

اثر تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن CDK5 در نوروپاتی های حسی موش های صحرایی نر با نوروپاتی دیابت

نویسندگان: محمد کشاورز^۱، رضا قراخانلو^{۲*}، منصوره موحدین^۳، مسعود رحمتی^۴، امیر بهادر 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.
۴. دانشجوی دکترا گروه تربیت بدنی (فیزیولوژی)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران.

E-mail: ghara_re@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول: رضا قراخانلو

چکیده

مقدمه و هدف: تنظیم افزایشی و کاهش بیان ژن CDK5 به عنوان یک پروتئین کیناز، در سیستم عصبی راه اندازی مسیرهای مرگ یا بقای نوروپاتی را به همراه دارد. لذا با توجه به آثار مزمن تمرین استقامتی بر رشد، جوانه زنی و عملکرد نوروپاتی به ویژه در شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی، در پژوهش حاضر به بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر کاهش بیان ژن CDK5 در نوروپاتی های حسی موش های صحرایی نر و یستار با نوروپاتی دیابتی پرداختیم.

مواد و روش ها: ۲۸ موش های صحرایی پس از رسیدن به وزن مطلوب (20 ± 25 گرم)، به طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم (C)، تمرین سالم (HT)، کنترل نوروپاتی (N) و تمرین نوروپاتی (NT) تقسیم شدند. دیابت با استفاده از یک وهله تزریق STZ (۴۵ mg/Kg) ایجاد شد. گروه های تمرین شش هفته تمرین استقامتی را روی تردمیل اجرا کردند. آزمودنی ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی قربانی شدند و بیان ژن CDK5 در بخش حسی سگمنت های نخاعی عصب سیاتیک با روش Real time اندازه گیری و با روش 2-ΔΔCT محاسبه شد. برای تعیین معناداری تفاوت بین متغیرها از روش تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد.

نتایج: بیان ژن CDK5 پس از شش هفته تمرین استقامتی در بخش حسی نخاع گروه تمرین نوروپاتی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل نوروپاتی کمتر بود؛ همچنین تمرین، کاهش معنی دار سطوح گلوکز خون در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل را به همراه داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نقش ویژه CDK5 در توسعه و رشد یا مرگ نوروپاتی، پژوهش حاضر نشان داد که تمرین استقامتی مزمن با اثرهای مفید خود بر شبکه نوروپاتی به کاهش (تعدیل) بیان ژن CDK5 در حالت پاتولوژیکی منجر می شود.

واژگان کلیدی: CDK5، تمرین استقامتی، نوروپاتی دیابت

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و یکم - شماره ۱۰۷
آبان ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۶/۳

آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۲/۹/۱۷

پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۷

مقدمه

این نورون‌ها می‌تواند به عواملی نظیر درد نوروپاتیکی، هایپرگلیسمی و سندرم اندامی حسی (حساسیت در اندام قطع شده) بینجامد (۷)؛ در واقع در نورون‌های حسی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلان‌ها دلیل اصلی ظهور شرایط تخریب عصبی است (۸)؛ از طرفی، تغییرهای موضعی که پس از آسیب وجود دارند با عملکرد سلول‌های ایمنی توسعه فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های T، مرتبط‌اند. افزایش سنتز، بیان و رهاسازی سایتوکاین‌هایی نظیر IL-6، IL-1 و TNF α از دلایل نارسایی در نورون‌های حسی هستند که باعث شلیک خودبه‌خودی پیام عصبی از نورون حسی می‌شوند (۵).

