[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

بررسی اثر یک دوره تمرین تداومی بر تغییرات نکروز و آپوپتوز هیپوکمپ موش های صحرایی دیابتی

نبی شمسائی[۱*]، هادی عبدی[۲]، مرتضی شمسی[۳]

۱) گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲) گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۵

چکیده

مقدمه: دیابت با عوارض نورولوژیکی مختلفی در سیستم عصبی همراه است که در نهایت منجر به آسیب سلولی می‌شود. مطالعات گذشته اثرات مفید فعالیت ورزشی بر آسیب مغزی ناشی از نورپاتی دیابتی را در مدل حیوانی نشان داده‌اند. در مطالعه حاضر، اثر یک دوره تمرین ورزشی هوازی بر مرگ سلولی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر دیابتی، بررسی شد

مواد و روش‌ها: ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (وزن ۳۰۰-۲۶۰ گرم) از انستیتو پاستور تهران خریداری و به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه شم، گروه دیابت و گروه دیابت + تمرین (۷ سر رت در هر گروه). دیابت با تزریق داخل صفاقی یک دوز استرپتوزوتوسین (STZ) به میزان ۶۰ ml/kg القا شد. ملاک دیابتی شدن حیوان، قند خون بالای ۲۵۰ mg/dl می باشد. یک هفته پس از القای دیابت، رت‌های گروه مداخله ورزشی، به مدت ۴ هفته، ۵ روز در هفته بر روی تردمیل دویدند. از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (نیسل) جهت بررسی میزان مرگ سلولی نکروزی و از رنگ‌آمیزی TUNEL جهت بررسی میزان آپوپتوز استفاده شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین ورزشی هوازی بطور معنی‌داری میزان مرگ سلولی نکروزی ($p<۰/۰۱$) و میزان آپوپتوز ($p<۰/۰۵$) ناشی از دیابت را در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: تمرین ورزشی هوازی اثرات محافظتی را در برابر نوروپاتی دیابتی ایجاد می کند. این مکانیسم حفاظت عصبی فعالیت ورزشی، می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر در کاهش عوارض مغزی ناشی از دیابت مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تمرین ورزشی، دیابت، نکروز، آپوپتوز

* نویسنده مسئول: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Email: shamsaeinabi@gmail.com

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

مقدمه

دیابت با عوارض نورولوژیکی مختلفی در سیستم عصبی همراه است و موجب تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های عصبی می‌شود. نوروپاتی، شایع‌ترین عارضه عصبی ناشی از دیابت است که علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن سیستم عصبی محیطی، منجر به تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی نیز می‌شود (۱). از این‌رو جلوگیری از ایجاد نوروپاتی و مرگ سلول‌های عصبی در بیماران دیابتی بسیار حائز اهمیت است.

