Archive of SID

Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The Effect of 4-Week Voluntary Wheel Running on Hippocampus Levels of Semaphorin 3B and Hydrogen peroxide and Apoptosis in Diabetic Rats

Mohammad Fazelzadeh[1]*, Mohammad Ismail Afzalpour[1], Ziya Fallah Mohammadi[2]

[1]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Birjand University, Birjand, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Mazandaran University, Bobolsar, Iran
*Corresponding author; E-mail: afzalpour.me@gmail.com

Received: 12 May 2018 Accepted: 24 June 2018 First Published online: 19 May 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):215-221

Abstract

Background: One of the complications of diabetes is the occurrence of apoptosis in the brain that can lead to cognitive impairment. The aim of this study was to investigate the effect of 4 weeks of voluntary wheel running on hippocampus semaphorin 3B, hydrogen peroxide, and apoptosis in streptozotocin-diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats weight 235±10gr were assigned randomly to 4 groups (n=8): healthy control (C), healthy exercise (E), control-diabetic (D) and diabetic-exercise (ED). Rats were diabetic by intra-peritoneal injection of STZ dissolved in citrate buffer. The experimental groups ran voluntarily in the wheel running for 4 weeks. The subjects were sacrificed 48 hours after the last training session, then hippocampus tissue was extracted from the brain, and ELISA measurements were performed after homogenization and centrifugation of the tissue. One-way ANOVA and independent t-test were used to evaluate the data.

Results: The levels of semaphorin 3B, hydrogen peroxide and apoptosis in D group were significantly higher than C group ($P \leq 0.05$). In the ED group, semaphorin 3B, hydrogen peroxide and apoptosis levels were significantly lower than D group ($P \leq 0.05$). Semaphorin 3B and apoptosis levels in the E group were significantly lower than C and ED groups ($P \leq 0.05$).

Conclusion: The results showed that experimental diabetes induction increases semaphorin 3B, hydrogen peroxide and apoptosis rate in the brain hippocampus. Four weeks of voluntary running was associated with a decrease in the hippocampus levels of semaphorin 3B, hydrogen peroxide and apoptosis.

Keyword: Streptozotocin, Apoptosis, Semaphorin 3B, Hydrogen Peroxide, Rats, Hippocampus, Voluntary exercise

How to cite this article: Fazelzadeh M, Afzalpour M I, Fallah Mohammadi Z. [The Effect of 4-Week Voluntary Wheel Running on Hippocampus Levels of Semaphorin 3B and Hydrogen peroxide and Apoptosis in Diabetic Rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):215-221. Persian.

© 2020 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

تاثیر ۴ هفته دویدن اختیاری روی چرخ دوّار بر میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز هیپوکامپ موش های صحرایی دیابتی شده

محمد فاضل زاده[۱*]، محمد اسماعیل افضل‌پور[۱]، ضیاء فلاح محمدی[۲]

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
[۲] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[*] نویسنده مسوول؛ ایمیل: afzalpour.me@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲):۲۱۵-۲۲۱

چکیده

زمینه: یکی از عوارض بیماری دیابت وقوع آپوپتوز در مغز می باشد که می‌تواند منجر به اختلالات شناختی گردد. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر ۴ هفته دویدن اختیاری روی چرخ دوّار بر میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین بود.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۱۰± ۲۳۵ گرم، به طور تصادفی در ۴ گروه کنترل سالم (C)، تمرین سالم (E)، کنترل دیابت (D) و تمرین دیابت (ED) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی با تزریق استرپتوزوسین محلول در بافر سیترات به صورت درون صفاقی، دیابتی شدند. آزمودنی‌های گروه‌های تمرینی به مدت ۴ هفته در قفس‌های مجهز به چرخ دوّار و به صورت اختیاری به فعالیت پرداختند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی قربانی شدند، سپس بافت هیپوکامپ از مغز استخراج و پس از هموژنایزاسیون و سانتریفیوژ به روش الایزا اندازه‌گیری متغیرها انجام گرفت. از آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه و t مستقل برای ارزیابی اطلاعات، استفاده شد.

یافته‌ها: میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز در گروه D به صورت معنی‌دار بیشتر از گروه C بود (P≤۰/۰۵). در گروه ED میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز به صورت معنی‌دار کمتر از گروه D بود (P≤۰/۰۵). میزان آپوپتوز و سمافورین B۳ در گروه E به صورت معنی‌دار کمتر از گروه C و ED بود (P≤۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد القای دیابت تجربی موجب افزایش میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز در هیپوکامپ مغز می‌شود. دویدن اختیاری در مدت ۴ هفته با کاهش سطوح سمافورین B۳ و پراکسید هیدروژن و آپوپتوز هیپوکامپ همراه بود.

