دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم– شماره۱۰۷
آبان ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۶/۳
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۹/۱۷
پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۷

اثر تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن CDK5 در نورون‌های حسی موش‌های صحرایی نر با نوروپاتی دیابت

نویسندگان: محمدکشاورز[۱]، رضا قراخانلو*[۲]، منصوره موحدین[۳]، مسعود رحمتی[٤]، امیربهادر دخیلی[۱]

۱. کارشناس ارشد گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.
۲. دانشیار گروه تربیت بدنی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.
۳. استاد گروه آناتومی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.
٤. دانشجوی دکترا گروه تربیت بدنی(فیزیولوژی)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: *رضا قراخانلو* E-mail: ghara_re@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه‌و هدف: تنظیم افزایشی و کاهشی بیان ژن CDK5 به‌عنوان یک پروتئین کیناز، در سیستم عصبی راه‌اندازی مسیرهای مرگ یا بقای نورون‌ها را به‌همراه‌دارد. لذا با توجه به آثار مزمن تمرین استقامتی بر رشد، جوانه‌زنی و عملکرد نورونی به‌ویژه در شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی، در پژوهش حاضر به بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر کاهش بیان ژن CDK5 در نورون‌های حسی موش‌های صحرایی نر ویستار با نوروپاتی دیابتی پرداختیم.

مواد و روش‌ها: ۲۸ موش‌های صحرایی پس از رسیدن به وزن مطلوب (۲۰±۲۵۰ گرم)، به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم (C)، تمرین سالم (HT)، کنترل نوروپاتی (N) و تمرین نوروپاتی (NT) تقسیم‌شدند. دیابت با استفاده از یک وهله تزریق STZ (۴۵ mg/Kg) ایجادشد. گروه‌های تمرین شش هفته تمرین استقامتی را روی تردمیل اجراکردند. آزمودنی‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی قربانی شدند و بیان ژن CDK5 در بخش حسی سگمنت‌های نخاعی عصب سیاتیک با روش Real time اندازه‌گیری و با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه‌شد. برای تعیین معناداری تفاوت بین متغیرها از روش تحلیل واریانس دوطرفه استفاده‌شد.

نتایج: بیان ژن CDK5 پس از شش هفته تمرین استقامتی در بخش حسی نخاع گروه تمرین نوروپاتی به‌طور معناداری نسبت‌به گروه کنترل نوروپاتی کمتر بود؛ همچنین تمرین، کاهش معنی‌دار سطوح گلوکز خون در گروه نوروپاتی تمرین نسبت‌به گروه نوروپاتی کنترل را به‌همراه‌داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش ویژه CDK5 در توسعه و رشد یا مرگ نورونی، پژوهش حاضر نشان‌داد که تمرین استقامتی مزمن با اثرهای مفید خود بر شبکه نورونی به کاهش (تعدیل) بیان ژن CDK5 در حالت پاتولوژیکی منجرمی‌شود.

واژگان کلیدی: CDK5، تمرین استقامتی، نوروپاتی دیابت

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ‌ومیر در دنیاست که اختلال‌هایی متعدد ازجمله نوروپاتی[1]، نفروپاتی[2]، رتینوپاتی[3]، بیماری‌های قلبی عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را به‌دنبال‌دارد (۱)؛ در میان مدل‌های حیوانی از تزریق STZ[4] نیز به‌عنوان یک مدل کارآمد برای القای دیابت استفاده‌شده‌است. STZ موجب هایپرگلایسمی و هیپوانسولینی ماندگار در حیوانات دیابتی می‌شود و سرانجام، ورود و تجمع گلوکز اضافی در نورون‌ها موجب راه‌اندازی مسیرهای متابولیکی مخرب می‌شود (۲). در مدل‌های مختلف موش‌های صحرایی و دیگر نمونه‌های حیوانی درپی ایجاد دیابت، علائم نوروپاتی دیابت با ظهور این شرایط تخریبی در نورون‌ها همپوشانی‌داشته‌است که ابتدا نورون‌های حسی و سپس حرکتی را درگیرمی‌کند (۳). نوروپاتی ایجادشده توسط بیماری دیابت، توزیع آناتومیکی، دوره‌های درمانی و به‌احتمال، سازوکارهای سبب‌شناسی مختلفی را دربرمی‌گیرد (٤). ایجاد شرایط پاتولوژیکی و تخریب عصبی در نورون‌های حسی از برهم‌ریختگی ساختار اسکلت سلولی نورون درپی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلامان‌ها در بدنه نرون و عدم انتقال مناسب و به‌جای آنها در طول نرون نشأت‌می‌گیرد که در این شرایط، ممکن است انباشتگی نابه‌جای نوروفیلامان‌ها در جای جای سلول عصبی صورت‌گیرد که به برهم‌خوردن ساختار نورون منجرمی‌شود (۵).

