 اسکلتی می‌گردد و تمرین ورزشی قادر است این روند را معکوس سازد، به گونه‌ای که وزن عضله نعلی در رت‌های دیابتی به طور 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 اسکلتی در سلول‌های ماهواره‌ای که به عنوان تکثیرکننده‌های میوژنیک شناخته شده‌اند، 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،



از سلول عضلانی القا شده توسط انقباض، به شیوه وابسته به AMPK، اکسیداسیون چربی در عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد.

BDNF به عنوان 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، احتمالاً در تنظیم متابولیسم و توده عضله اسکلتی نقش داشته است.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که احتمالاً در عضله نعلی رت‌های دیابتی، تنظیم افزایشی سطوح BDNF mRNA و TrkB، در توسعه آتروفی عضلانی درگیر بوده و تمرین استقامتی می‌تواند به عنوان 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 به عنوان 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 به عمل می‌آید.

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 هایپرگلیسمی 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 (۳۴-۳۶). 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 اندوکربینی 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 اتوکربین، پاراکربین یا اندوکربینی دارند، به عنوان میوکاین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. به نظر می‌رسد BDNF مشتق

## 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- $\kappa$ B 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, Parsadonian 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 uninjured 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 skeletal 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 Hooymissen 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.<sup>1</sup>, Abdolreza Kazemi, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Masood Rahmati, Ph.D.<sup>3</sup>

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