

تأثیر تمرین هوازی بر سطوح پروتئین HMGB1 و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت

نویسندگان: احمد کاسی^۱، مسعود نیکبخت^{۱*}، عبدالحمید حبیبی^۱، هادی فتحی^۲
مقدم

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

E-mail: nikbakht7@ut.ac.ir

* نویسنده مسئول: مسعود نیکبخت

چکیده

مقدمه و هدف: التهاب عصبی نقش محوری در توسعه درد نوروپاتی دیابت بازی می‌کنند. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی بر سطوح پروتئین HMGB1 و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی با درد نوروپاتی دیابت است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار ۸ هفته‌ای (محدوده وزنی $220 \pm 10/2$ گرم) به طور تصادفی در چهار گروه نوروپاتی دیابت، نوروپاتی دیابت تمرین، سالم تمرین و کنترل سالم قرار گرفتند. دیابت با تزریق STZ (50 mg/kg) القاء شد. پس از تأیید ایجاد نوروپاتی دیابت توسط تست‌های رفتاری، گروه‌های تمرین، شش هفته تمرین هوازی مداومی با شدت متوسط ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه روی تردمیل اجرا کردند. سطح سرمی پروتئین HMGB1 با تکنیک الایزا و غلظت مالون-دی‌آلدهید (MAD) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در بافت نخاع توسط روش‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. آزمون آنالیز واریانس دو راهه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید.

نتایج: تمرین هوازی باعث کاهش معنی‌دار سطح سرمی پروتئین HMGB1 و غلظت MAD و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT نسبت به گروه نوروپاتی دیابت شد ($P < 0.05$). همچنین سطوح پروتئین HMGB1 و غلظت MAD افزایش و فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در گروه نوروپاتی دیابت کاهش داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین هوازی سطوح پروتئین HMGB1 و استرس اکسیداتیو را تعدیل و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل درد را بهبود می‌بخشد. پیشنهاد می‌شود که تمرین هوازی به عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی برای بیماران دیابتی به منظور کاهش درد نوروپاتیک استفاده شود.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، HMGB1، استرس اکسیداتیو، نوروپاتی محیطی دیابت

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم - شماره ۱۴۲
شهریور ۱۳۹۸

دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۲
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۶/۰۳
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲

مقدمه

فروستی را القاء می‌کنند که منجر به تولید سیتوکین‌ها و کموکین‌ها و شروع پاسخ‌های التهابی می‌شوند (۱۰). شواهد موجود نشان می‌دهد که افزایش فعالیت مسیرهای استرس اکسیداتیو ناشی از هایپر گلیسمی به عنوان تنظیم‌کننده اصلی انتقال، انتشار و فعالیت پروتئین HMGB1 در دیابت است (۱۲). بنابراین محققین به این نتیجه رسیده‌اند که مهار HMGB1 و تعدیل در شاخص‌های استرس اکسیداتیو در دیابت، ممکن است، از راهکارهای احتمالی مقابله با شرایط پاتوفیزیولوژیکی درد نوروپاتی دیابت باشد (۱۰، ۱۲، ۱۳). با این وجود استفاده از مهارکننده‌های دارویی پروتئین HMGB1، تأثیرگذاری محدودی داشته و دارای عوارض جانبی است (۱۴، ۱۵). لذا عامل غیر دارویی که بتواند این نقص فیزیولوژیکی را مهار کند، به عنوان ابزار درمانی مفیدی مطرح می‌شود. امروزه، ورزش بعنوان یک راهبرد غیردارویی جهت کاهش عوارض ناشی از دیابت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۵، ۱۶، ۱۷). تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین هوازی به عنوان یک عامل ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند (۱۸)، به طوری که با افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی و با کاهش سطوح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی در موش‌های دیابتی باعث بهبود عوارض نوروپاتی حسی دیابت می‌شود (۲۰). نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تمرین هوازی با افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی (۲۱)، افزایش سطوح سایتوکاین‌های ضدالتهابی (۱۸)، کاهش فعالیت میکروگلیا‌های نخاع (۸) و کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد (۱۶، ۲۲) توانسته است سطوح نشانگرهای التهابی را کاهش دهد و از تخریب پیش‌رونده نرون‌های حسی جلوگیری کند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهد (۸). از طرفی محققین نشان داده‌اند که تمرین هوازی با شدت بالا منجر به هایپرگلیسمی، افزایش استرس اکسیداتیو و سطوح پروتئین HMGB1 می‌شود (۲۳، ۲۴). با این حال مکانیسم اثر تمرین