همچنین نارسایی‌های نورون‌های حسی با اعمال تغییرها در سیستم ایمنی، مسمومیت‌های ویتامینی، داروهای اعصاب و بیماری‌های تهدیدکننده مانند سرطان همراه است، ضعف نورون‌های حسی در DRG[5] به تخریب آکسون‌های محیطی در این نورون‌ها و همچنین نورون‌های حسی مرکزی منجرمی‌شود (٦)، اختلال در این نورون‌ها می‌تواند به عواملی نظیر درد نوروپاتیکی، هایپرگلیسمی و سندرم اندامی حسی (حساسیت در اندام قطع شده) بینجامد (۷)؛ درواقع در نورون‌های حسی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلامان‌ها دلیل اصلی ظهور شرایط تخریب عصبی است (۸)؛ ازطرفی، تغییرهای موضعی که پس از آسیب وجوددارند با عملکرد سلول‌های ایمنی توسعه فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های T، مرتبط‌اند. افزایش سنتز، بیان و رهاسازی سایتوکاین‌هایی نظیر IL-6، IL-1 و TNFα از دلایل نارسایی در نورون‌های حسی هستند که باعث شلیک خودبه‌خودی پیام عصبی از نورون حسی می‌شوند (۵).

CDK5[6] به‌عنوان یک پروتئین کیناز، یکی از اعضای منحصربه‌فرد خانواده CDKs است. عملکرد بهینه و نرمال این کیناز برای بازیابی شرایط هموستاز و توسعه شبکه نورونی ضروری است (۹ و ۱۰)؛ فعالیت بیش از حد یا عدم تنظیم فعالیت این کیناز در شرایط پاتولوژیک به روند افزایشی در تسریع آپوپتوز و بیماری‌های تخریب عصبی منجرمی‌شود(۱۱). فعالیت و بیان CDK5 در سیستم عصبی مرکزی (CNS) به‌چشم‌می‌خورد (۹). CDK5 به‌عنوان یک کیناز، تنظیم‌کننده اعمال و انتقال آکسونی با فسفوریلاسیون در رشته‌های عصبی (NFs) است (۱۲). *کروز و تسای* (۲۰۰٤)، عدم تنظیم فعالیت و بیان CDK5 را در بیماری تخریب عصبی آلزایمر نیز مشاهده‌کردند (۱۳)؛ *آلویرا و همکاران* نیز (۲۰۰٦)، نقش محافظتی یا افزایشی CDK5 در روند آپوپتوز را در نورون‌های محیط کشت بیان‌کردند (۱٤)؛ همچنین *کرو و ماسلیا* (۲۰۱۰)، نقش CDK5 را در روند بیماری آلزایمر به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی پیش‌رونده گزارش‌کردند (۱۵)؛ به‌طور کلی، مطالعات صورت‌گرفته از نقش CDK5 در فرایندهای تنظیم هموستاز و توسعه نورونی (۱٦)، آپوپتوز عصبی (۱۷)، انتقال آکسونی (۱۲) و تنظیم فسفوریلاسیون سیتواسکلتون آکسونی (۸) حکایت‌دارند. فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلامان‌ها در

[1] - Neuropathy
[2] - Nephropathy
[3] - Retinopathy
[4]- streptozotocin
[5]- Dorsal Root Ganglion
[6]- Cyclin Dependent Kinase 5

Archive of SID

www.SID.ir

بسیاری از بیماری‌های تخریب عصبی رخ‌می‌دهد؛ در مدل موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با تزریق STZ نیز این غیرنرمال‌بودن فسفوریلاسیون در اعصاب حسی مشاهده‌شده‌است (۸).

مطالعات بنیادی نشان‌داده‌اند که فعالیت ورزشی، روشی امیدبخش به‌منظور افزایش بازسازی آکسونی[1] است؛ ورزش همچنین درمانی مؤثر برای بهبود عملکرد اعصاب حسی به‌شمارمی‌آید (۱۸). در تحقیق‌ها نشان‌داده‌شده که فعالیت ورزشی با شدت متوسط آثاری مثبت را در بهبود بیماری ALS[2] به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی داشته‌است (۱۹)؛ همچنین تمرین استقامتی مزمن با افزایش تروفیک فاکتورها به بهبود بازسازی آکسونی و شکل‌پذیری نورونی در نورون‌های حسی پس از آسیب این اعصاب در رت‌ها منجرشد (۲۰). پژوهش‌های پیشین، بیان ژن و سطوح پروتئین CDK5 را در بیماری‌های تخریب عصبی و شرایط ویژه پاتولوژیکی بررسی و عدم تنظیم سطوح CDK5 را نیز گزارش‌کرده‌اند؛ ازطرفی، تاکنون پژوهشی، اثر مداخلات درمانی نظیر تمرین ورزشی را بر بهبود تنظیم سطوح CDK5 ارائه‌نداده‌است، لذا با توجه به مبانی نظری بالا مبنی‌بر اثر ورزش بر بهبود عملکرد نورونی و جلوگیری از گسترش شرایط تخریب عصبی و همچنین نقش انکارناپذیر CDK5 در توسعه شبکه نورونی و همچنین راه‌اندازی مسیرهای رشد یا مرگ سلولی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف، هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین استقامتی مزمن بر بیان ژن این کیناز در بخش حسی سیستم عصبی مرکزی موش‌های صحرایی با نوروپاتی دیابت است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۲۸ سر موش صحرایی بالغ نر ده هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۱/۲±۲۷۱/۳ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل‌شدند. تمامی موش‌های صحرایی در شرایط کنترل‌شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی– تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری‌شدند. در پژوهش حاضر، تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات، توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی و تأیید قرارگرفته‌است. پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون‌صفاقی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO؛ ٤٥ mg/Kg حل‌شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ mol/L ، pH:٤/٥) دیابت القاشد؛ به موش‌های صحرایی غیردیابتی نیز، معادل حجمی بافر سیترات تزریق‌شد. ٤٨ ساعت پس از تزریق، با ایجاد جراحتی کوچک توسط لانست، روی ورید دم موش‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرارداده‌شد و نوار با دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده‌شد و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به‌عنوان دیابتی درنظرگرفته‌شدند (۲۱). لازم به یادآوری است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه علائم ناشی از تزریق اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده‌نشد.

پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب ۸/٤±۳۲٦/۳ گرم، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی در چهار گروه ۷تایی قرار گرفتند: گروه اول (گروه نوروپاتی تمرین)، گروه دوم (گروه نوروپاتی کنترل)، گروه سوم (گروه سالم کنترل) و گروه چهارم (گروه سالم تمرین) به‌طور خلاصه، ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور «خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری»، حیوانات پنج روز در هفته به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه روی نوارگردان راه‌رفتند. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و میان ساعت‌های ١٦ تا ١٨ عصر برگزارشدند در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۰ تا ۵۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و درعین‌حال، کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک (۲۲)، استفاده‌شد؛ بدین‌صورت‌که گروه‌های

1- Axon Regeneration
2 - Amyotrophic Lateral Sclerosis

Archive of SID
www.SID.ir

تمرین در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و به‌مدت شش هفته قرارگرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به‌تدریج افزایش‌یافت (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرینی پژوهش حاضر (۲۲)

هفته	سرعت	مدت
اول	۱۰متر در دقیقه	۱۰ دقیقه
دوم	۱۰متر در دقیقه	۲۰ دقیقه
سوم	۱۴-۱۵متردر دقیقه	۲۰ دقیقه
چهارم	۱۴-۱۵متردر دقیقه	۳۰ دقیقه
پنجم	۱۷-۱۸متردر دقیقه	۳۰ دقیقه
ششم	۱۷-۱۸متردر دقیقه	۳۰ دقیقه

به‌منظور رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته‌شدند (۲۲)؛ همچنین، از هیچ‌گونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده‌نشد و در صورت لزوم با استفاده از دست یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور می‌شدند تمرین را ادامه‌دهند.

موش‌های صحرایی در هر دو گروه به‌مدت شش هفته پس از تزریق STZ با ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌صورت داخل‌عضلانی) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیهوش شدند. بی‌درنگ پس از بیهوشی، خون موش‌های صحرایی به‌طور مستقیم با سرنگ از قلب کشیده‌شد و پس از مشخص‌کردن ناحیه Lumbar enlargement نخاع، تحت شرایط استریل سگمنت‌های نخاعی تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک L4-L6, مشخص شد و بخش حسی نخاع در آن قسمت بادقت جدا و بافت‌های مورد نظر بی‌درنگ در نیتروژن مایع، منجمد شدند و این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر $^{\circ}c$ ۷۰- منجمد و نگهداری‌شدند.

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع برای استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در0C ٤، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد؛ سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان‌داده‌شد. محصول در 0C ٤، min ۱۵، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته‌شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در0C ٤، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در Lµ20 آب RNAS-Free حل‌شد. غلظت RNA مورد سنجش قرارگرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ میان ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف‌شد. سنتز cDNA با استفاده از gµ1 از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv transcriptase Reverse انجام‌گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان CDK5 mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام‌شد (Applied USA ,Biosystems). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lµ20 و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت‌پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های CDK5 و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام‌شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش‌شده‌است؛ ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده‌شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰ به‌مدت ۱ دقیقه (تکرار ٤۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش 2-ΔΔCT محاسبه‌شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