کلید واژه‌ها: استرپتوزوتوسین (استرپتوزوسین)، آپوپتوز، سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن، موش‌های صحرایی، هیپوکامپ، تمرین اختیاری

نحوه استناد به این مقاله: فاضل زاده م، افضل‌پور م ا، فلاح محمدی ض. تاثیر ۴ هفته دویدن اختیاری روی چرخ دوّار بر میزان سمافورین B۳، پراکسید هیدروژن و آپوپتوز هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲): ۲۱۵-۲۲۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیک پیشرفته و مزمن است که باعث مشکلات سلامت عمومی می‌شود. امروزه، اختلالات وابسته به دیابت یکی از مهمترین عوامل دخیل در مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود (۱). در القای دیابت آزمایشگاهی در مدل حیوانی که از استرپتوزوسین (STZ) استفاده می‌گردد پس از تزریق، STZ توسط ناقل گلوکز ۲ ($GLUT_2$) وارد سلول‌های بتا می‌شود و با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، آسیب DNA و تخریب بافتی پانکراس را ایجاد می‌کند، روندی که در نهایت با عدم ترشح و یا ترشح ناکافی انسولین، دیابت نوع ۱ را القا می‌نماید و بدین ترتیب هیپرگلایسمی رخ می‌دهد (۲). هیپرگلیسمی تحت شرایط دیابتیک، اغلب با عوارض جانبی از قبیل بیماری‌های قلبی عروقی، نارسایی کلیوی، رتینوپاتی و نوروپاتی مرتبط است. مطالعات متعددی نشان دادند که سیستم اعصاب محیطی (PNS) و نیز سیستم اعصاب مرکزی (CNS) در دیابتی‌ها دچار اختلال می‌گردند. در دیابت نوع ۱ اعصاب به ویژه اعصاب هیپوکامپ به طور قابل ملاحظه‌ای آسیب‌پذیر هستند (۲،۳). هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که با یادگیری، حافظه و عملکرد شناختی در حیوانات و همچنین انسان‌ها مرتبط است (۲). در حالیکه ساز و کار تاثیر هیپرگلیسمی در دیابتی‌ها روی اعصاب کمتر شناخته شده، اما نشان داده شده است هیپرگلایسمی می‌تواند از طریق اختلال در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی طی فرآیند فسفریلاسیون اکسایشی، باعث تولید بیشتر میتوکندریایی رادیکال‌های آزاد (سوپر اکساید، پراکسید هیدروژن) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و به نوبه خود ایجاد شرایط فشار اکسایشی شود (۴). افزایش التهاب و فشار اکسایشی ناشی از دیابت، می‌تواند موجب افزایش آپوپتوز سلول‌های عصبی هیپوکامپ شود، به گونه‌ای که شکل‌پذیری عصبی، تکثیر و بقا سلول‌های عصبی و در نهایت، نوروژنز هیپوکامپ کاهش می‌یابد (۵). آپوپتوز، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که برای تنظیم نمودن جمعیت سلولی به کار می‌رود و در بسیاری از بیماری‌ها تنظیم نادرست آپوپتوز اختلال اصلی به شمار می‌رود (۶). آپوپتوز نقش اساسی در مرگ عصبی ناشی از دیابت در هیپوکامپ ایفا می‌کند. در مقاله‌ای مروری اظهار شده است که دیابت از طریق ساز و کارهای متعددی از قبیل فشار اکسایشی، فعالسازی کاسپازها، اختلال در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز، و نیز نقص در عملکرد میتوکندری ممکن است باعث ایجاد آپوپتوز در اعصاب هیپوکامپ شود (۷). یکی از پروتئین‌هایی که در توسعه سیستم عصبی نقش دارند مولکول‌های هدایت‌کننده اکسون از جمله سمافورین‌ها (Semaphorin) می‌باشند. در سیستم عصبی، سمافورین‌ها می‌توانند نقش دفع و یا جذب کنندگی برای اکسون‌ها به بافت هدف داشته باشند (۸). علاوه بر