نوروپاتی محیطی دیابتی (DPN)^۱ شایع‌ترین عارضه ناشی از دیابت است. تقریباً بیش از نیمی از بیماران دیابتی، اختلالات عصبی محیطی خفیف تا شدید گزارش داده‌اند (۱) که به طور قابل توجهی، کیفیت زندگی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). DPN با علائم آشکاری چون درد، بی‌حسی، مورمور شدن و ضعف که معمولاً در دست و پا تجربه می‌شود، مشخص می‌گردد (۳). در این عارضه، عملکرد ساختار فیبرهای حسی دچار اختلال می‌شود، به گونه‌ای که نوروپاتی حسی دچار آتروفی آکسونی و میلین زایی می‌شوند (۱، ۴). درد نوروپاتیک یکی از آشکارترین علائم DPN است که با خصوصیات نظیر حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرآلژزیا) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) مشخص می‌شود (۴، ۵). شواهد حاصل از مدل‌های حیوانی و انسانی نشان می‌دهد، که پاسخ‌های التهابی نقش محوری در توسعه درد نوروپاتی دیابت ایفا می‌کنند (۶-۸). محققین بر این باورند که پروتئین HMGB1^۲ به عنوان یکی از اعضای خانواده سایتوکاین‌های نوین هشداردهنده التهاب در توسعه و حفظ درد نوروپاتیک دیابت اثرگذار است (۹) پروتئین HMGB1، پروتئین غیر هیستونی با وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون در هسته سلول است و به عنوان یک پروتئین چند عملکردی از طریق چاپرون DNA در فرایندهای سلولی نظیر رونویسی، همانندسازی، نوترکیبی، ترمیم DNA و پایداری ژنوم نقش ایفا می‌کند (۱۰). اخیراً پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های ایمنی فعال شده در پاسخ به عوامل استرس‌زا ناشی از هایپرگلاسمی، پروتئین HMGB1 را به فضای خارج سلولی ترشح نموده و به عنوان لیگاند درون‌زا مربوط به عامل پاتوژن یا میزبان به گیرنده‌های TLR2/4 و RAGE اتصال و آنها را فعال می‌کند (۱۱). این گیرنده‌ها به عنوان رسپتور مبدل سیگنال، مسیرهای پیام‌رسانی

^۱. Diabetic peripheral neuropathy

^۲. High mobility group box 1

اندازه‌گیری و موش‌های صحرانی که قند خون آن‌ها بالاتر از 250mg/dl بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون در پایان برنامه تمرینی نیز قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد (۲۷).

آزمون‌های رفتاری

دو هفته پس از القای دیابت (پیش از شروع پروتکل تمرین هوازی) آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتی به عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت از تمامی گروه‌ها به عمل آمد (۱۷، ۲۰، ۲۸). به منظور بررسی اثرات طولانی‌مدت تمرین، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، مجدداً آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتی اجرا شد، برای اجتناب از عوامل مداخله‌گر نظیر اثرات ضد دردی القاء شده توسط استرس آزمون‌های رفتاری میان ساعت ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد (۲۰).

آزمون تیل فلیک^۱: برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی (هایپرآلژیای حرارتی) از آزمون تیل فلیک استفاده شد. این آزمون براساس روش Smith و D'Amour انجام گرفت (۲۹). بر اساس این آزمون، حیوان به صورت افقی در محفظه مخصوص نگهداری حیوان قرار گرفت، به طوری که دم آن آزاد بود. با استفاده از دستگاه تیل فلیک (مدل تی اف - ۵۵۰۰ ساخت شرکت برج صنعت ایران) تابش نور سوزان (در حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد) به یک‌سوم میانی دم حیوان اعمال شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان متوسط پاسخ‌دهی پایه بین ۳ تا ۴ ثانیه باشد و زمان ۱۰ ثانیه به عنوان زمان قطع تابش نور به ثلث میانی دم حیوان (Cut of time) در نظر گرفته شد. مدت زمان تأخیر (Tail-Flick latency) و یا فاصله زمانی شروع تابش حرارت تا حرکت دادن دم توسط حیوان، در سه مرحله و به فاصله ۵ دقیقه در گروه‌های مختلف بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها به عنوان زمان تأخیر ثبت گردید.

هوازی به عنوان یک مداخله درمانی غیر دارویی و غیر تهاجمی بر درد نوروپاتی دیابتی ناشی از التهاب در سطح سلول کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تمرین هوازی بر سطوح پروتئین HMGB1 و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی با درد نوروپاتی دیابت است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی بوده که تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سن ۸ هفتهگی با محدوده وزنی $220 \pm 10/2$ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه و در گروه‌های چهارتایی در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نورگردان و دست‌کاری، موش‌ها به طور تصادفی به چهار گروه ($n = 7$) نوروپاتی دیابت، نوروپاتی دیابت تمرین، سالم تمرین و کنترل سالم تقسیم شدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز با کد (EE/97.24.3.69973/scu.ac.ir) مورد تأیید قرار گرفت.

القاء دیابت: پس از اتمام پروتکل آشناسازی و متعاقب ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القاء دیابت با تزریق درون صفاقی محلول استروپتوزوتوسین STZ (Sigma, St. Louis, MO)؛ حل شده در بافر سیترات M ۰/۰۵ با $\text{pH}: 4/5$ ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن صورت گرفت (۲۵، ۲۶). به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات M ۰/۰۵ با $\text{pH}: 4/5$ به صورت درون صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانس بر روی ورید دم، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان)

¹. Tail-Flick

$$\text{نمره درد} = \frac{(0 \times T_0) + (1 \times T_1) + (2 \times T_2) + (3 \times T_3)}{20}$$

به ترتیب، T0، T1، T2 و T3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای رفتار صفر، ۱، ۲ و ۳ را نشان می‌دهد. عدد ۲۰ نیز از تعداد پانزده ثانیه‌ها در هر ۵ دقیقه به دست آمده است (در هر دقیقه، ۴ عدد ثبت گردید که مجموعاً در ۵ دقیقه، ۲۰ عدد را شامل می‌شود). میانگین نمره درد مربوط به دقایق ۱۰-۰ و ۶۰-۱۵ پس از تزریق فرمالین، به ترتیب به عنوان معیار اندازه‌گیری درد حاد و مزمن در نظر گرفته شد. فاصله زمانی بین دقایق ۱۵-۱۰ دوره خاموش کوتاه‌مدت محسوب می‌شود که پاسخ ناشی از درد در پنجه‌ی پای تزریق شده، مشاهده نشد. هر حیوان فقط یک بار برای این آزمون، آزمایش شد.