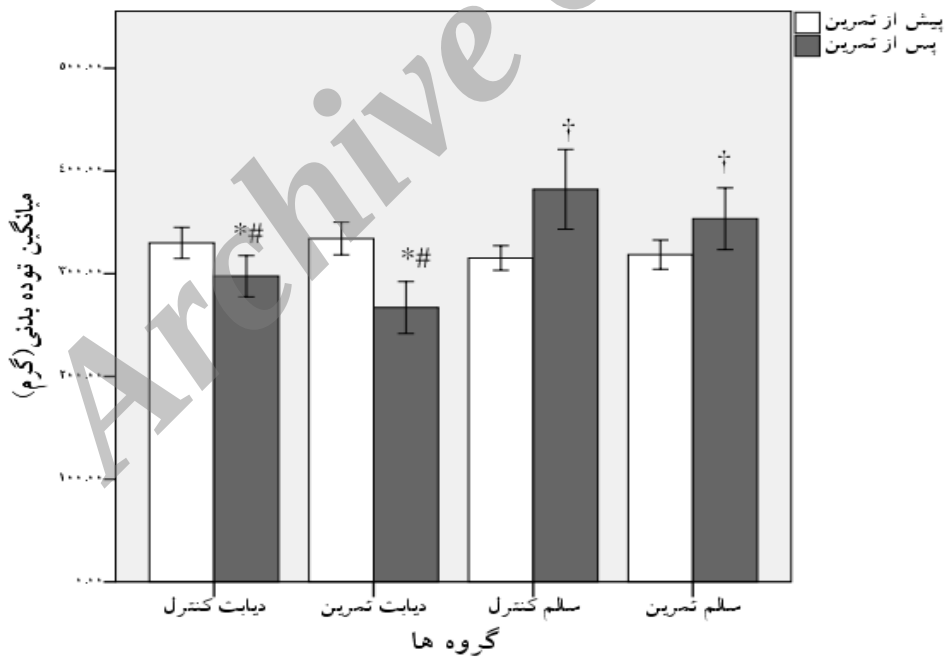
جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Primer sequence	GenBank code
CDK5	- GGC TTCATGATGTCCTGCATA-3′For: 5 ′- GAC AGA ATC CCA GGC CTT TC -3′Rev: 5′	NM_001100673
GAPDH	′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3′For: 5 ′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT -3′Rev: 5	NM_017008

برای تعیین نرمال‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف‌اسمیرنوف (KS)، استفاده‌شد؛ همچنین همسان‌بودن واریانس‌ها با آزمون Leven ارزیابی‌شد. برای تعیین معناداری تفاوت میان متغیرها و تعامل آنها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده‌شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم-افزارهای SPSS-20، انجام و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ (P<0.05) درنظرگرفته‌شد.

نتایج

میانگین تغییرهای وزن گروه‌های تمرین و کنترل نوروپاتی نسبت‌به گروه‌های تمرین و کنترل سالم به‌طور معنی‌دار کمتر بود (به‌ترتیب p=۰/۰۰۰۱ و p=۰/۰۰۱)؛ همچنین، میانگین وزن گروه نوروپاتی تمرین نسبت‌به گروه نوروپاتی کنترل به‌طور معنی‌دار کمتر بود (p=۰/۰٤). اگرچه، میانگین وزن گروه سالم تمرین نسبت‌به گروه سالم کنترل کمتر بود، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۱) (نمودار ۱).

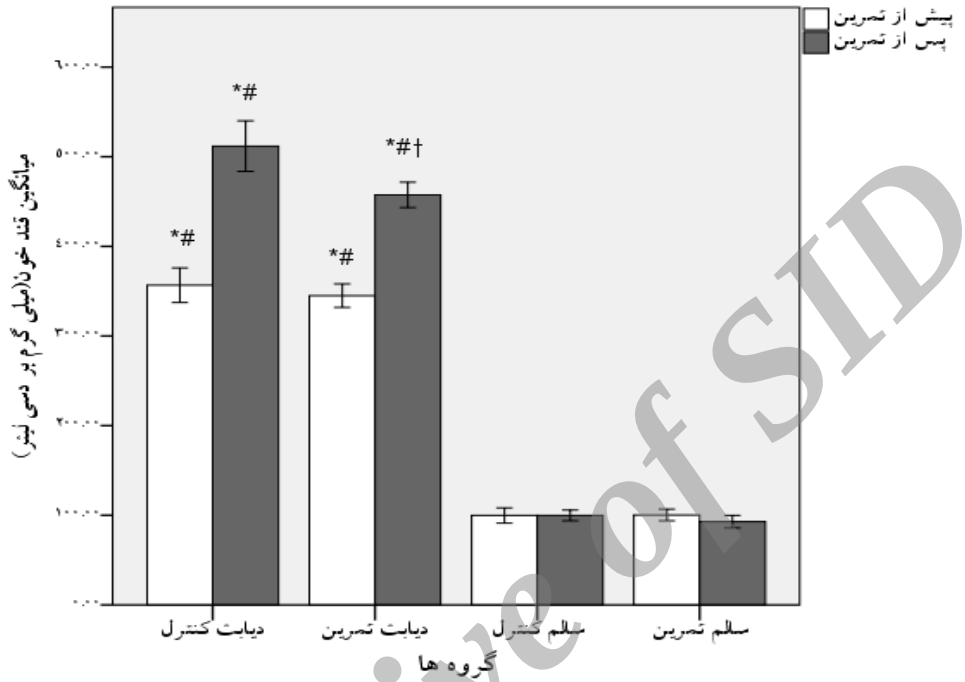


نمودار ۱. تغییرهای توده بدن در گروه های مختلف.* اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل (P≤۰/۰۱)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین (P≤۰/۰۱)، † اختلاف معنادار با گروه نوروپاتی کنترل (P≤ ۰/۰۱)

Archive of SID

www.SID.ir

در آغاز برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی نسبت‌به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌دار بالاتر بود (p=۰/۰۰۰۱) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان، اختلافی معنی‌دار داشت (p=۰/۰۰۰۱)؛ همچنین، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی تمرین نسبت‌به گروه نوروپاتی کنترل به‌طور معنی‌دار پایین‌تر بود (p=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۲).