مشخصات هدایت‌کنندگی سمافورین‌ها، آنها می‌توانند باعث مرگ سلولی نیز شوند. برای مثال، چندین سمافورین طبقه ۳ در کنترل آپوپتوز اعصاب و سلول‌های سرطانی دخیل می‌باشند (۹،۱۰). سمافورین B۳ (Sema3B) یکی از سمافورین‌های طبقه ۳ می‌باشد که نوروپیلین‌ها (NP) نیز به عنوان گیرنده آن شناخته می‌شود. Sema3B به عنوان سرکوب‌کننده تومور شناخته شده است و باعث حذف یا غیرفعال کردن سرطان‌های سینه و ریه می‌گردد (۱۰). به نظر می‌رسد تاکنون مطالعه‌ای تغییرات Sema3B در افراد دیابتی شده را مورد بررسی قرار نداده باشد، اما افزایش سطوح دیگر سمافورین‌های طبقه ۳ از جمله Sema3A در نفروپاتی دیابتی (۱۱) و به علاوه Sema3E در افراد دیابتی چاق مشاهده شده است (۱۲). از سوی دیگر نشان داده شده است که تمرینات ورزشی جدا از مزایای بدنی که دارند، عملکرد شناختی را بهبود بخشیده و بازتوانی عصبی را بعد از آسیب مغزی، آسان‌تر می‌کنند (۱۳). چندین مطالعه گزارش کردند که تمرینات ورزشی منظم می‌تواند در برابر آپوپتوز مقابله نماید (۱۴،۱۵). برخی مطالعات اظهار داشتند پاسخ سازگاری به ورزش منظم ممکن است شامل تنظیم افزایشی برخی از آنزیم‌های سیستم ضداکسایشی و کاهش تجمع برخی رادیکال‌های آزاد و تعدیل آسیب اکسایشی (۱۵،۱۶) و یا افزایش برخی عوامل ضدآپوپتوزی و کاهش برخی عوامل آپوپتوزی (۱۴،۱۷) باشد. با این حال ساز و کارهای دقیق سلولی و مولکولی اثر حفاظتی تمرین ورزشی در برابر آپوپتوز مشخص نمی‌باشد که این امر حاکی از ضرورت انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد (۱۴). با توجه به جستجویی که در این زمینه توسط ما انجام گرفته است به نظر می‌رسد تا کنون تغییرات سمافورین‌ها به ویژه Sema3B و نقش آن در آپوپتوز در شرایط دیابتیک و نیز به دنبال تمرینات ورزشی مورد بررسی قرار نگرفته است و مطالعه حاضر اولین تحقیق در این زمینه می‌باشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر ۴ هفته تمرین اختیاری بر میزان Sema3B، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و آپوپتوز هیپوکامپ موش‌های دیابتی شده می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ، ۸ الی ۱۰ هفته‌ای با محدوده وزنی ۱۰ ± ۲۳۵ گرم، پس از همسان‌سازی وزنی به طور تصادفی در گروه‌های ۸ تایی (کنترل سالم (C)، تمرین سالم (E)، کنترل دیابت (D) و تمرین دیابت (ED)) قرار داده شدند. دیابتی کردن موش‌های صحرایی از روش تزریق داخل صفاقی ۵۰mg/kg داروی استرپتوزوسین (Streptozotocin) محلول در بافر سیترات (PH=۴/۵) به صورت تک دوز استفاده شد. طبق این شیوه ۷۲ ساعت پس از تزریق، دیابت در موش‌ها ایجاد شده و جهت تشخیص آن، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط تیغ جراحی در انتهای دم حیوانات، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفته و سپس توسط دستگاه تست قندخون اکیو چک اکتیو (ACCU-CHEK Active) اندازه‌گیری انجام شد. موش‌هایی که سطوح گلوکز خون آنها بالاتر از ۲۵۰mg/dL بود به عنوان دیابتی شناسایی شدند (۲،۳). تمامی موش‌های صحرایی در حیوان خانه دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران در دمای محیطی ۲۲±۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شده و محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند. در این مطالعه کلیه اصول اخلاقی