آسیب بافتی ناشی از دیابت در نتیجه‌ی تعامل فرآیندهای پیچیده پاتوفیزیولوژیک مانند التهاب و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (۲). مرگ سلولی مرحله نهایی آسیب سلول است. نکروز به عنوان مهمترین مسیر مرگ سلولی پذیرفته شده است، ولی اخیراً محققین دریافته‌اند که آپوپتوز نیز می‌تواند به همان اندازه نکروز در مرگ سلولی نقش داشته باشد. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول، شکلی از مرگ سلولی است که طی چندین فرآیند پاتولوژیکی در ارگانیزم‌های چند سلولی رخ می‌دهد و باعث جایگزینی و حذف سلول‌های آسیب دیده و تغییر شکل ساختاری بافت در شرایط طبیعی می‌گردد (۳). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، می‌تواند منجر به بیماری شود که ممکن است ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد و منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی گردد. بالعکس افزایش غیرطبیعی مرگ سلولی نیز در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود (۴). برخلاف آپوپتوز، نکروز پدیده مرگ سلولی برنامه‌ریزی نشده است که توسط سازوکار پاتولوژیکی خاص در طی آسیب‌های شدید رخ می‌دهد. در نکروز هموستاز سلولی در نتیجه کاهش انرژی ناشی از آسیب شدید میتوکندری مختل شده و منجر به تورم سلولی، لیز غشایی، التهاب، آسیب عروقی و تشکیل ادم می‌شود. به علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی نکروزی با تخریب گسترده بافتی همراه است (۵). بررسی‌ها نشان داده است که آپوپتوز نورونی یکی از علل شناخته شده نوروپاتی محیطی و مرکزی است. شونل و همکاران (۲۰۰۲) عقیده دارند که پاتولوژی‌های سیستم عصبی مرکزی در دیابت با هیپرگلیسمی و فقدان انسولین در ارتباط است (۶). هیپرگلیسمی ناشی از دیابت نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت نوروپاتی دیابتی ایفا می‌کند (۷). هیپرگلیسمی از طریق تغییر در هموستاز کلسیم و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و استرس اکسیداتیو نقش عمده‌ای در القای دژنراسیون نورونی در بیماران دیابتی ایفا می‌کند (۸). استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله دیابت ممکن است نقش مهمی در ایجاد آپوپتوز در شرایط هیپرگلیسمی داشته باشد. در اثر عدم تعادل بین تولید ROS و عوامل آنتی‌اکسیدان که سبب حذف ROS می‌شوند، استرس اکسیداتیو به وجود می‌آید. گونه‌های فعال اکسیژن، می‌توانند منجر به پیشرفت استرس اکسیداتیو در بدن و در نتیجه مرگ نورونی گردند که موجب نوروپاتولوژی مرتبط با دیابت می‌شود (۹). مطالعات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی، که به دنبال فعالیت ورزشی رخ می‌دهد، دارای اثرات مفیدی در جلوگیری از عوارض عصبی ناشی از دیابت و آسیب‌های بافتی ایجاد شده در اثر استرس اکسیداتیو به دنبال این بیماری می‌باشد (۱۰).

از میان مناطق مختلف مغزی، هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین نواحی است که در مقابل عوامل آسیب‌رسان مانند ایسکمی، استرس و دیابت بسیار آسیب‌پذیر بوده و طی آن دستخوش تغییرات نوروفیزیولوژیکی، ساختاری و مولکولی خواهد شد (۱۱). پژوهش‌های متعددی وجود دارند که بیانگر تغییرات عملکردی مغز به ویژه در هیپوکامپ و نیز تغییرات محسوس در حافظه و یادگیری به دنبال دیابت می‌باشند (۱۲). هیپوکامپ به دو ناحیه تقسیم می‌شود: شکنج دندانه‌ای (DG) و کورنیوس آمونیس (CA). ناحیه CA هیپوکامپ به چهار ناحیه تقسیم می‌شود: CA1, CA2, CA3, CA4. به نظر می‌رسد که ناحیه CA1 حساس‌ترین ناحیه هیپوکامپ و اولین مکانی است که تحت تأثیر شرایط پاتولوژیکی از جمله دیابت قرار می‌گیرد (۱۳).

مطالعات گذشته اثرات مفید فعالیت ورزشی بر آسیب مغزی ناشی از نوروپاتی دیابتی را در مدل حیوانی نشان داده‌اند (۱۴). شواهد نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی جنبه‌های گوناگونی از فعالیت سلول‌های عصبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ممکن است از مرگ سلول‌های عصبی جلوگیری نماید (۱۵). نشان داده شده است که فعالیت ورزشی موجب بهبود عملکرد شناختی، حافظه و یادگیری، و همچنین کاهش اختلالات شناختی ناشی از آسیب‌های مغزی می‌شود (۱۶). اعتقاد بر این است که فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش مقاومت در