پروتکل تمرین هوازی: پس از اطمینان از حصول نوروپاتی دیابت در موش‌های صحرائی نر، پروتکل تمرین هوازی به مدت شش هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر پروتکل تمرین هوازی بر اساس مطالعه Chae و همکاران، ۲۰۱۱ انجام گرفت: ابتدا به منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دست‌کاری حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بروی نوار گردان راه رفتند. سپس گروه‌های ورزشی نوروپاتی دیابتی تمرین و کنترل سالم تمرین در معرض تمرین نوارگردان، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند (۳۱). سرعت و مدت تمرین نوارگردان هر هفته به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم و ۱۷ تا ۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم و ششم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شد. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶-۱۸ عصر برگزار شد.

آزمون فرمالین^۱: برای اجرای آزمون فرمالین از روش متداول دنیس و دوبوژن استفاده شد (۳۰). بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه‌ی پلکسی گلاس (۳۰×۲۵×۲۵ سانتی‌متر) روی سطح شیشه‌ای دستگاه فرمالین قرار داده می‌شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، ۵۰ میکرو لیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد (رقیق‌شده با محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم) به صورت زیرجلدی به سطح پشتی پنجه‌ی پای عقب و راست موش تزریق و بلافاصله به محفظه مزبور برگردانده شد. توسط آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه زیر سطح شیشه‌ای، پنجه پای حیوان بصورت دقیق مشاهده شد. به دنبال تزریق فرمالین، رفتارهای دردناک از حیوان بروز می‌کند، که شدت درد در حیوان بر اساس یک تقسیم‌بندی قراردادی به روش Dubuisson و Dennis (۳۰) بر اساس نوع رفتار مشاهده شده، ۴ درجه تفکیکی به طریق ذیل به حیوان داده می‌شد.

- ۱- حیوان روی پای تزریق‌شده می‌نشیند و یا راه می‌رود: نمره صفر
 - ۲- حیوان پنجه پای را که فرمالین با آن تزریق شده را به راحتی روی سطح تماس قرار نداده ولی وزن خود را بیشتر روی پای سالم خود قرار می‌دهد: نمره ۱
 - ۳- حیوان پنجه پای که فرمالین به آن تزریق شده را از سطح تماس جدا می‌کند: نمره ۲
 - ۴- حیوان پنجه پای که فرمالین به آن تزریق شده را می‌لیسد، گاز می‌گیرد و یا به شدت تکان می‌دهد: نمره ۳
- ثبت پاسخ‌های رفتاری در فواصل ۱۵ ثانیه‌ای بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ (زمان آزمون) به صورت ۱۲ بلوک ۵ دقیقه‌ای محاسبه شد. در این ارتباط پاسخ در هر تناوب ثبت و به عنوان شاخصی از میزان درد در آزمون فرمالین در نظر گرفته شد. با استفاده از این روش، اعداد صفر تا سه برای امتیاز درد در زمان‌های مختلف در هر ایتروال به دست آمد. میانگین نمره درد در هر ۵ دقیقه طبق فرمول زیر محاسبه می‌شد:

^۱ Formalin Test

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس دو طرفه و در صورت معنی داری، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌های دو گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-22 در سطح معنی داری ۰/۰۵ ($P < 0.05$) انجام شد.

نتایج

نتایج نشان داد که وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت ($P < 0.05$)، اما در پایان پژوهش، بعد از اجرای پروتکل تمرین، میانگین تغییرات وزن موش‌های گروه‌های نوروپاتی دیابت و نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری کمتر بود ($P < 0.05$). اگر چه پس از شش هفته تمرین هوازی میانگین تغییرات وزن گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت یافت، اما این افزایش معنادار نبود ($P < 0.05$) (جدول ۱).

پس از القاء دیابت، سطح گلوکز خون به صورت معناداری در گروه‌های نوروپاتی دیابت افزایش یافت ($P < 0.05$) بعد از اجرای پروتکل تمرین، گروه‌های نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه‌های سالم همچنان از اختلاف معنی داری برخوردار بودند ($P < 0.05$)، ولی با این حال، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت بعد از اجرای پروتکل تمرین به صورت معناداری پایین‌تر بود ($P < 0.05$) (جدول ۱).

میانگین مدت زمان تأخیر (Tail-Flick latency) در آزمون تیل فلیک (هایپرآلژزای حارثی) دو هفته پس از القاء دیابت در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). همچنین پس از اجرای پروتکل تمرین هوازی، میانگین مدت زمان تأخیر در پس کشیدن دم در آزمون تیل فلیک در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$) (جدول ۲).