CDK5⁶ به‌عنوان یک پروتئین کیناز، یکی از اعضای منحصر به فرد 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 منجر می‌شود (۱۱). فعالیت و بیان CDK5 در سیستم عصبی مرکزی (CNS) به چشم می‌خورد (۹). CDK5 به‌عنوان یک کیناز، تنظیم‌کننده اعمال و انتقال آکسونی با فسفوریلاسیون در رشته‌های عصبی (NFs) است (۱۲). کروزر و تسای (۲۰۰۴)، عدم تنظیم فعالیت و بیان CDK5 را در بیماری تخریب عصبی آلزایمر نیز مشاهده کردند (۱۳)؛ آلویرا و همکاران نیز (۲۰۰۶)، نقش محافظتی یا افزایشی CDK5 در روند آپوپتوز را در نورون‌های محیط کشت بیان کردند (۱۴)؛ همچنین کرو و ماسلیا (۲۰۱۰)، نقش CDK5 را در روند بیماری آلزایمر به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی پیش‌رونده گزارش کردند (۱۵)؛ به‌طور کلی، مطالعات صورت‌گرفته از نقش CDK5 در فرایندهای تنظیم هموستاز و توسعه نورونی (۱۶)، آپوپتوز عصبی (۱۷)، انتقال آکسونی (۱۲) و تنظیم فسفوریلاسیون سیتواسکلتون آکسونی (۸) حکایت دارند. فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلان‌ها در

دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و ششمین علت مرگ‌ومیر در دنیا است که اختلال‌هایی متعدد از جمله نوروپاتی^۱، نفروپاتی^۲، رتینوپاتی^۳، بیماری‌های قلبی عروقی و آتروفی عضله اسکلتی را به دنبال دارد (۱)؛ در میان مدل‌های حیوانی از تزریق STZ^۴ نیز به‌عنوان یک مدل کارآمد برای القای دیابت استفاده شده است. STZ موجب هایپرگلیسمی 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 در پی ایجاد دیابت، علائم نوروپاتی دیابت با ظهور این شرایط تخریبی در نورون‌ها همپوشانی داشته است که ابتدا نورون‌های حسی و سپس حرکتی را درگیر می‌کند (۳). نوروپاتی ایجاد شده توسط بیماری دیابت، توزیع آناتومیک، دوره‌های درمانی و به‌احتمال، سازوکارهای سبب‌شناسی مختلفی را در برمی‌گیرد (۴). ایجاد شرایط پاتولوژیک و تخریب عصبی در نورون‌های حسی از برهم‌ریختگی ساختار اسکلت سلولی نورون در پی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلان‌ها در بدنه نرون و عدم انتقال مناسب و به‌جای آنها در طول نرون نشأت می‌گیرد که در این شرایط، ممکن است انباشتگی نابه‌جای نوروفیلان‌ها در جای جای سلول عصبی صورت‌گیرد که به برهم‌خوردن ساختار نورون منجر می‌شود (۵).

همچنین نارسایی‌های نورون‌های حسی با اعمال تغییرات در سیستم ایمنی، مسمومیت‌های ویتامینی، داروهای اعصاب و بیماری‌های تهدیدکننده مانند سرطان همراه است، ضعف نورون‌های حسی در DRG^۵ به تخریب آکسون‌های محیطی در این نورون‌ها و همچنین نورون‌های حسی مرکزی منجر می‌شود (۶)، اختلال در

¹ - Neuropathy

² - Nephropathy

³ - Retinopathy

⁴ - streptozotocin

⁵ - Dorsal Root Ganglion

⁶ - Cyclin Dependent Kinase 5

منتقل شدند. تمامی موش‌های صحرایی در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. در پژوهش حاضر، تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات، توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون‌صفافی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO) 45 mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه 0.5 mol/L ، $\text{pH}: 4.5$ دیابت القا شد؛ به موش‌های صحرایی غیردیابتی نیز، معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد جراحی کوچک توسط لانتست، روی ورید دم موش‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار با دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روزه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از 300 mg/dL بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (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 مشاهده نشد.

پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب $326/3 \pm 8/4$ گرم، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی در چهار گروه ۷ تایی 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 به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه روی نوارگردان راه رفتند. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و میان ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شدند در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۰ تا ۵۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و درعین حال، کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک (۲۲)، استفاده شد؛ بدین صورت که گروه‌های

بسیاری از بیماری‌های تخریب عصبی رخ می‌دهد؛ در مدل موش‌های صحرایی دیابتی شده با تزریق STZ نیز این غیرنرمال بودن فسفوریلاسیون در اعصاب حسی مشاهده شده است (۸).