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

برابر استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (۱۷). به علاوه مشخص شده است که فعالیت ورزشی منظم در پیشگیری و به تأخیر انداختن دیابت غیر وابسته به انسولین، افزایش حساسیت به انسولین و بهبود متابولیسم گلوکز مؤثر است (۱۸). اخیراً مشخص شده است که فعالیت ورزشی ممکن است از اختلال در شکل-پذیری سیناپسی در هیپوکامپ موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین جلوگیری کند (۱۲). فعالیت ورزشی همچنین موجب تنظیم افزایشی تولید نوروپپتیدها و نوروتروفین‌ها، مانند نوروتنسین و عامل رشد عصبی مشتق از مغز (BDNF) در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود. این انتقال دهنده‌های عصبی در بقای سلول‌های عصبی، تمایز، اتصال و شکل‌پذیری سیناپسی درگیر هستند (۱۹). همچنین نشان داده شده است که تمرین ورزشی قبل از ایسکمی موجب کاهش نسبت بین پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و پروتئین‌های ضد آپوپتوزی (Bax/Bcl-2) و کاهش فعال‌سازی کاسپاز ۳ (کاسپاز نهایی مسیر آپوپتوز) در نورون‌های ناحیه هیپوکامپ می‌شود. این مسأله می‌تواند با کاهش مرگ نورون‌ها همراه باشد (۲۰). مکانیسم‌های محافظت نورونی ناشی از تمرین ورزشی در برابر نوروپاتی دیابتی به ویژه در ارتباط با مرگ نورون‌ها در ناحیه هیپوکامپ، هنوز بطور کامل شناخته نشده‌اند. بنابراین تحقیقات بیشتری نیاز است تا اثرات محافظت نورونی تمرین ورزشی در آسیب مغزی ناشی از نوروپاتی دیابتی مشخص شود. در مطالعه حاضر، اثر یک دوره تمرین ورزشی هوازی بر مرگ سلولی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکتمپ در موش‌های صحرایی نر دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

– **حیوانات و گروه‌های تجربی**: تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (با وزن ۳۰۰-۲۶۰ گرم) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در قفس‌های استاندارد و محیط کنترل شده (دمای ۲۴°c-۲۲، رطوبت ۵۰-۴۵٪، و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی)، با دسترسی آزاد به آب و غذا، در محل نگهداری حیوانات در دانشگاه علوم پزشکی ایران نگهداری شدند. رت‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه شم، گروه دیابت و گروه دیابت + تمرین (۷ سر موش در هر گروه). در گروه دیابت، حیوانات با تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) دیابتی شدند. در گروه دیابت + تمرین، حیوانات بعد از القاء دیابت، به مدت ۴ هفته روی تردمیل دویدند. به حیوانات گروه شم (که به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند) به جای STZ، نرمال سالین تزریق شد. تمام مراحل پژوهش در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت.

– **القای دیابت**: جهت القای دیابت نوع اول ، موش-های صحرایی بعد از بی‌هوشی با کتامین/ زایلازین (۴۰ میلی‌گرم / کیلوگرم، بصورت IP)، با تزریق داخل صفاقی یک دوز STZ به میزان ۶۰ ml/kg دیابتی شدند. برای تزریق، STZ در سرم فیزیولوژی حل شد. طبق این روش ۴۸ ساعت پس از تزریق، دیابت در رت‌ها ایجاد می‌شود. ملاک دیابتی شدن حیوان، قند خون ناشتای بالای mg/dl ۲۵۰ در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری قند خون، ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ، نمونه خون ناشتای حیوانات از سیاهرگ دمی گرفته شد و غلظت گلوکز سرم به کمک دستگاه کلوگوکارد صفر و یک اندازه‌گیری شد (۲۱).