استخراج نمونه و روش اندازه‌گیری: در پایان شش هفته برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی حیوانات، قفسه سینه حیوان شکافته شد و ۱۰ میلی‌لیتر خون مستقیم از قلب موش گرفته و در لوله‌های حاوی محلول EDTA ریخته شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسما آن جدا شد. نمونه‌های پلاسما در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و تا زمان تحلیل نگهداری شدند. برای سنجش میزان محتوی پروتئین HMGB1 سرم از روش الایزای ساندویچی با استفاده از کیت‌های الایزا شرکت zellbio آلمان دستگاه الایزا مارک Biotek (با حساسیت ۱pg/ml) مطابق با روش درج شده در بروشور استفاده شد. همچنین برای بررسی متغیرهای استرس اکسیداتیو، تحت شرایط استریل قطعه نخاعی حاوی بخش خلفی نخاع از سطح L4 تا L6، مطابق روش Gelderd و Chopi (۳۲) که سگمنت‌های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه مهره‌های T13-L1 ستون فقرات است، جدا شد. سپس ستون فقرات با استفاده از کانال مرکزی به عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک و بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه به عنوان نمونه، در نیتروژن ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌گیری بافت مربوطه، به وسیله ترازو دیجیتال سارتریوس مدل CPA224S با دقت هزارم میلی‌گرم، وزن‌کشی و میزان ۸۳۳ mg جدا و پس از اضافه نمودن بافر فسفات سالین^۱ (PBS) حاوی آنتی پروتئین سینگما با استفاده از هموژنایزر، هموژنه شده و به وسیله سانتریفیوژ سرم جداسازی شد. میزان غلظت مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز توسط کیت‌های مخصوص شرکت زلیبو، ساخت کشور آلمان و به روش رنگ سنجی آنزیمی اندازه‌گیری شد.

^۱. Phosphate Buffer Solution

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار وزن بدن و سطح گلوکز خون در موش‌های گروه‌های مختلف

گروه‌ها				متغیر	
کنترل سالم (n=7)	سالم تمرین (n=7)	نوروپاتی دیابت تمرین (n=7)	نوروپاتی دیابت (n=7)	قبل از اجرای پروتکل	وزن (گرم)
۲۱۸/۵۷±۱۹/۷	۲۲۰/۷۱±۱۵/۶۶	۲۲۵/۰۱±۲۲/۵۵	۲۱۹/۲۶±۲۵/۰۷	بعد از اجرای پروتکل	
۲۷۱/۴۳±۱۲/۴۹	۲۴۷/۱۴±۳۱/۹۶	۲۴۵/۰۱±۱۸/۷۱*	۱۹۹/۲۸±۱۲/۷۳*	پس از القاء دیابت	گلوکز خون (میلی گرم/دسی لیتر)
۱۱۲/۸۶±۴/۳۴	۱۱۳/۴۳±۳/۰۵	۳۷۵/۴۳±۶/۲۷*	۳۷۰/۴۳±۲/۳*	پس از اجرای پروتکل	
۱۱۳/۴۳±۶/۰۵	۱۰۸/۴۳±۶/۰۸	۴۵۵/۸۶±۲۷/۱۴#	۵۲۴/۴۳±۱۷/۲۸		

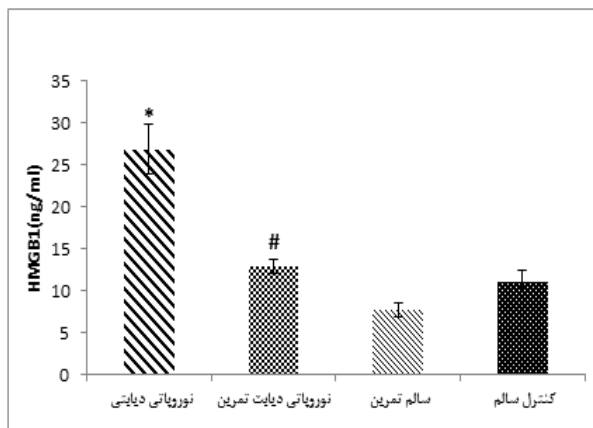
کلیه مقادیر جدول به صورت انحراف استاندارد ± میانگین می‌باشند. * اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). # اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

جدول ۲. نتایج آزمون تیل فلیک و آزمون فرمالین در گروه‌های مختلف

گروه‌ها				متغیر	
کنترل سالم (n=7)	سالم تمرین (n=7)	نوروپاتی دیابت تمرین (n=7)	نوروپاتی دیابت (n=7)	پس از القاء دیابت	آزمون تیل فلیک (ثابته)
۳/۲۳±۰/۲۵۲	۲/۹۷±۱/۴۶	۱/۷۸۷±۲/۸۹	۱/۸۰۱±۱/۹۷*	پس از اجرای پروتکل تمرین	
۳/۱۲±۱/۱۸	۲/۲۱±۱/۱۸	۲/۳۶۱±۱/۶۸#	۱/۷۱۰±۱/۷۶	مرحله حاد	آزمون فرمالین (نمره درد)
۱/۵۳۴±۱/۶۵	۱/۵۸۶±۳/۳۱	۱/۸۰۱±۱/۸۳#	۲/۶۳۷±۱/۵۱*	مرحله مزمن	
۱/۶۸۱±۱/۶۳	۱/۴۳۳±۱/۹۹	۱/۶۹۷±۱/۸۴#	۲/۷۷۷±۱/۴۳*		

کلیه مقادیر جدول به صورت انحراف استاندارد ± میانگین می‌باشند. * اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). # اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

کنترل با کاهش همراه بود ولی از نظر آماری تغییرات معناداری را نشان نداد (P<0.05) (نمودار ۱)



نمودار ۱. میزان سطوح سرمی پروتئین HMGB1 در گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05).

اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

نتایج نشان داد که القاء دیابت ناشی از استرپتوزوسین منجر به افزایش معنی‌داری در میزان غلظت محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدئید در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌شود (P<0.05). همچنین پس از اجرای

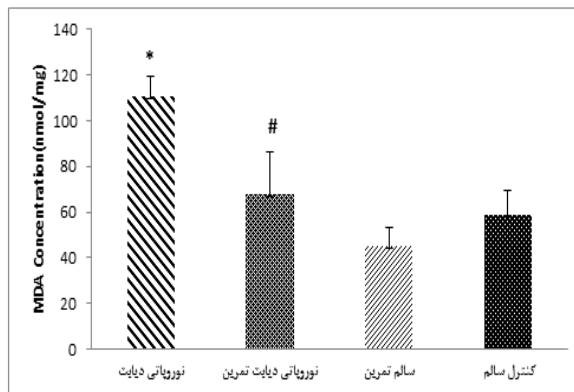
پس از اجرای شش هفته پروتکل تمرین هوازی و بررسی میانگین نمره درد در مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین، نشان داد که میزان پاسخ به درد در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<0.05). همچنین میانگین میزان پاسخ به درد ناشی از تزریق فرمالین در مرحله حاد و مزمن در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به نوروپاتی دیابت به طور معنی‌داری کمتر بود (P<0.05) (جدول ۲).

با توجه به میانگین گروه‌ها مشخص شد که القاء دیابت موجب افزایش معنادار سطوح پروتئین HMGB1 در موش‌های نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه سالم شد (P<0.05). همچنین میزان سطوح سرمی پروتئین HMGB1 در گروه نوروپاتی دیابت تمرین، به طور معناداری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت پائین‌تر بود (P<0.05). تفاوت معنی‌داری در سطوح پروتئین HMGB1 بین گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به سالم کنترل و سالم تمرین مشاهده نشد (P<0.05). میزان سطوح پروتئین HMGB1 در گروه سالم تمرین نسبت به سالم

بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القاء دیابت ناشی از استریتوزوسین، منجر به افزایش سطح گلوکز خون، سطوح پروتئین HMGB1، غلظت MAD و کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در گروه نوروپاتی دیابت شد. همچنین باعث کاهش حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (میانگین مدت زمان تأخیر در آزمون تیل فلیک) در موش‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه سالم شد. هم‌راستا با نتایج این پژوهش، Bestall و همکاران، ۲۰۱۸ نشان دادند که پروتئین HMGB1 در نتیجه استرس ناشی از مسمومیت گلوکز^۱ به عنوان الگوی مولکولی وابسته به پاتوژن از میکروگلیا ها، سلول‌های اندوتلیال، شوان و نورون‌ها به محیط خارج سلولی ترشح و گیرنده‌های RAGE و TLR2/4 را فعال می‌کند، تعامل HMGB1 با این گیرنده‌ها، عامل رونویسی NF-κB را فعال کرده و بیان ژن‌هایی را القاء می‌کند که پاسخ‌های التهابی را تنظیم می‌کنند. همچنین نشان دادند که التهاب عصبی حاصل از HMGB1، منجر به نقصان جریان خون نرونی، تجزیه میلین، آسیب اکسایشی سلولی، کاهش حمایت نوروتروفیکی و اختلال در نوزایش عصبی شده و در نتیجه این عوامل، اختلال در هدایت عصبی، آتروفی آکسونی و حساس‌سازی نورون‌های حسی محیطی (هایپرالژیا) در موش‌های دیابتی است (۱۳). Wang و همکاران، ۲۰۱۸ نشان دادند که، سطوح پروتئین HMGB1 در نتیجه القاء دیابت ناشی از STZ در نورون‌های حسی اولیه، میکروگلیا ها و آستروسیت‌ها افزایش می‌شود و به واسطه آن، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرالژیا) و محرک‌های بدون درد (آلودینیای مکانیکی) افزایش می‌یابد (۹). بنابراین این احتمال وجود دارد که، مهار HMGB1، از تجمع اضافی سایتوکین‌های پیش التهابی در سیستم عصبی کاهش و حساسیت نوسیسپتورها را در دیابت افزایش دهد (۱۰، ۳۳). برخی از مشاهدات اخیر حاکی از آن است که، تنش اکسایشی ناشی از

شش هفته پروتکل تمرین هوازی، کاهش معنی‌داری در میزان غلظت محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدئید در بخش خلفی نخاع در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به با گروه نوروپاتی دیابت وجود داشت ($P < 0.05$) (نمودار ۲).



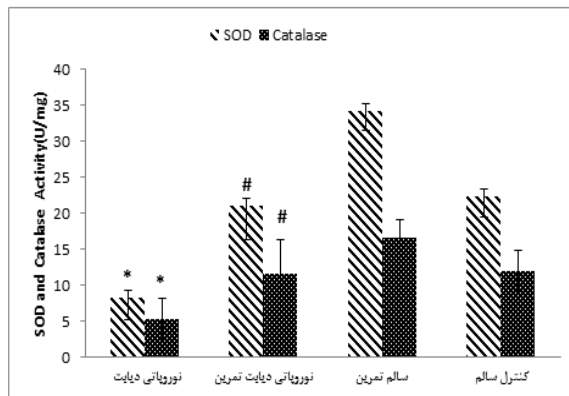
نمودار ۲. میزان غلظت مالون دی آلدئید در بخش

خلفی نخاع گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$).

اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

بعد از القاء دیابت، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). همچنین پس از اجرای پروتکل تمرین هوازی، افزایش معنی‌داری در بین گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳. میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید

دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$).

اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

¹. Glucose toxicity

عملکرد ساختار فیبرهای حسی است. به نظر می‌رسد که تمرین هوازی پتانسیل درمانی مؤثری برای بهبود عملکرد فیبرهای حسی در نوروپاتی ناشی از دیابت از طرق کاهش سطح التهاب به واسطه سرکوب افزایش استرس اکسیداتیو و سطوح پروتئین HMGB1، به عنوان یک راهبرد پیشنهادی برای بهبود درد نوروپاتی دیابت در نظر گرفته شده است. در ارتباط با شناسایی مکانیسم‌های درگیر در اثرات تجویز فعالیت‌های هوازی بر کاهش سطوح پروتئین HMGB1 در موش‌های مدل درد نوروپاتی دیابت و بهبود عملکرد نورون‌های حسی و کاهش درد نوروپاتی می‌توان استدلال کرد که، فعالیت‌های هوازی از طریق افزایش ظرفیت ضد اکسایشی، سطوح سایتوکین‌های ضدالتهابی و پروتئین‌های شوک گرمایی می‌تواند منجر به کاهش سطح پروتئین HMGB1 و التهاب ناشی از آن شود (۳۶).
 ۴۰، ۴۱). شواهد حاصل از این تحقیق و پژوهش‌های اخیر نشان داد که، محیط هایپرگلیسمیک، ظرفیت متابولیسمی میتوکندری‌ها را دچار اضافه بار نموده و فشار اکسایشی را افزایش می‌دهد که موجب افزایش ترشح HMGB1 در افراد دیابتی می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که، فعالیت ورزشی ظرفیت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی را بالا می‌برد (۴۱)، بنابراین این احتمال وجود دارد که فعالیت هوازی به واسطه فعال کردن فاکتور رونویسی NRF2، تولید پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان را تنظیم مثبت و از این طریق رهایی پروتئین HMGB1 را مهار کند (۳۶). شواهد گواه بر این است که، سطوح پروتئین HMGB1 توسط سایتوکین‌های ضدالتهابی IL-10 تعدیل می‌شود (۴۲-۴۴) از طرفی غلظت گردش خون سایتوکین‌های ضدالتهابی بعد از ورزش افزایش می‌یابد به طوری که گزارش شده فعالیت‌های هوازی و قدرتی غلظت IL-10 به عنوان یک مهارکننده طبیعی مسیر سیگنالینگ NF-κB افزایش می‌دهند (۴۵، ۴۶). محققین بر این باورند که سایتوکین ضدالتهابی IL-10 تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و مهارکننده

هایپرگلیسمی به عنوان عامل مهم تنظیم افزایشی HMGB1 در دیابت است (۱۳). لذا پیشنهاد شده است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق مهار HMGB1 عوارض ناشی از دیابت را کاهش می‌دهد (۳۴). تحقیق حاضر این موضوع را مورد تأیید قرار داد و نشان داد که القاء دیابت، میزان غلظت مالون دی آلدئید را افزایش و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را در بافت نخاع کاهش می‌دهد. بسیاری از مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که، فعالیت‌های ورزشی از طریق افزایش ظرفیت ضد اکسایشی و تغییرات در فنوتیپ میتوکندریایی می‌تواند به عنوان راهبرد مؤثر درمانی غیر دارویی برای تعدیل عوامل التهابی نقش داشته باشد (۸، ۳۵، ۳۶) نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که، اجرای شش هفته تمرین هوازی منجر به کاهش معنی‌دار سطح سرمی پروتئین HMGB1، میزان غلظت مالون دی آلدئید و افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت شد. علاوه بر آن، کاهش معنی‌داری در میانگین نمره درد در آزمون فرمالین^۱ (هایپرآلژزیای شیمیایی) و افزایش معنی‌داری در مدت زمان تأخیر در آزمون تیل فلیک^۲ (هایپرآلژزیای حرارتی) بعد از اجرای پروتکل تمرین هوازی در گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت مشاهده شد. این نتیجه همسو با نتایج Giallauria و همکاران، ۲۰۱۱ نشان دادند که، تمرینات هوازی بلند مدت موجب کاهش پروتئین HMGB1 در بیماران مبتلا به سکت قلبی می‌شود. همچنین بر این باورند که، افزایش سطوح پروتئین‌های شوک حرارتی از طریق مهار استرس اکسیداتیو، انتقال و ترشح سیتوپلاسمی HMGB1 را تنظیم منفی می‌کنند (۳۷-۳۹). با استناد به نتایج به دست آمده از تحقیقات ذکر شده و مطالعه حاضر، افزایش سطح التهاب ناشی از HMGB1 در سیستم عصبی پیرامونی، دلیل احتمالی اختلال در

1. Chemical hyperalgesia

2. Thermal hyperalgesia

قطعی‌تر مورد بررسی قرار دهند. در مجموع نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پروتئین HMGB1 در نوروپاتی محیطی دیابتی تنظیم مثبت شده و شرایط التهابی را راه‌اندازی می‌کند. تصور بر این است که یکی از عوامل احتمالی درگیر در درد نوروپاتی دیابتی، تغییر در شاخص‌های التهابی است. از سوی دیگر تمرین هوازی با شدت متوسط میزان سطوح پروتئین HMGB1 و استرس اکسیداتیو را تعدیل کرده و همچنین حساسیت نوسیسپتورها به عوامل درد زا که در نتیجه تخریب پیشرونده نرون‌های حسی رخ می‌دهد را بهبود بخشید. لذا به نظر می‌رسد، مهار پروتئین HMGB1 می‌تواند به عنوان یک پاسخ جبرانی برای کاهش سطح سایتوکین‌های پیش التهابی باشد و تمرین هوازی به عنوان یک راهبرد غیر دارویی این تغییرات را تعدیل و درد نوروپاتیک ناشی از دیابت را بهبود می‌بخشد. پیشنهاد می‌شود که از تمرین استقامتی به شکل هوازی با شدت متوسط به عنوان یک مداخله درمانی غیر دارویی برای بیماران دیابتی به منظور کاهش درد نوروپاتیک استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در دانشگاه شهید چمران اهواز است و از کلیه کسانی که امکان اجرای مطلوب تحقیق حاضر را مهیا نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود. در ضمن هزینه‌های این تحقیق توسط نویسندگان این مقاله تأمین شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