مطالعات بنیادی نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی، روشی امیدبخش به‌منظور افزایش بازسازی آکسونی^۱ است؛ ورزش همچنین درمانی مؤثر برای بهبود عملکرد اعصاب حسی به‌شمار می‌آید (۱۸). در تحقیق‌ها نشان داده شده که فعالیت ورزشی با شدت متوسط آناری مثبت را در بهبود بیماری ALS^۲ به‌عنوان یک بیماری تخریب عصبی داشته است (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 منجر شد (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 گزارش کرده‌اند؛ از طرفی، تاکنون پژوهشی، اثر مداخلات درمانی نظیر تمرین ورزشی را بر بهبود تنظیم سطوح CDK5 ارائه نکرده است، لذا با توجه به مبانی نظری بالا مبنی بر 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 $271/3 \pm 11/2$ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس

1- Axon Regeneration

2 - Amyotrophic Lateral Sclerosis

آزمایش‌های مولکولی در فریزر $^{\circ}C -70$ - منجمد و نگهداری شدند.

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع برای استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در $0C$ ، $10min$ ، $12000g$ سانتریفوژ شد؛ سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در $0C$ ، $15min$ ، $12000g$ سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در $0C$ ، $10min$ ، $12000g$ سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در $L\mu 20$ آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorf, Germany) و نسبت جذبی 260 به 280 میان $1/8$ تا 2 به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از $1\mu g$ از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmuv Reverse transcriptase انجام گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان CDK5 mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Applied Biosystems) انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $L\mu 20$ و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های CDK5 و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده است؛ ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل 95 به مدت 10 دقیقه، 95 به مدت 15 ثانیه، 60 به مدت 1 دقیقه (تکرار 40 سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2-\Delta\Delta CT$ محاسبه شدند.

تمرین در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و به مدت شش هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرینی پژوهش حاضر (۲۲)

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

به منظور رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند (۲۲)؛ همچنین، از هیچ‌گونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده نشد و در صورت لزوم با استفاده از دست یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور می‌شدند تمرین را ادامه دهند.

موش‌های صحرایی در هر دو گروه به مدت شش هفته پس از تزریق STZ با ترکیبی از کتامین (30 تا 50 میلی‌گرم در کیلوگرم به صورت داخل عضلانی) و زایلازین (3 تا 5 میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیهوش شدند. بی‌درنگ پس از بیهوشی، خون موش‌های صحرایی به طور مستقیم با سرنگ از قلب کشیده شد و پس از مشخص کردن ناحیه Lumbar enlargement نخاع، تحت شرایط استریل سگمنت‌های نخاعی تشکیل دهنده عصب سیاتیک L4-L6، مشخص شد و بخش حسی نخاع در آن قسمت با دقت جدا و بافت‌های مورد نظر بی‌درنگ در نیتروژن مایع، منجمد شدند و این نمونه‌ها تا زمان انجام