www.SID.ir

Archive of SID

کار بر اساس قوانین بین المللی و پروتکل اخلاقی راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی منتشر شده توسط انیستیتو پاستور رعایت گردید. موش‌های گروه های تمرینی در قفس‌های مجهز به چرخ دوّار به صورت انفرادی به مدت ۴ هفته نگهداری شدند و به طور آزادانه به چرخ دوّار دسترسی داشتند. این دستگاه مجهز به شماره انداز می‌باشد که مسافت پیموده شده در طی شبانه روز را نشان می‌دهد. مسافت پیموده شده توسط هر یک از آزمودنی‌ها در راس ساعت مقرر به طور روزانه توسط محقق یادداشت می‌شد. موش‌های بی‌تحرک (گروه C، گروه D) نیز در طول دوره تحقیق به صورت گروه‌های ۴ تایی در ۴ قفس پلی‌کربنات شفاف بدون چرخ دوّار قرار داده شدند.

در پایان هفته چهارم و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین (۸۰ mg/kg) زایلازین (۸ mg/kg) بیهوش شدند. سپس با جدا کردن سر موش با کمک قیچی مخصوص و جدا کردن کل مغز و خارج کردن آن از کاسه جمجمه، هیپوکامپ از سایر قسمتهای مختلف مغز جدا و وارد تیوب‌های مخصوص گردیده و فوراً به ازت مایع منتقل شد. پس از منجمد شدن بافت در یخچال مخصوص در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به منظور هموژنایزاسیون ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکامپ را با ازت مایع در هاون پودر و سپس وارد میکروتیوب و به آن ۱ میلی‌لیتر بافر PBS اضافه شد. در مرحله بعد، نمونه‌های هموژنیزه شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع‌رویی (سوپرناتانت) جداسازی و در میکروتیوب‌های جداگانه ریخته شد و برای سنجش متغیرهای مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. میزان آپوپتوز در بافت هیپوکامپ با استفاده از کیت الایزا (ELISA) تعیین مرگ سلولی به روش تعیین میزان قطعات DNA همراه با هیستون سیستولیک (cytosolic histone-associated DNA fragmentation)، بر اساس شیوه توضیح داده شده در دستورالعمل کارخانه سازنده کیت (Roche Molecular Biochemicals، آلمان) اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری Sema3B با روش ELISA و با استفاده از کیت مخصوص نمونه‌های حیوانی بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده (ZellBio GmBH، آلمان) با دامنه پراکندگی ۲۰- ۰/۵ ng/mL و درجه حساسیت ۰/۰۳ ng/mL> انجام گرفت. سطوح H_2O_2 بافت هیپوکامپ نیز با استفاده از کیت آزمایشگاهی حیوانی به روش ELISA و بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده کیت (ZellBio GmBH، آلمان) با دامنه پراکندگی ۴۰۰-۵۰ µM و حساسیت کمتر از ۵ µM اندازه‌گیری گردید. نتایج توسط دستگاه الایزا خوان (Biotech، آمریکا) قرائت شد. داده‌های بدست آمده از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل و به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شدند. در ابتدا به منظور تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برابری واریانس‌ها از آزمون لون (leven) استفاده شد. تفاوت‌های آماری تغییرات متغیرهای وابسته در بین گروه‌های تحقیق با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA)، و آزمون تعقیبی LSD برآورد شد. از آزمون t مستقل نیز برای مقایسه مسافت پیموده شده بین دو گروه E و ED استفاده گردید. مقادیر P≤۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار وزن و مسافت طی شده آزمودنی‌ها در جدول۱ به تفکیک گروه ها آورده شده است. داده‌های جدول۱ نشان می‌دهد که وزن آزمودنی‌های گروه‌های کنترل دیابت و تمرین دیابت هنگام کشتار نسبت به گروه کنترل سالم و تمرین سالم به طور معنی‌دار پائین‌تر بوده است (P≤۰/۰۵). همچنین به طور معنی‌داری مسافت پیموده شده توسط موش‌های دیابتی نسبت به سالم کمتر بود (P≤۰/۰۵).

میانگین و انحراف معیار مقادیر متغیرهای تحقیق به تفکیک گروه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه نشان داد میزان H_2O_2 و Sema3B و آپوپتوز هیپوکامپ در گروه D به طور معنی‌داری بیشتر از گروه C می‌باشد (به ترتیب P=۰/۰۰۲، P=۰/۰۰۲ و P=۰/۰۰۱) و اجرای تمرین اختیاری در گروه ED متغیرهای مذکور را نسبت به گروه D کاهش قابل توجهی داد (به ترتیب P=۰/۰۰۲، P=۰/۰۰۲ و P=۰/۰۰۱). بعلاوه، میزان Sema3B و آپوپتوز در گروه E به صورت معنی‌داری از گروه C کمتر بود (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P=۰/۰۳۱). نتایج همچنین حاکی از سطوح پایین‌تر Sema3B و متغیر آپوپتوز در گروه E نسبت به گروه ED است (به ترتیب P=۰/۰۰۱ و P=۰/۰۰۷).

جدول۱: میانگین و انحراف معیار وزن و مسافت پیموده شده در گروه‌های مختلف تحقیق

متغیر	گروه کنترل سالم (C)	گروه تمرین سالم (E)	گروه کنترل دیابت (D)	گروه تمرین دیابت (ED)
وزن (گرم)	۳۱۵/۷۵ ±۲۸/۳۴	۳۴۰/۷۵ ±۳۹/۱۰	*۲۰۲/۲۵ ±۲۱/۴۳	*۲۲۱/۸۷ ±۳۴/۵۰
مسافت دویدن (متر)	–	۳۷۳۹۶/۸۷ ±۱۲۷۱۰/۵۵	–	#۱۲۳۳۱/۵۰ ±۵۸۰۳/۴۱

* اختلاف معنی دار با گروه C و E (P≤۰/۰۵)، # اختلاف معنی‌دار با گروه D (P≤۰/۰۵).