– **پروتکل تمرین ورزشی هوازی**: یک هفته بعد از القای دیابت، رت‌ها در گروه مداخله ورزشی به مدت ۴ هفته و ۵ روز در هفته بر روی تردمیل (تردمیل ۴ کاناله، ساخت شرکت IITC آمریکا) تمرین هوازی انجام دادند. قبل از تمرینات اصلی و به منظور آشناسازی، رت‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۷-۵ متر در دقیقه با شیب صفر درجه برای ۲ روز متوالی روی تردمیل دویدند. ۲ روز پس از تمرینات آشناسازی، تمرینات اصلی آغاز شد و رت‌ها به مدت ۴ هفته به اجرای فعالیت روی تردمیل پرداختند. پروتکل تمرین در هفته اول با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در شیب صفر درجه اجرا شد. در هفته‌های بعد، سرعت و مدت زمان دویدن روی تردمیل به تدریج افزایش یافت به‌طوری که حیوانات در هفته دوم با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۸ متر در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه و در هفته آخر با سرعت ۱۸ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه روی تردمیل دویدند (۲۲، ۲۳).

– **آماده‌سازی بافت**: ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها بی‌هوش شدند و پرفیوژن ترانس‌کاردیاک با ۰/۹٪ سالین و به دنبال آن ۴٪ پارافرمالدهید در ۰/۱M بافر فسفات (pH ۷/۴) به عنوان فیکساتیو انجام شد (۲۴). سپس مغز رت‌ها به دقت برداشته شد و به مدت یک شبانه روز در فیکساتیو مشابه قرار گرفت. از مغزها بلوک‌های

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

پارافینه تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال با ضخامت ۷μm تهیه و برای رنگ‌آمیزی بر روی لام انتقال داده شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی‌متر پشت برگما تهیه شد.

– **رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (نیسل)**: رنگ‌آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود (۲۵). در این رنگ‌آمیزی سلول‌های سالم به صورت سلول‌های یوکروماتین دیده می‌شوند. برای رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌های ۷ میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده شدند. سپس طبق پروتکل مشخص و با استفاده از محلول کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد (سیگما، USA) رنگ‌آمیزی صورت گرفت. لام‌ها سپس خشک شده و با انتالن پوشانده شدند. سپس با استفاده از میکوسکوپ نوری (Olympus AX-70) و با بزرگنمایی ۴۰۰، از برش‌ها تصویر تهیه شد. بعد از تهیه تصاویر، با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی در امتداد خطی با طول ۴۰۰ میکرومتر (مساحتی حدود $۰/۱۶۰mm^2$) از ناحیه CA1 هیپوکامپ راست رت‌ها انجام شد. فقط سلول‌های نامنظم و تیره که هسته و هستک مشخص نداشتند به عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته و شمارش شدند.

– **رنگ‌آمیزی تانل**: تخریب DNA و مرگ سلولی آپوپتوزی با استفاده از روش TUNEL اندازه‌گیری شد (۲۶). رنگ‌آمیزی TUNEL با استفاده از کیت مخصوص (In Situ Cell Detection Kit, Roche, Germany) و بر طبق پروتکل انجام گرفت. کیت تانل قطعات DNA در سلول‌های آپوپتوزی (سلول‌های تانل مثبت) را به طور اختصاصی شناسایی می‌کند. برای رنگ-آمیزی TUNEL، برش‌های ۷ میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده شدند. سپس با استفاده از زایلن و درجات مختلف اتانل (جهت آب-دهی)، برش‌های بافتی دپارافینه شدند. برش‌ها پس از شستشو با PBS، جهت افزایش نفوذپذیری، در محلول Proteinase K 10mM در دمای ۳۷–۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس جهت بلوکه کردن Peroxidase اندوژن، لام‌ها در محلول H_2O_2 %3 در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از شستشو، انکوباسیون لام‌ها با مخلوطی از محلول‌های Label solution (450µl) و Enzyme solution (50µl) در ظرف مرطوب و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. لام‌ها بعد از شستشو با PBS، با محلول POD در ظرف مرطوب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی مجدد با PBS، لام‌ها با استفاده از محلول DAB به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت همه لام‌ها شسته شده و با هماتوکسیلین انکوبه شدند و پس از استفاده از درجات مختلف اتانل (جهت آب‌گیری) و زایلن (جهت شفاف‌سازی)، لام‌ها خشک شده و با انتالن پوشانده شدند. سپس با استفاده از میکوسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ از برش‌ها تصویر تهیه شد و با استفاده از نرم‌افزار تعداد سلول‌های تانل مثبت در مساحتی حدود $۰/۱۶۰mm^2$ شمارش شدند.