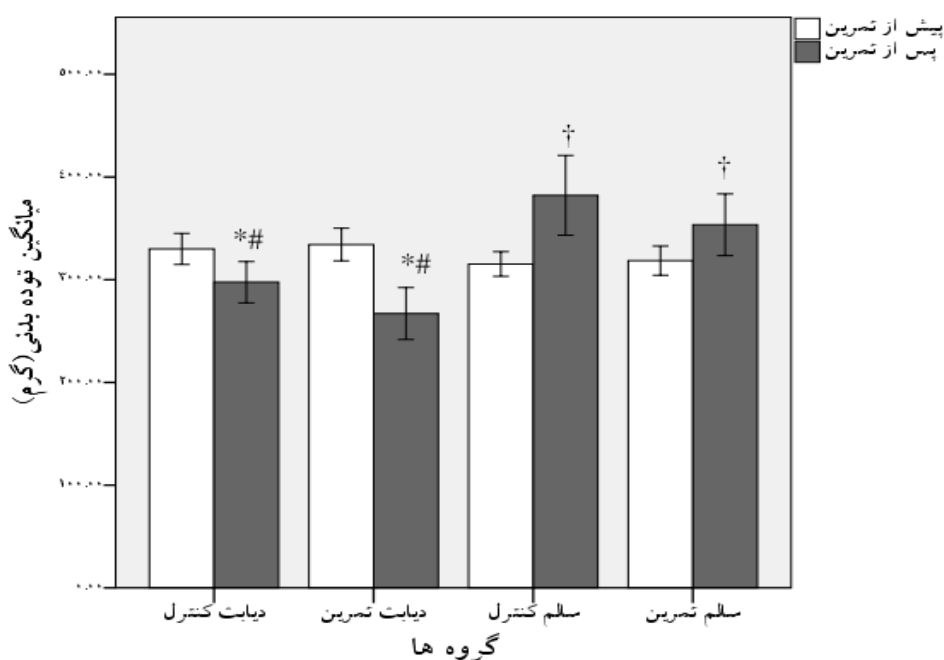
جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Primer sequence	GenBank code
CDK5	- GGC TTCATGATGTCTGCATA-3'For: 5 '- GAC AGA ATC CCA GGC CTT TC -3'Rev: 5'	NM_001100673
GAPDH	'- GACATGCCCGCTGGAGAAAC -3'For: 5 '- AGCCAGGATGCCCTTTAGT -3'Rev: 5	NM_017008

نتایج

میانگین تغییرهای وزن گروه‌های تمرین و کنترل نوروپاتی نسبت به گروه‌های تمرین و کنترل سالم به طور معنی‌دار کمتر بود (به ترتیب $p=0/0001$ و $p=0/001$)؛ همچنین، میانگین وزن گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل به طور معنی‌دار کمتر بود ($p=0/04$). اگرچه، میانگین وزن گروه سالم تمرین نسبت به گروه سالم کنترل کمتر بود، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p=0/1$) (نمودار ۱).

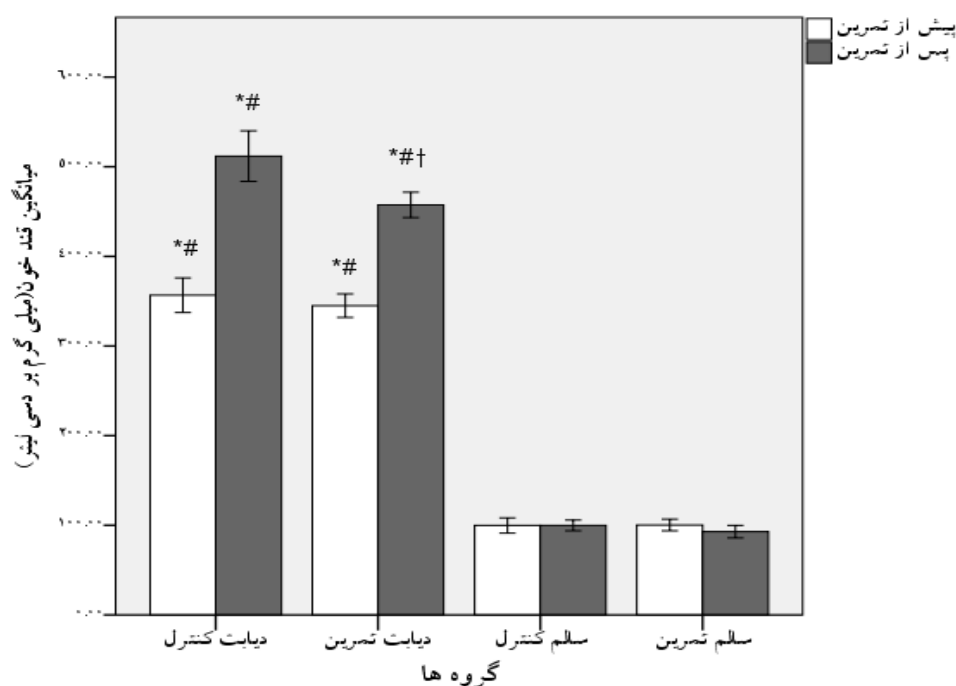
برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف (KS)، استفاده شد؛ همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون Leven ارزیابی شد. برای تعیین معناداری تفاوت میان متغیرها و تعامل آنها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم-افزارهای SPSS-20، انجام و سطح معنی‌داری $0/05$ ($P<0.05$) در نظر گرفته شد.