جدول۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و تعقیبی LSD برای مقایسهٔ میانگین اختلاف بین گروه‌ها

متغیر	گروه کنترل سالم (C)	گروه تمرین سالم (E)	گروه کنترل دیابت (D)	گروه تمرین دیابت (ED)
آپوپتوز(OD405/mg protein)	۰/۹۸ ±۰/۰۸	*۰/۸۸ ±۰/۰۹	*۱/۱۷ ±۰/۱۱	#۱/۰۰ ±۰/۰۴
Sema3B (ng/mL)	۰/۴۷ ±۰/۰۲	*۰/۳۶ ±۰/۰۳	*۰/۵۵ ±۰/۰۸	#۰/۴۴ ±۰/۰۲
H_2O_2 (µM)	۲۷/۲۸ ±۷/۵۲	*۲۴/۲۴ ±۷/۸۳	۴۲/۷۰ ±۱۶/۴۵	۲۶/۹۶ ±۳/۸۷

* اختلاف معنی‌دار با گروه C (P≤۰/۰۵)، اختلاف معنی دار با گروه D (P≤۰/۰۵)، # اختلاف معنی‌دار با گروه E (P≤۰/۰۵)،

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

پژوهش حاضر به بررسی تاثیر ۴ هفته تمرین ورزشی اختیاری بر غلظت H_2O_2، Sema3B و میزان آپوپتوز بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده پرداخته است. در این مطالعه ما نشان دادیم که آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی شده با STZ بوجود آمده که با افزایش معنی‌دار در غلظت H_2O_2 و Sema3B در این ناحیه همراه بوده است. Pamidi و Nayak، نیز نشان دادند که ۳۰ روز پس از تزریق STZ تعداد سلول‌های عصبی زنده هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا می‌کنند و آسیب به این سلول‌ها افزایش قابل توجهی می‌یابند. افزایش در میزان آپوپتوز بدنبال القای دیابت تجربی چنانچه در مطالعات قبلی نشان داده شده است نشان دهنده‌ی این است که در بیماری دیابت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تولید فشار اکسایشی می‌تواند به عنوان یک عامل محرک در آپوپتوز مطرح باشد (۱۸،۱۵). مطالعات متعدد سطوح بالای H_2O_2 را در دیابتی‌ها همانند مطالعه حاضر گزارش نمودند (۱۹،۲۰). به نظر می‌رسد هیپرگلایسمی با فعالسازی NADPH اکسیداز موجب افزایش تولید H_2O_2 و فشار اکسایشی در شرایط دیابتیک می‌گردد (۴). دیابت به فشار اکسایشی و التهاب وابسته است، زیرا هر یک از آنها با تولید بالای مولکول‌های چسبان و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6 و TNF-α در ارتباط می‌باشند. دیابت یک وضعیت پیش‌التهابی مزمن است که به تدریج ذخایر ضداکسایشی درون سلولی را کاهش می‌دهد و سلول‌ها را مستعد به آسیب می‌کند. در حقیقت، ROS در غلظت بالا می‌توانند از طریق اکسایش مستقیم و یا از طریق تداخل در ساز و کارهای ترمیم سلولی، باعث آسیب به DNA و مرگ سلول شوند (۲۱). فاکتور دیگر مطالعه‌ی حاضر که برای آن نقش آپوپتوزی در نظر گرفته شد سمافورین B۳ می‌باشد. تاکنون مطالعه‌ای یافت نشد که تغییرات Sema3B در شرایط دیابتیک را مورد بررسی قرار داده باشد. اما افزایش سطوح دیگر سمافورین‌های طبقه ۳ از جمله Sema3A در نفروپاتی دیابتی نشان داده شده است؛ ترکیبی که احتمالاً باعث مرگ سلول‌های پودوسیت کلیه‌ها می‌شود و پیشرفت نفروپاتی دیابتی را به دنبال دارد (۱۱). به علاوه افزایش Sema3E در افراد دیابتی گزارش شده است که باعث کاهش آنژیوژنز و افزایش التهاب گردید (۱۲). در رابطه با عواملی که بر غلظت Sema3B موثر می‌باشند اطلاعات بسیار محدود می‌باشد. تنها چند مطالعه نشان داده‌اند که التهاب و فشار اکسایشی عوامل تنظیم کننده سمافورین‌ها می‌باشند (۲۲). از طرفی مطالعه‌ای اظهار داشت که بین سمافورین‌های طبقه ۳ (Sema3A) و فشار اکسایشی تعاملاتی وجود دارد به طوری که نویسندگان فشار اکسایشی را مسئول آسیب‌رسانی Sema3A به بافت‌های کلیه در موش‌های دیابتی پیشنهاد نمودند (۲۳). همچنین مطالعه‌ای نشان داد که علامت دهی Sema3A موجب افزایش