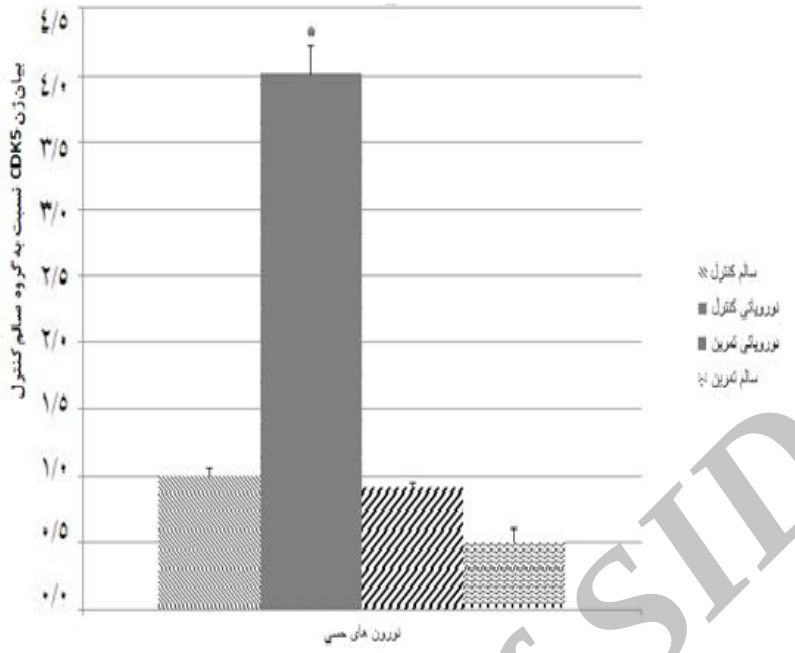


نمودار۲. تغییرهای گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف.* اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل(P≤۰/۰۱)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین (P≤۰/۰۱)، † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل (P≤ ۰/۰۱)

بیان ژن CDK5 در نرون‌های حسی گروه نوروپاتی تمرین (P=۰/۰۰۲)، سالم کنترل(P=۰/۰۱۳) و سالم تمرین(P=۰/۰۰۲) به‌طور معناداری نسبت‌به گروه نوروپاتی کنترل پایین‌تر بود. تفاوت معناداری در سطوح بیان ژن CDK5 میان گروه نوروپاتی تمرین نسبت‌به سالم کنترل (P= ۰/۳۵) و سالم تمرین (P=۰/۹۸) مشاهده‌نشد. تفارت میزان بیان ژن CDK5 در گروه سالم تمرین نسبت‌به گروه سالم کنترل با کاهش، همراه بود هرچند که به لحاظ آماری با تغییرهای معناداری همراه نبود (P= ۰/۳۶) (نمودار۳).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۳. تفاوت معنادار میان گروه نوروپاتی کنترل و سایر گروه‌ها ($P<$۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات نشان‌می‌دهند که ورزش می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت‌کند (۲۳)؛ بیان انتقال‌دهنده‌های گلوکز را افزایش‌دهد (۲٤) و سرانجام، کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به‌همراه‌داشته‌باشد (۲۵). ورزش می‌تواند برای کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن، مفید واقع شود؛ به‌علاوه، نشان‌داده‌شده که تمرین ورزشی می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش‌دهد(۲۵). همسو با نتایج پیشین در پژوهش حاضر نشان‌داده‌شد که تمرین استقامتی مزمن به کاهش معنادار سطوح گلوکز پلاسما در موش‌های صحرایی با نوروپاتی دیابت منجرمی‌شود که می‌تواند دلیلی برای وقایع پیش‌گفته محسوب‌شود. تخریب سلول‌های β پانکراس ترشح‌کننده انسولین، متعاقب تزریق STZ، موجب کاهش شدید سطوح انسولین و بنابراین هایپرگلیسمی می‌شود؛ ازبین‌رفتن توده عضلانی در مدل‌های کاهش انسولینی شدید (دیابت ایجادشده با استفاده از STZ مشاهده‌شده-است(۲٦)؛ ازبین‌رفتن توده عضلانی با کاهش سنتز پروتئین و افزایش تجزیه پروتئین در عضله اسکلتی ارتباط‌دارد. پیشنهادشده‌است که سطوح بیش از حد بالای گلوکز پلاسما می‌توانند در حضور سطوح انسولین پایین یا مقاومت انسولین به آتروفی عضلانی منجرشوند (۲۷)؛ بنابراین می‌توان دلیل اصلی کاهش وزن حیوانات دیابتی در پژوهش حاضر را کاهش سنتز پروتئین و آتروفی عضلانی در مدل‌های دیابتی دانست که به‌وضوح مشخص شده‌بود.