نمودار ۱. تغییرهای توده بدن در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P\leq 0/01$)، # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P\leq 0/01$)، † اختلاف معنادار با گروه نوروپاتی کنترل ($P\leq 0/01$)

در آغاز برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌دار بالاتر بود ($p=0/0001$) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان، اختلافی معنی‌دار داشت ($p=0/0001$) (نمودار ۲).

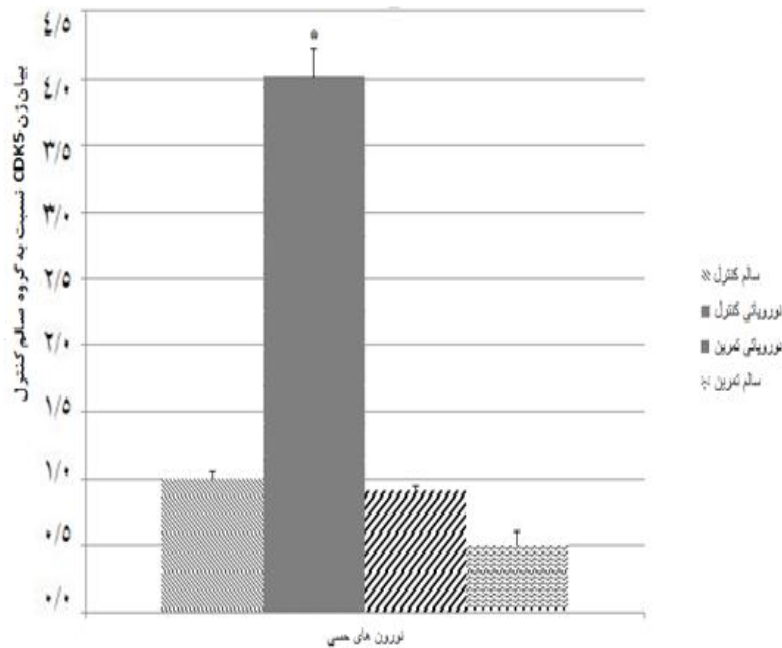
در آغاز برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌دار بالاتر بود ($p=0/0001$) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان، اختلافی معنی‌دار داشت ($p=0/0001$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. تغییرهای گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار با گروه سالم کنترل ($P \leq 0/01$), # اختلاف معنادار با گروه سالم تمرین ($P \leq 0/01$), † اختلاف معنادار با گروه دیابت کنترل ($P \leq 0/01$)

کنترل ($P=0/35$) و سالم تمرین ($P=0/98$) مشاهده نشد. تفاوت میزان بیان ژن CDK5 در گروه سالم تمرین نسبت به گروه سالم کنترل با کاهش، همراه بود هر چند که به لحاظ آماری با تغییرهای معناداری همراه نبود ($P=0/36$) (نمودار ۳).