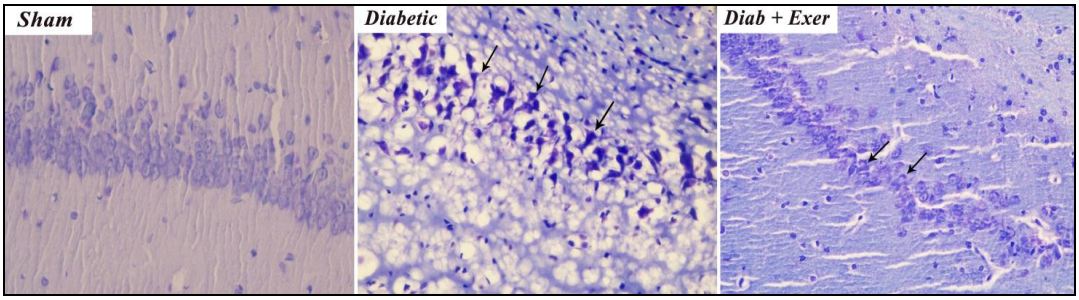
– **تجزیه و تحلیل آماری**: نتایج به دست آمده براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شدند. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی شفه استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p<0.05$ تعیین شد. همه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش

تمرین ورزشی مرگ سلولی نکروزی ناشی از دیابت را در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد.

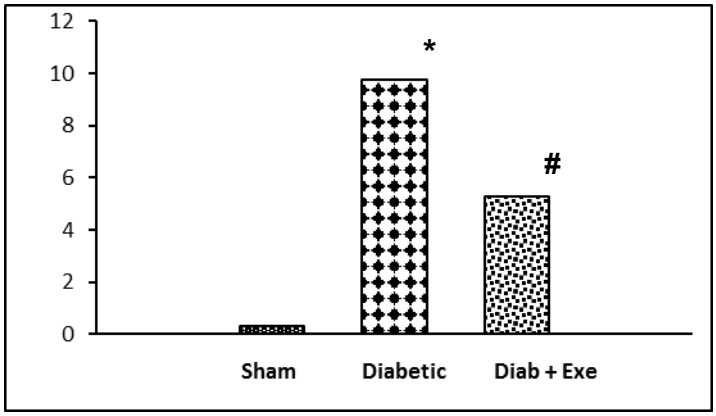
نتایج رنگ‌آمیزی نیسل نشان داد که، در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های دیابتی، سلول‌ها نامنظم و تیره بوده و هسته و هستک آنها مشخص نبود (شکل ۱).

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018



شکل ۱- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی نیسل در ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه‌های مختلف (فلش‌های سیاه، سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهند، بزرگنمایی x٤٠٠).