تاکنون پژوهشی که بیان ژن CDK5 را در شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین ورزشی بر بیان ژن این کیناز در نورون‌های حسی بررسی‌کند، انجام‌نشده‌است. لذا پژوهش حاضر، اولین پژوهشی است که به بررسی تغییرهای بیان ژن CDK5 در شرایط پاتولوژکی نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین ورزشی بر میزان بیان ژن این کیناز در نورون‌های حسی پرداخته‌است.

یکی از پیامدهای پاتولوژیکی افزایش بیان CDK5 همان‌طورکه اشاره‌شد، افزایش فسفوریلاسیون

Archive of SID

www.SID.ir

نوروفیلامان و پروتیئن‌های وابسته به آن در اعصاب حسی است (۲۸) که نتیجه آن، برهم‌خوردن نظم اسکلت سلولی آکسون و جداشدن موتورپروتیئن‌های انتقال‌دهنده مواد در طول آکسون از نوروفیلامان‌هاست که به‌نوعی، مسیر ارتباطی میان نقاط مختلف آکسون هستند؛ درواقع بر اثر افزایش فسفوریلاسیون نوروفیلامان‌ها و کاهش نرخ سرعت و میزان انتقال آکسونی است که درنهایت به ظهور شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی در این نوع اعصاب منجرمی‌شود (۱۲ و ۲۹).

می‌توان‌بیان‌کرد که عدم تنظیم فعالیت این کیناز در شرایط پاتولوژیکی، نظیر التهاب و دیابت (۹) به‌چشم‌می‌خورد. نقش CDK5 در عملکرد دیگر عوامل کلیدی سیستم نورونی، مانند «سیگنالینگ درد با تنظیم عملکرد مورفین و کارکرد ضروری آن در ایجاد درد و مسیر سیگنالینگ آن در نورون‌های حسی (۳۰)، انتقال آکسونی و عامل جداسازی موتورپروتئین‌ها نظیر کاینزین از نوروفیلامان ها با فسفوریلاسیون بیش از حد در شرایط پاتولوژیکی و کاهش نرخ انتقال آکسونی» به‌عنوان یک عامل مهم و مؤثر در رشد و جوانه‌زنی نورونی (۱۲) و همچنین در روند آپوپتوز سلولی با فسفوریلاسیون گیرنده‌ها در ابتدای مسیرهای سیگنالینگ و جلوگیری از ادامه‌یافتن این مسیرهای مربوط به رشد و زنده‌ماندن نورون‌ها مانند مسیر MEK [1] (۳۱) و مسیر NGF [2] (۳۲) نقش اساسی ایفامی‌کند. همان‌طورکه انتظارمی‌رفت در پژوهش حاضر، بیان ژن CDK5 در نورون‌های حسی گروه آزمودنی‌های با نوروپاتی دیابت به‌طور چشمگیری بالا رفت که پیامد آن، افزایش بیش از حد فسفوریلاسیون در نوروفیلامان‌ها، اسکلت سلولی آکسون و برخی گیرنده‌ها و پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالینگ مختلف است و درنهایت امر، ایجاد شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی در نورون‌ها نظیر نروپاتی دیابت را به‌همراه‌خواهدداشت وازسوی‌دیگر تمرین استقامتی مزمن به‌عنوان یک عامل مؤثر در جلوگیری از گسترش این شرایط باعث کاهش چشمگیر بیان ژن این کیناز شد.

در نورون‌های حسی، ایجاد شرایط پاتولوژیکی و تخریب عصبی ناشی از برهم‌ریختگی ساختار اسکلت سلولی نورون درپی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلامان‌ها، عدم انتقال مناسب نوروفیلامان‌ها در طول نورون و درنهایت، انباشتگی و برهم‌خوردن ساختار نورون رخ‌می‌دهد (۸)؛ ازطرفی در نورون‌های حسی، تغییرهای موضعی که پس از آسیب وجوددارند با عملکرد سلول‌های ایمنی توسعه فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های T مرتبط‌اند. افزایش سنتز، بیان و رهاسازی سایتوکاین‌هایی نظیر IL-6، IL-1 و TNFα از دلایل نارسایی در این نوع نورون‌هاست (۵) .پژوهش‌های پیشین، افزایش بازسازی آکسونی در نورون‌های حسی DRG پس از آسیب سیاتیک در موش‌های صحرایی درپی تمرین ارادی (۳۳)، بهبود عملکرد نورون‌های حسی در موش‌های صحرایی با آسیب نخاعی (SCI) درپی تمرین استقامتی مزمن (۳٤) و بهبود بازسازی آکسونی و شکل‌پذیری نورونی در نورون‌های حسی با افزایش نوروتروفین‌ها درپی تمرین مزمن (۲۰) را نیز گزارش‌کردند .همسو با پژوهش‌های پیشین (۲۰، ۳۳ و ۳٤) مبنی‌بر «آثار تمرین ورزشی بر عملکرد نورون‌های حسی»، این نورون‌ها در تغییرهای بیان ژن CDK5 در شرایط نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین استقامتی مزمن در آزمودنی‌های نوروپاتی با افزایش چشمگیر بیان ژن این کیناز در آزمودنی‌های با نوروپاتی دیابت و همچنین کاهش معنادار بیان ژن این کیناز بر اثر تمرین استقامتی مزمن در آزمودنی‌های مبتلا به نوروپاتی دیابت همراه بود.