بیان ژن CDK5 در نروون‌های حسی گروه نوروپاتی تمرین ($P=0/002$)، سالم کنترل ($P=0/013$) و سالم تمرین ($P=0/002$) به طور معناداری نسبت به گروه نوروپاتی کنترل پایین تر بود. تفاوت معناداری در سطوح بیان ژن CDK5 میان گروه نوروپاتی تمرین نسبت به سالم



نمودار ۳. تفاوت معنادار میان گروه نوروپاتی کنترل و سایر گروه‌ها ($P < 0.05$)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت کند (۲۳)؛ بیان انتقال‌دهنده‌های گلوکز را افزایش دهد (۲۴) و سرانجام، کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به‌همراه داشته باشد (۲۵). ورزش می‌تواند برای کاهش سطوح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن، مفید واقع شود؛ به‌علاوه، نشان داده شده که تمرین ورزشی می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد (۲۵). همسو با نتایج پیشین در پژوهش حاضر نشان داده شد که تمرین استقامتی مزمن به کاهش معنادار سطوح گلوکز پلاسما در موش‌های صحرایی با نوروپاتی دیابت منجر می‌شود که می‌تواند دلیلی برای وقایع پیش‌گفته محسوب شود. تخریب سلول‌های β پانکراس ترشح‌کننده انسولین، متعاقب تزریق STZ، موجب کاهش شدید سطوح انسولین و بنابراین هایپرگلیسمی می‌شود؛ از بین رفتن توده عضلانی در مدل‌های کاهش انسولینی شدید (دیابت ایجاد شده با استفاده از STZ مشاهده شده - است) (۲۶)؛ از بین رفتن توده عضلانی با کاهش سنتز

پروتئین و افزایش تجزیه پروتئین در عضله اسکلتی ارتباط دارد. پیشنهاد شده است که سطوح بیش از حد بالای گلوکز پلاسما می‌توانند در حضور سطوح انسولین پایین یا مقاومت انسولین به آتروفی عضلانی منجر شوند (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 شده بود.

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 بررسی کند، انجام نشده است. لذا پژوهش حاضر، اولین پژوهشی است که به بررسی تغییرهای بیان ژن CDK5 در شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و همچنین اثر تمرین ورزشی بر میزان بیان ژن این کیناز در نورون‌های حسی پرداخته است.

یکی از پیامدهای پاتولوژیکی افزایش بیان CDK5 همان‌طور که اشاره شد، افزایش فسفوریلاسیون

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 در پی فسفوریلاسیون نابه‌جای نوروفیلان‌ها، عدم انتقال مناسب نوروفیلان‌ها در طول نورون و در نهایت، انباشتگی و برهم‌خوردن ساختار نورون رخ می‌دهد (۸)؛ از طرفی در نورون‌های حسی، تغییرهای موضعی که پس از آسیب وجود دارند با عملکرد سلول‌های ایمنی توسعه فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های T مرتبط‌اند. افزایش سنتز، بیان و رهاسازی سایتوکاین‌هایی نظیر IL-6، IL-1 و TNF α از دلایل نارسانی در این نوع نورون‌هاست (۵). پژوهش‌های پیشین، افزایش بازسازی آکسونی در نورون‌های حسی DRG پس از آسیب سیاتیک در موش‌های صحرائی در پی تمرین ارادی (۳۳)، بهبود عملکرد نورون‌های حسی در موش‌های صحرائی با آسیب نخاعی (SCI) در پی تمرین استقامتی مزمن (۳۴) و بهبود بازسازی آکسونی و شکل‌پذیری نورونی در نورون‌های حسی با افزایش نوروتروفین‌ها در پی تمرین مزمن (۲۰) را نیز گزارش کردند. همسو با پژوهش‌های پیشین (۲۰، ۳۳ و ۳۴) مبنی بر «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 نسبت به گروه سالم کنترل منجر شد هرچند که به لحاظ آماری، معنادار نبود. با توجه به اینکه فعالیت CDK5 در برخی مسیرهای سیگنالینگ که در گذشته اشاره شد به فسفوریلاسیون برخی گیرنده‌ها و پروتئین‌ها و همچنین جلوگیری از

نوروفیلان و پروتئین‌های وابسته به آن در اعصاب حسی است (۲۸) که نتیجه آن، برهم‌خوردن نظم اسکلت سلولی آکسون و جداشدن موتور پروتئین‌های انتقال‌دهنده مواد در طول آکسون از نوروفیلان‌هاست که به نوعی، مسیر ارتباطی میان نقاط مختلف آکسون هستند؛ در واقع بر اثر افزایش فسفوریلاسیون نوروفیلان‌ها و کاهش نرخ سرعت و میزان انتقال آکسونی است که در نهایت به ظهور شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی در این نوع اعصاب منجر می‌شود (۱۲) و (۲۹).