موضعی H_2O_2 در مخروط رشد پشتی ریشه گانگلیون اعصاب از طریق فعالسازی MICAL1 و MICAL3 می‌شود (۲۴). پروتئین دیگری که ممکن است نقش مهم در القاء سمافورین‌های طبقه ۳ به ویژه Sema3B داشته باشد پروتئین سرکوب کننده تومور (p53) می باشد اگر چه ساز و کار دقیق چگونگی تاثیرگذاری و تنظیم آن بر سمافورین‌ها مشخص نمی‌باشد (۲۵). در پژوهشی نشان داده شده است بیان بالای Sema3B در حضور و حتی غیاب p53 نیز، می‌تواند اثر آپوپتوزی بر سلول‌های سرطانی داشته باشد. این مطالعه که روی سلول‌های سرطانی کشت شده صورت پذیرفت نشان داد که Sema3B از طریق فعالسازی آنزیم کاسپاز ۳ منجر به القاء آپوپتوز در این سلول‌ها گردید (۱۰). با اینکه نقش محوری سمافورین‌های مترشحه در تنظیم مرگ سلول‌های عصبی به اثبات رسیده است (۹) اما مسیرهای متداول دخیل تاکنون مشخص نشده است. Moretti و همکاران، در پژوهشی اظهار داشتند که علامت دهی Sema3A، آپوپتوز به واسطه‌ی Fas (CD95) را از طریق انتقال Fas به درون قایق‌های لیپیدی (Lipid Raft) کنترل می‌نماید (۲۶). در مجموع در مطالعه حاضر شاید بتوان گفت از جمله عواملی که موجب افزایش آپوپتوز بواسطه القاء دیابت می‌گردد افزایش رادیکال آزاد H_2O_2 و Sema3B می‌باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که ۴ هفته تمرین اختیاری موجب کاهش معنی‌دار در غلظت H_2O_2 و Sema3B و آپوپتوز هیپوکامپ موش‌های دیابتی گردید. همان‌گونه که در بخش مقدمه به آن اشاره شد تمرینات ورزشی، تاثیرات مثبتی بر عملکرد شناختی داشته و بازتوانی عصبی را پس از آسیب مغزی تسهیل می‌نماید (۱۳). Van Praag، در پژوهشی اظهار داشته است که دویدن اختیاری روی چرخ دوّار موجب افزایش ۴-۳ برابر و یا حتی بیشتر در تولید و بقای سلول‌های عصبی جدید در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ می‌شود (۲۷). ورزش منظم احتمالاً از طریق سازگاری‌هایی که بر فعالیت و بیان برخی عوامل موثر در تنظیم آپوپتوز ایجاد می‌نماید می‌تواند در این راستا نقش ایفا کند (۱۴،۱۵،۱۷). Mokhtari-Zaer و همکاران، طی مطالعه‌ای که بر روی موش‌های صحرایی معتاد به موررفین انجام دادند، خاطر نشان ساختند که ۱۰ روز تمرین اختیاری روی چرخ دوّار، باعث کاهش بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی (Bax) افزایش یافته و افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی (Bcl-2) ثابت مانده در هیپوکامپ ناشی از مورفین می‌گردد. به علاوه، اختلالات مربوط به عملکرد شناختی در این آزمودنی‌ها را سد می‌کند (۲۸). Mohammadi و همکاران، طی مطالعه‌ای نشان داده‌اند که تمرینات اختیاری منظم از القای آپوپتوز ناشی از تزریق ماده سمی ۶-OHDA از طریق افزایش عوامل نوروتروفیک در قشر مخ موش‌ها می‌کاهد و به نوبه خود موجب بالا رفتن طول عمر نورون‌ها در برابر تخریب اکسایشی ناشی از سمیت ۶-OHDA می‌گردد (۲۹). نتیجه‌گیری کلی در مورد تاثیر دویدن اختیاری روی چرخ دوّار بر آپوپتوز دشوار می‌باشد و ممکن است عوامل دیگری در تنظیم آپوپتوز به دنبال دویدن اختیاری دخیل باشند. طبق بررسی‌های انجام شده به نظر می‌رسد تنها یک پژوهش به تاثیر تمرینات ورزشی بر سمافورین‌ها (Sema3A) پرداخته است. نتایج این پژوهش نشان داد که تمرینات تناوبی شدید بیان افزایش یافته‌ی Sema3A را در عضلات اسکلتی موش‌های پیر کاهش داده است و بدین طریق احتمالاً از دست رفتن عصب و آتروفی عضلانی در پیری را به تاخیر می‌اندازد (۳۰). همان‌گونه که نتایج مطالعه حاضر نشان داد ۴ هفته تمرین اختیاری