در آزمودنی‌های سالم، تمرین استقامتی به کاهش سطوح بیان ژن CDK5 نسبت‌به گروه سالم کنترل منجرشد هرچند که به لحاظ آماری، معنادار نبود. با توجه به اینکه فعالیت CDK5 در برخی مسیرهای سیگنالینگ که در گذشته اشاره‌شد به فسفوریلاسیون برخی گیرنده‌ها و پروتین‌ها و همچنین جلوگیری از

1- Mitogen Extracellular Kinase
2- Nerves Grow Factor

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه‌یافتن این مسیرهای مربوط به رشد و زنده‌ماندن نورون‌ها مانند مسیر MEK (۳۱)و مسیر NGF (۳۲) منجرمی‌شود؛ ازطرفی، تمرین ورزشی مزمن به سازگاری در نورون‌ها، بهبود عملکرد آکسونی و درنتیجه آن، رشد و جوانه‌زنی و توسعه شبکه نورونی می‌انجامد (۱۸)؛ بنابراین به‌نظرمی‌رسد به‌منظور رشد و جوانه‌زنی نورونی درپی سازگاری با تمرین کاهش بیان ژن این کیناز می‌تواند به کاهش فعالیت آن در مسیرهای سیگنالینگ نام‌برده دانست که درنهایت، کاهش فسفوریلاسیون سوبستراهای مختلف و پایدارماندن مسیرهای سیگنالینگ مربوط به رشد و زنده‌ماندن نورون‌ها منجرمی‌شود.

به‌طورکلی، همسو با پژوهش *رحمتی و همکارن*، (۱۳۹۱) (۳۵) مبنی‌بر اثر تمرین استقامتی بر بهبود شرایط نوروپاتی در موش‌های صحرایی دیابتی، در پژوهش حاضر به‌نظرمی‌رسد که افزایش فعالیت بدنی به شکل تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌تواند دارای آثاری مفید بر بهبود شرایط نوروپاتیک باشد؛ هرچند که با توجه به بررسی سطوح بیان ژن CDK5، انتظارمی‌رود تغییرها در سطوح پروتئینی درنتیجه بیان ژن بیش از حد به سطوح پروتئین بالاتر و فعالیت بالاتر این کیناز منجرمی‌شود که درنهایت به اثر نهایی از طریق فسفوریلاسیون نوروفیلامان‌ها و گیرنده‌های مختلف بینجامد؛ هرچند که برای دستیابی به شرایط قطعی‌تر پیشنهادمی‌شود سطوح پروتئین CDK5 نیز اندازه‌گیری‌شوند؛ ازاین‌رو پیشنهادمی‌شود که تمرین ورزشی به شکل استقامتی به‌عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش روند پیش‌رونده تخریب عصبی به‌کارگرفته‌شود؛ همچنین پیشنهادمی‌شود پژوهش‌های آینده بر کارایی انواع تمرین‌های مختلف ورزشی برای بیماران دیابتی متمرکز شوند و سایر عناصر و سازوکارهای مؤثر و مرتبط را مورد بررسی قراردهند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری گروه آناتومی و علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پژوهش به ما یاری‌رساندند، تشکر و قدردانی‌می‌شود.

منابع

1. Banting FG & Best CH. Panceratic extracts. J.Lab Cin.Med 1990; 115: 254-272.
2. Wattiez AS, Barrière DA, Dupuis A, Courteix C. Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them?. Diabetes Metab 2012; 43: 008.
3. Zochodne DW, Ramji N, Toth C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. Neuroscientist 2008; 14: 311-8
4. Yasuda Hitoshi, Terada Masahiko, Maeda Kengo, Kogawa Shuro, et all. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Progress in Neurobiology 2003; 69: 229–285.
5. Wolf G, Gabay E, Tal M, Yirmiya R, Shavit Y. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. Pain 2006; 120: 315-24.
6. Sghirlanzoni A, Pareyson D, Lauria G. Sensory neuron diseases. Lancet Neurol 2005; 4: 349-61.
7. Damasceno A, França MC Jr, Nucci A. Chronic acquired sensory neuron diseases. Eur J Neurol 2008; 15: 1400-5.
8. Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. Diabetes 1999; 48: 881-9.
9. Contreras-Vallejos E, Utreras E, Gonzalez-Billault C. Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. Cell Signal 2012; 24: 44-52.
10. Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. Neuron 2002; 22: 15-27.
11. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. Trends Cell Biol 2012; 22: 169-175
12. Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. J Cell Sci 2005; 118: 5411-9.
13. Cruz JC, Tsai LH. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Trends Mol Med 2004: 10: 452-8
14. Alvira D, Tajes M, Verdaguer E, Acuña-Castroviejo D, Folch J, Camins A, Pallas M. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. J Pineal Res 2006; 40: 251-8.
15. Crews L, Masliah E, Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Hum Mol Genet 2010: 15: R12-20.
16. Nancy Y. Ip , Li-Huei Tsai. Cyclin dependent kinase 5 (CDK5). 1st: Springer Science, LLC 2008 ; 1-23.
17. Shirley B, Shelton and Gail V,W.Johnson. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. Journal of Neurochemistry 2004; 88: 1313–1326.
18. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, Santos AR. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low intensity aerobic exercise nervecrush