می‌توان بیان کرد که عدم تنظیم فعالیت این کیناز در شرایط پاتولوژیکی، نظیر التهاب و دیابت (۹) به چشم می‌خورد. 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 موتور پروتئین‌ها نظیر کاینزین از نوروفیلان‌ها با فسفوریلاسیون بیش از حد در شرایط پاتولوژیکی و کاهش نرخ انتقال آکسونی» به عنوان 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 ادامه یافتن این مسیرهای مربوط به رشد و زنده ماندن نورون‌ها مانند مسیر MEK^۱ (۳۱) و مسیر NGF^۲ (۳۲) نقش اساسی ایفا می‌کند. همان‌طور که انتظار می‌رفت 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 نوروفیلان‌ها، اسکلت سلولی آکسون و برخی گیرنده‌ها و پروتئین‌ها در مسیرهای سیگنالینگ مختلف است و در نهایت امر، ایجاد شرایط پاتولوژیکی تخریب عصبی در نورون‌ها نظیر نوروپاتی دیابت را به همراه خواهد داشت و از سوی دیگر تمرین استقامتی مزمن به عنوان یک عامل مؤثر در جلوگیری از

1- Mitogen Extracellular Kinase
2- Nerves Grow Factor

به سطوح پروتئین بالاتر و فعالیت بالاتر این کیناز منجر می‌شود که در نهایت به اثر نهایی از طریق فسفوریلاسیون نوروفیلانها و گیرنده‌های مختلف بینجامد؛ هرچند که برای دستیابی به شرایط قطعی‌تر پیشنهاد می‌شود سطوح پروتئین CDK5 نیز اندازه‌گیری شوند؛ از این رو پیشنهاد می‌شود که تمرین ورزشی به شکل استقامتی به‌عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش روند پیش‌رونده تخریب عصبی به‌کار گرفته شود؛ همچنین پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آینده بر کارایی انواع تمرین‌های مختلف ورزشی برای بیماران دیابتی متمرکز شوند و سایر عناصر و سازوکارهای مؤثر و مرتبط را مورد بررسی قرار دهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری گروه آناتومی و علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پژوهش به ما یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Banting FG & Best CH. Pancreatic extracts. *J.Lab Clin.Med* 1990; 115: 254-272.
- 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.
- Zochodne DW, Ramji N, Toth C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. *Neuroscientist* 2008; 14: 311-8
- Yasuda Hitoshi, Terada Masahiko, Maeda Kengo, Kogawa Shuro, et all. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 2003; 69: 229-285.
- 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.
- Sghirlanzoni A, Pareyson D, Lauria G. Sensory neuron diseases. *Lancet Neurol* 2005; 4: 349-61.
- Damasceno A, França MC Jr, Nucci A. Chronic acquired sensory neuron diseases. *Eur J Neurol* 2008; 15: 1400-5.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 2012; 22: 169-175
- Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 2005; 118: 5411-9.
- Cruz JC, Tsai LH. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 2004; 10: 452-8
- 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.
- Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2010; 15: R12-20.
- Nancy Y. Ip, Li-Huei Tsai. Cyclin dependent kinase 5 (CDK5). 1st: Springer Science, LLC 2008; 1-23.
- Shirley B, Shelton and Gail V.W.Johnson. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 2004; 88: 1313-1326.
- 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 nerve crush

- 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.

Daneshvar
Medicine

*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

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

Mohammad Keshavarz¹, Reza Gharakhanlou^{1*}, Mansoureh Movahheddin², Masoud Rahmati¹, Amirbahador Dakhili¹

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 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