www.SID.ir

Archive of SID

موجب کاهش غلظت افزایش یافته‌ی پروتئین Sema3B در هیپوکامپ موش‌های دیابتی گردید. نظر به محدود بودن مطالعات در زمینه تاثیر فعالیت ورزشی بر سمافورین‌ها و اینکه با توجه به جستجوهای به عمل آمده توسط محقق موردی در خصوص تاثیر تمرین ورزشی بر سطوح Sema3B یافت نگردید، ساز و کارهای احتمالی این تغییرات کاهشی، مشخص نمی‌باشند ولی با توجه به تعامل مابین وضعیت اکسایشی و سمافورین‌ها این احتمال وجود دارد که در مطالعه حاضر، تمرینات ورزشی اختیاری از طریق کاهش فشار اکسایشی و رادیکال‌های آزاد همچون H_2O_2 که رخ داده است موجب تقلیل در سطوح Sema3B شده است. از آنجایی که در این مطالعه تجربی، اندازه گیری‌ها در مورد فشار اکسایشی جامع نبوده و اطمینان از وقوع آپوپتوز تنها به روش بکار رفته در این مطالعه، دشوار می‌باشد و همچنین با توجه به موارد فوق الذکر و اطلاعات در دسترس محدود در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌گردد. از این رو پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌های آینده تاثیر پروتکل‌های متنوع تمرینی بر سطوح سایر سمافورین‌ها و دیگر شاخص‌های فشار اکسایشی در بافت‌های مختلف مغز در سایر بیماری‌های دژنراتیو عصبی و بر روی نمونه‌های انسانی مورد بررسی قرار گیرند و همچنین جهت اطمینان بیشتر از وقوع آپوپتوز در کنار روش بکار رفته در این مطالعه از روش‌های ترکیبی معتبر دیگر (تغییرات مورفولوژی، تانل، فعالیت کاسپازها و ...) نیز استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری نهایی به دلیل کمبود شواهد و تایید نشدن در نمونه های انسانی باید با احتیاط عنوان گردد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه آپوپتوز ناشی از القای دیابت تجربی با افزایش میزان Sema3B و H_2O_2 در هیپوکامپ مغز همراه است و دویدن اختیاری در مدت ۴ هفته توانست میزان Sema3B و H_2O_2 و آپوپتوز را کاهش دهد. برای توصیه این شیوه به عنوان یک راهکار درمانی در مقابله با عوارض این بیماری نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد.

قدردانی

از همکاری دانشجویان دکتری دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران صمیمانه تشکر می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل این مقاله نمی‌شود.

منابع مالی

حمایت مالی از بخش خاصی وجود نداشت و هزینه شخصی انجام شد.

منافع متقابل

منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله نداریم.

مشارکت مولفان

طراحی اجرا، تحلیل نتایج، تالیف مقاله توسط م ف، و خواندن و تایید نسخه نهایی آن توسط ض ف و م ا صورت پذیرفت.

References

1. Dailey G. Overall mortality in diabetes mellitus: where do we stand today? *Diabetes technology & therapeutics* 2011; **13**(1): 60-65. doi: 10.1089/dia. 2011.0019
2. Jafari Anarkooli I, Barzegar Ganji H, Pourheidar M. The protective effects of insulin and natural honey against hippocampal cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of diabetes research* 2014; 2014: Article ID 491571, 8 pages. doi: 10.1155/ 2014/491571.
3. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh AR, Haghir H. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research* 2008; **2008**: 638467. doi: 10.1155/2008/ 638467.
4. Koike N, Takamura T, Kaneko S. Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli By protein kinase C activation and TNF-α stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. *Life sciences* 2007; **80**(18): 1721-1728. doi: 10.1016/j.lfs. 2007.02.001.
5. Ho N, Sommers M S, Lucki I. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2013; **37**(8): 1346-1362. doi: 10.1016/j.neuBiorev. 2013.03.010.
6. Kobayashi K, Nakano H, Hayashi M, Shimazaki M, Fukutani Y, Sasaki K, et al. Association of phosphorylation site of tau protein with neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences* 2003; **208**(1): 17-24. doi: 10.1016/S0022-510X(02)00410-0.
7. Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi Z. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: cellular and molecular aspects. *International journal of preventive medicine* 2016; **7**(57). doi: 10.4103/2008-7802. 178531.
8. Masuda T, Taniguchi M. ContriBution of semaphorins to the formation of the peripheral nervous system in higher vertebrates. *Cell adhesion & migration* 2016; **10**(6): 593-603. doi: 10.1080/19336918.2016.1243 644.
9. Gagliardini V, Fankhauser C. Semaphorin III can induce death in sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1999; **14**(5): 301-316. doi: 10.1006/mcne.1999.0787
10. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung

www.SID.ir

Archive of SID

and Breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**(31): 11432-11437. doi: 10.1073/pnas.040396910 1.