Archive of SID

www.SID.ir

on sciatic injury in mice. Neuroscience 2011; 194: 337-348.
19. Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD. The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 2001; 15: 133-7.
20. Udina E, Puigdemasa A, Navarro X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. Muscle Nerve 2011; 43: 500-9.
21. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. Methods Mol Med 2004; 99: 55-65.
22. Chae, C.H., Jung, S.L., An, S.H., Park, B.Y., Wang, S.W., Cho, I.H., Cho, J.Y., Kim, H.T. 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: 1665–1673.
23. Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A.W., Ohno, H.,Nakamoto, H., Goto, S. Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl erivatives in mitochondrial and cytosolic fraction of rat skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys 2000; 383: 114–118.
24. Osborn BA, Darr JT, Laddaga RA, Romano FD & Paulson DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. Applied Physiology 1997; 82: 828-834.
25. 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. Anesth Analg 2012; 114: 1330–7.
26. Bailey C.J., J. P. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. Diabete and Metabolisme (Paris) 1986; 12: 212–21.
27. Russell ST, R. S. Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemi. Exp Cell Res 2009; 315; 16-25.
28. Ralph A. Nixon, Aidong Yuan, editors. Cytoskeleton of the nervous system, chapter14. Advances in neurobiology 2011; 296.
29. Shea TB, Yabe JT, Ortiz D, Pimenta A, Loomis P, Goldman RD, Amin N, Pant HC. Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. J Cell Sci 2004; 29: 933-41.
30. Pareek TK, Kulkarni AB. Cdk5: a new player in pain signaling. Cell Cycle 2006; 6: 585-8.
31. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 10: 749-59.
32. Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. Brain Behav Immun 2007; 21: 642-51.
33. Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 2004: 101; 8473-8.
34. Hutchinson KJ, Gómez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. Brain 2004; 127: 1403-14.
35. Masoud Rahmati, Ali Khazani , Reza Gharakhanlou , Mansoureh Movaheddin . Chronic effects of moderate intensity endurance training on neuropathic pain symptoms in diabetic rats. Physiol Pharmacol 2013; 16: 435-445.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

The Effect of endurance training on gene expression of Cdk5 in sensory neurons of male Wistar rats with diabetic neuropathy

Mohammad Keshavarz[1], Reza Gharakhanlou[1*], Mansoureh Movaheddin[2], Masoud Rahmati[1], Amirbahador Dakhili[1]

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: ghara_re@modares.ac.ir

Abstract:

Background and Objective: Increased and decreased CDK5 gene expression regulation, as a protein kinase, is associated with launching death or survival pathways in the nervous system. According to the chronic effects of endurance training on growth germination, neuronal function and improvement of pathological conditions of neurodegenerative diseases, the aim of our study was to investigate the effect of 6-week endurance training on gene expression of CDK5 in sensory neurons of male Wistar rats with diabetic neuropathy.

Materials and Methods: Twenty eight adult male Wistar rats in the weight range of 326.3±8.4 g, were randomly divided into four groups including healthy control (C), healthy training (HT), neuropathic control (N) and neuropathic training (NT). Diabetes was induced with one injection of STZ (45 mg/kg). Training groups performed 6-week endurance training on the treadmill. Subjects sacrificed 24 hours after last session training. CDK5 gene expression in sensory spinal segments forming the sciatic nerve was measured with Real time technique and calculated using the 2-ΔΔCT method. For identifying significant differences between factors, two-way ANOVA method was used.

Results: After 6-week endurance training, CDK5 gene expression in sensory neurons of NT group was significantly lower than the NC group**.** Also, in comparison with neuropathy control, training led to a significant decrease in blood glucose levels in neuropathic training group.

Conclusion: According to the specific role of CDK5 in neuronal growth or death, our study showed the beneficial effects of chronic endurance exercise on neuronal networks leading to reduced (modification) gene expression of CDK5 in a pathologic condition.

Key words: CDK5, Endurance training, Diabetic neuropathy

Scientific-Research Journal of Shahed University 21st year, No. 107 **October, November 2013**

Received: 2013/8/25
Last revised: 2013/12/8
Accepted: 2013/12/8

Archive of SID

www.SID.ir