منابع

1. Wilson N, Wright D. Inflammatory mediators in diabetic neuropathy. *The Journal of Diabetes & Metabolism* 2011;5:2.
2. Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, et al. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *The Journal of Diabetes & Metabolism* 2009;35(3):206-13.
3. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature Reviews Neurology* 2011;7(10):573.
4. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52(1):77-92.
5. Yoo M, Sharma N, Pasnoor M, Kluding PM. Painful diabetic peripheral neuropathy: presentations, mechanisms, and exercise

میانجی‌های التهابی نظیر سایتوکین‌های پیش التهابی است. (۴۷) مطالعات اخیر نشان دادند که دو هفته بعد از تزریق STZ سطح سایتوکین ضدالتهابی IL-10 کاهش و درد نوروپاتی دیابت افزایش می‌یابد، همچنین در نتیجه اجرای تمرین هوازی سطح IL-10 افزایش و حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا کاهش یافته بود (۸). نهایتاً این احتمال وجود دارد که افزایش سطوح سایتوکین ضدالتهابی IL-10 ناشی از تمرین عامل کاهش سطح پروتئین HMGB1 باشد. همچنین شواهد حاصل از مطالعات نشان می‌دهد، دیابت باعث کاهش سطوح پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) و افزایش فعال شدن سایتوکین‌های التهابی می‌گردد (۴۸، ۴۹). محققان نشان داد که سطوح HSPها ارتباط معکوسی با مقاومت به انسولین، سایتوکین‌های التهابی، سطوح GLUT4، عملکرد میتوکندریایی و پروتئین HMGB1 دارد (۳۶، ۴۴، ۴۹). Chen و همکاران، ۲۰۱۳ نشان دادند که فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش سطح HSPها در افراد دیابتی می‌شود (۱۷، ۴۴، ۵۰). به نظر می‌رسد که فعالیت‌های هوازی از طریق افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی باعث مهار پروتئین HMGB1 و التهاب ناشی از آن می‌شود. با این حال یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم اندازه‌گیری سایتوکین‌های ضدالتهابی و پروتئین‌های شوک حرارتی است که مانع از بحث دقیق در این زمینه می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، عوامل مهارکننده پروتئین HMGB1، همانند سطوح سایتوکین‌های ضدالتهابی و پروتئین‌های شوک گرمایی برای دستیابی به شرایط

- therapy. *The Journal of Diabetes & Metabolism* 2013.
6. Chen T, Li H, Yin Y, Zhang Y, Liu Z, Liu H. Interactions of Notch1 and TLR4 signaling pathways in DRG neurons of in vivo and in vitro models of diabetic neuropathy. *Scientific Reports* 2017;7(1):14923.
 7. González-Clemente J, Mauricio D, Richart C, Broch M, Caixas A, Megia A, et al. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF- α system in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology* 2005;63(5):525-9.
 8. Thakur V, Gonzalez M, Pennington K, Nargis S, Chattopadhyay M. Effect of exercise on neurogenic inflammation in spinal cord of Type 1 diabetic rats. *Brain Research* 2016;1642:87-94.
 9. Wang X, Feng C, Qiao Y, Zhao X. Sigma 1 receptor mediated HMGB1 expression in spinal cord is involved in the development of diabetic neuropathic pain. *Neuroscience Letters* 2018;668:164-8.
 10. Wu H, Chen Z, Xie J, Kang L-N, Wang L, Xu B. High mobility group Box-1: a missing link between diabetes and its complications. *Mediators of Inflammation* 2016;2016.
 11. Wang Y, Zhong J, Zhang X, Liu Z, Yang Y, Gong Q, et al. The role of HMGB1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research* 2016;2016.
 12. Yu Y, Tang D, Kang R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Frontiers in Physiology* 2015;6:93.
 13. Bestall SM, Hulse RP, Blackley Z, Swift M, Ved N, Paton K, et al. Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *Journal of Cell Science* 2018;131(14):jcs215939.
 14. Horiuchi T, Sakata N, Narumi Y, Kimura T, Hayashi T, Nagano K, et al. Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity. *Journal of Biological Chemistry* 2017;292(20):8436-46.
 15. Griggs RB, Donahue RR, Adkins BG, Anderson KL, Thibault O, Taylor BK. Pioglitazone inhibits the development of hyperalgesia and sensitization of spinal nociceptive neurons in type 2 diabetes. *The Journal of Pain* 2016;17(3):359-73.
 16. Chen Y-W, Chiu C-C, Hsieh P-L, Hung C-H, Wang J-J. Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. *Anesthesia & Analgesia* 2015;121(1):239-46.
 17. Chen Y-W, Hsieh P-L, Chen Y-C, Hung C-H, Cheng J-T. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesthesia & Analgesia* 2013;116(2):482-90.
 18. Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays in Biochemistry* 2006;42:105-17.
 19. Ribeiro-Samora G, Rabelo L, Ferreira A, Favero M, Guedes G, Pereira L, et al. Inflammation and oxidative stress in heart failure: effects of exercise intensity and duration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017;50(9).
 20. Yoon H, Thakur V, Isham D, Fayad M, Chattopadhyay M. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Experimental Neurology* 2015;267:107-14.
 21. 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. *Anesthesia & Analgesia* 2012;114(6):1330-7.
 22. Giallauria F, Gentile M, Chiodini P, Berrino F, Mattiello A, Maresca L, et al. Exercise training reduces high mobility group box-1 protein levels in women with breast cancer: findings from the DIANA-5 study. *Monaldi Archives for Chest Disease* 2014;82(2).
 23. Goh J, Behringer M. Exercise alarms the immune system: a HMGB1 perspective. *Cytokine* 2018;110:222-225.
 24. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1993;25(2):218-24.
 25. Yan J-c, Yuan W, Lou X, Zhu T. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. *Neuroscience Letters* 2012;526(1):54-8.
 26. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Current Protocols in Neuroscience* 2004;29(1):9-18.

27. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung & Circulation* 2003;12(1):44-50.
28. Malmberg AB, Bannon AW. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience* 1999;6(1):8.9. 1-8.9. 15.
29. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1941;72(1):74-9.
30. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-74.
31. Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2011;67(2):235-41.
32. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *The Anatomical Record* 1977;188(1):45-7.
33. Wan W, Cao L, Khanabdali R, Kalionis B, Tai X, Xia S. The emerging role of HMGB1 in neuropathic pain: a potential therapeutic target for neuroinflammation. *Journal of Immunology Research* 2016.
34. Dai Y, Wong B, Yen Y-M, Oettinger MA, Kwon J, Johnson RC. Determinants of HMGB proteins required to promote RAG1/2-recombination signal sequence complex assembly and catalysis during V (D) J recombination. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25(11):4413-25.
35. Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *The Journal of Pain* 2007;8(12):989-97.
36. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *The Journal of Physiology* 2016;594(18):5195-207.
37. Giallauria F, Cirillo P, D'agostino M, Petrillo G, Vitelli A, Pacileo M, et al. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure* 2011;17(2):108-14.
38. Tang D, Kang R, Xiao W, Wang H, Calderwood SK, Xiao X. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *The Journal of Immunology* 2007;179(2):1236-44.
39. Tang D, Kang R, Xiao W, Jiang L, Liu M, Shi Y, et al. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release. *The Journal of Immunology* 2007;178(11):7376-84.
40. Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exercise Immunology Review* 2006;12(1):34-53.
41. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Experimental Diabetes Research* 2011;2012.
42. Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, et al. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunology Letters* 2002;81(1):71-5.
43. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110(28):11499-504.
44. Elfeky M, Kaede R, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K. Adiponectin inhibits LPS-induced HMGB1 release through an AMP kinase and heme oxygenase-1-dependent pathway in RAW 264 macrophage cells. *Mediators of Inflammation* 2016.
45. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 2005;98(4):1154-62.
46. Zanchi NE, Lira FS, de Siqueira Filho MA, Rosa JC, de Oliveira Carvalho CR, Seelaender M, et al. Chronic low frequency/low volume resistance training reduces pro-inflammatory cytokine protein levels and TLR4 mRNA in rat skeletal

- muscle. *European Journal of Applied Physiology* 2010;109(6):1095-102.
47. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9(4):447-53.
48. Padmalayam I. The heat shock response: its role in pathogenesis of type 2 diabetes and its complications, and implications for therapeutic intervention. *Discovery Medicine* 2014;18(97):29-39.
49. Hooper PL, Hooper PL. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress and Chaperones* 2009;14(2):113-5.
50. Amorim FT, Zuhl MN. Heat Shock Proteins, Exercise and Inflammation. *Heat Shock Proteins in Signaling Pathways: Springer*; 2019;101-19.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
27th Year, No.142
August- September
2019*

Received: 13/07/2019

Last revised: 25/08/2019

Accepted: 03/09/2019

The effect of aerobic exercise on HMGB1 protein levels and some oxidative stress indices in rats with diabetic neuropathic pain

Ahmad Kaki¹, Masoud Nikbakht^{1*}, AbdolHamid Habibi¹, Hadi Fathi Moghadam²

1. Department of Sport Physiology, Faculty of Sports Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Department of Medical Physiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

* Corresponding author e-mail: nikbakht7@ut.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Neuroinflammation plays a pivotal role in the development of diabetic neuropathic pain. The purpose of this study was to investigate the effect of aerobic exercise on HMGB1 protein levels and some oxidative stress biomarkers in a rat model of diabetic neuropathic pain.

Materials and Methods: 40 male Wistar rats (weighing 220 ± 10.2 g) were randomly divided into four groups: diabetic neuropathy, diabetic neuropathy + exercise, healthy exercise, and healthy control. Diabetes was induced by STZ injection (50 mg/kg). After confirming the development of diabetes neuropathy by behavioral tests, exercise groups received 6 weeks of continuous aerobic exercise with an average intensity of 15 m/min for 30 minutes on a treadmill. Serum levels of HMGB1 were measured by ELISA and malondialdehyde (MDA) concentrations and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes in spinal cord were determined by biochemical methods. Two-way ANOVA and Tukey's post hoc tests were used for statistical analysis.

Results: Aerobic exercise significantly reduced the serum level of HMGB1 protein and MDA concentration and increased the activity of SOD and CAT enzymes compared to diabetic neuropathy group ($p < 0.05$). Also, HMGB1 levels and MDA increased and the activity of SOD and CAT enzymes decreased in the diabetic neuropathy group ($p < 0.05$).

Conclusion: Aerobic exercise seems to modify the HMGB1 protein levels and oxidative stress and improve the sensitivity of the nociceptors to painful agents. It is suggested that aerobic exercise be used as a non-prescriptive therapeutic intervention for diabetic patients to reduce neuropathic pain.

Keywords: Aerobic exercise, HMGB1, Oxidative stress, Diabetic peripheral neuropathy