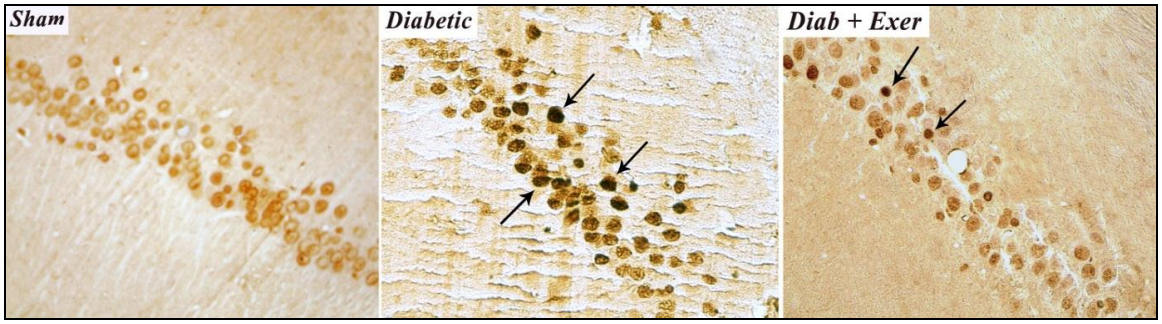
نتایج نشان داد که، القای دیابت موجب مرگ نکروزی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ رت‌ها شده است (۹/۷۸±۳/۸۷). تفاوت میزان مرگ سلولی نکروزی در گروه دیابت در مقایسه با گروه شم (۰/۳۲±۰/۲۱)، از نظر آماری معنی‌دار بود (**p**<۰/۰۰۱). در رت‌های گروه تمرین، میزان مرگ سلولی نکروزی (۵/۲۷±۲/۰۸) نسبت به موش‌های دیابتی گروه کنترل بدون تمرین، کاهش معنی‌داری داشت (**p**<۰/۰۱)، (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میانگین مرگ سلولی نکروزی در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف
*** وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (p<۰/۰۰۱)**
 # وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابت (p<۰/۰۱)

تمرین ورزشی آپوپتوز ناشی از دیابت را در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد.

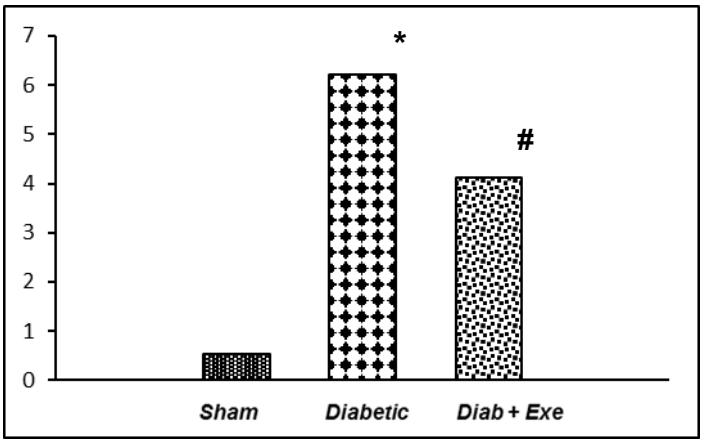
نتایج رنگ‌آمیزی TUNEL نشان داد که دیابت موجب مرگ آپوپتوزی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌ها خواهد شد (شکل ۲).



شکل ۲- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی TUNEL در ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه‌های مختلف (فلش‌های سیاه، سلول‌های آپوپتوزی که به شکل قهوه‌ای تیره هستند را نشان می‌دهند، بزرگنمایی x۴۰۰).

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

نتایج نشان داد که، القای دیابت موجب مرگ سلولی آپوپتوزی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ شده است (۶/۲۲±۳/۲۶). تفاوت تعداد نورون‌های آپوپتوزی در گروه دیابت در مقایسه با گروه شم (۰/۵۲±۰/۳۸)، از نظر آماری معنی‌دار بود (**p**<۰/۰۰۱). در موش‌های گروه تمرین، میزان آپوپتوز (۴/۱۳±۲/۱۶) نسبت به موش‌های دیابتی گروه کنترل بدون تمرین، کاهش معنی‌داری داشت (**p**<۰/۰۵)، (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه میانگین مرگ سلولی آپوپتوزی در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف
*** وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (p<۰/۰۰۱)**
 # وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابت (p<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