11. Aggarwal P K, Veron D, Thomas D B, Siegel D, Moeckel G, Kashgarian M, et al. Semaphorin3a promotes advanced diabetic nephropathy. *Diabetes* 2015; **64**(5): 1743-1759. doi: 10.1073/pnas.0403969 101.
12. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, KoBayashi Y, et al. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell metabolism* 2013; **18**(4): 491-504. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.001.
13. Radak Z, Toldy A, SzaBo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat Brain. *Neurochemistry international* 2006; **49**(4): 387-392. doi: 10.1016/ j.neuint.2006.02.004
14. Kwak H B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of exercise rehabilitation*; **9**(2): 212. doi: 10.12965/jer.130002.
15. Alipour M, Salehi I, Soufi F G. Effect of exercise on diabetes-induced oxidative stress in the rat hippocampus. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2012; **14**(4): 222.
16. Radak Z, Suzuki K, Higuchi M, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 2016; **98**:187-196. doi: 10.1016/j.freerad Biomed.2016.01.024.
17. Siu P M, Bryner R W, Martyn J K, Alway S E. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *The FASEB Journal* 2004; **18**(10): 1150-1152. doi: 10.1096/fj.03-1291fje.
18. Pamidi N, Nayak S. Effect of environmental enrichment exposure on neuronal morphology of streptozotocin-induced diabetic and stressed rat hippocampus. *Biomedical journal* 2014; **37**(4): 225. doi: 10.4103/2319-4170.125651.
19. Yang H, Fan S, Song D, Wang Z, Ma S, Li S, et al. Long-term streptozotocin-induced diabetes in rats leads to severe damage of Brain Blood vessels and neurons via enhanced oxidative stress. *Molecular medicine reports* 2013; **7**(2): 431-440. doi: 10.3892/ mmr.2012.1227.
20. Zabielski P, Lanza I R, Gopala S, Heppelmann C J, Bergen H R, Dasari S, et al. Altered skeletal muscle mitochondrial proteome as the basis of disruption of mitochondrial function in diabetic mice. *Diabetes* 2015: dB150823. doi: 10.2337/dB15-0823.
21. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2007; **121**(11): 2381-2386. doi: 10.1002/ ijc.23192.
22. Joyal JS, Sitaras N, Binet F, Rivera J C, Stahl A, Zaniolo K, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue By secreting semaphorin 3A. *Blood* 2011; **117**(22): 6024-6035. doi: 10.1182/Blood-2010-10-311589.
23. Mohamed R, Ranganathan P, Jayakumar C, Nauta F L, Gansevoort R T, Weintrau B, et al. Urinary semaphorin 3A correlates with diabetic proteinuria and mediates diabetic nephropathy and associated inflammation in mice. *Journal of Molecular Medicine* 2014; **92**(12): 1245-1256. doi: 10.1007/s00109-014-1209-3.
24. Morinaka A, Yamada M, Itofusa R, Funato Y, Yoshimura Y, Nakamura F, et al. Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Sci. Signal* 2011; **4**(170): ra26. doi: 10.1126/scisignal.2001127.
25. Moriya J, Minamino T, Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, et al. Inhibition of semaphoring as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circulation research* 2010; **106**(2): 391-398. doi: 10.1161/circre saha.109.210815.
26. Moretti S, Procopio A, Lazzarini R, Rippo M R, Testa R, Marra M, et al. Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis By promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 2008; **111**(4): 2290-2299. doi: 10.1182/Blood-2007-06-096529.
27. Van Praag H. Exercise and the Brain: something to chew on. *Trends in neurosciences* 2009; **32**(5): 283-290. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.007.
28. Mokhtari-Zaer A, Ghodrati-JaldBakhan S, Vafaei A A, Miladi-Gorji H, Akhavan M M, Bandegi A R, et al. Effects of voluntary and treadmill exercise on spontaneous withdrawal signs, cognitive deficits and alterations in apoptosis-associated proteins in morphine-dependent rats. *Behavioural Brain research* 2014; **271**: 160-170. doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.061
29. Mohammadi F, Aslani J, Mohammadi R. Voluntary training increases the level of CDNF cortex in the experimental model of exposed 6-OHDA rats. *Applied Exercise Physiology Research* 2015; **4**(2): 97-104. (Persian).
30. Ghadirihormati L, Aminaei M, Bahadordakhili A, Asadishekaari M. The Effect of High-Intensity Exercise Training on Gene Expression of Semaphorin 3A in Extensor Digitorum Longus Muscles of Aged C57Bl/6 Mice. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2017; **25**(1): 92-102. (Persian).

www.SID.ir