به منظور مطالعه اثرات محافظتی تمرین ورزشی بر نوروپاتی دیابتی، در این مطالعه اثر یک دوره تمرین ورزشی هوازی بر مرگ سلولی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل نشان داد که دیابت با مرگ سلولی نکروزی در نورون‌های ناحیه CA1 همراه است و تمرین ورزشی به طور قابل توجهی مرگ سلولی نکروزی ناشی از دیابت را در نورون‌های CA1 کاهش می‌دهد. به علاوه، دیابت موجب افزایش معناداری در میزان آپوپتوز نورون‌های ناحیه CA1 می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین ورزشی، آپوپتوز ناشی از دیابت در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ را به میزان معناداری کاهش می‌دهد. هم راستا با این تحقیق، کیم و همکاران (۲۰۱۳) و لی و همکاران (۲۰۰۵) نیز اثرات مفید تمرین استقامتی در کاهش آپوپتوز ناشی از دیابت را در نورون‌های شبکیه چشم و شکنج دندانه‌ای مغز گزارش کرده‌اند (۳، ۲۷).

این یافته‌ها نشان می‌دهد که تمرین ورزشی، با کاهش مرگ سلولی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ، می‌تواند عوارض عصبی ناشی از دیابت را کاهش دهد. مکانیسم‌های اساسی این اثرات محافظت نورونی تمرین ورزشی هنوز بطور کامل شناخته نشده است. مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی با ایجاد یک وضعیت محافظت نورونی درون‌زا و از طریق افزایش حساسیت به انسولین و کاهش ریسک فاکتورها موجب زنده ماندن نورون‌ها و حفاظت از آنها در برابر نوروپاتی دیابتی می‌شوند (۲۸، ۲۹).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی در زمینه قابلیت محافظت نورونی تمرین ورزشی می‌تواند ظرفیت مسدود کردن تشکیل رادیکال‌های آزاد باشد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری به عنوان یک محصول طبیعی تولید می‌شوند، اما زمانی که سطح آنها بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول باشد می‌توانند منجر به مرگ سلول شوند. استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن به شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است و می‌تواند مرگ سلولی را از طریق مسیرهای مختلف راه‌اندازی کند. از سوی دیگر، مغز دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بسیار پایینی است و بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع و کاتکولامین‌ها را دارد که به راحتی اکسید می‌شوند و مغز را در معرض آسیب‌های اکسایشی بیشتری قرار می‌دهند (۳۰). تمرین ورزشی منظم از طریق افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش عوارض دیابت از جمله کاهش مرگ نورون‌ها می‌شود (۲۹). آکسو و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که در نتیجه فعالیت بدنی سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

دیسموتاز (SOD) در نقاط مختلف مغز افزایش یافته و موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز می‌شود (۳۱).

عوامل سلولی- ملکولی از طریق پیام رسانی آبشاری با هم در ارتباط هستند. بدنبال محرک و استرس بیرونی این پیام دهی آبشاری بین سلولی اتفاق می افتد. یکی از عواملی که در پیام رسانی عوامل استرس زا و تحریکی نقش دارد پروتئین کیناز B است. پروتئین کیناز B عمل‌کننده اصلی در مسیر پیام رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز (PI3K) می‌باشد که در بسیاری از فرآیندهای سلولی، از جمله بقاء سلولی، متابولیسم، رشد و تکثیر سلول نقش دارد. گزارش شده است که افزایش بیان و فعالیت پروتئین کیناز B، از طریق فسفوریلاسیون پروتئین‌های ضد آپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 و غیرفعال‌سازی پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند Bax و یا از طریق مهار مستقیم فعالیت کاسپازی باعث مسدود کردن مسیرهای آپوپتوزی می‌گردد (۳). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که سطوح پروتئین کیناز B (Akt) در نمونه‌های حیوانی دیابتی کاهش می‌یابد (۳). به نظر می‌رسد که یکی دیگر از مکانیسم‌های محافظت نورونی تمرین ورزشی در برابر مرگ سلولی آپوپتوزی، با اثرات مفید آن در افزایش بیان پروتئین کیناز B (Akt) مرتبط است. نشان داده شده است که پروتئین کیناز B، با فعالیت ورزشی هوازی تنظیم افزایشی می‌شود (۳۲). همچنین، مشخص شده است که تمرین ورزشی در رت‌های دیابتی از طریق فسفوریلاسیون Akt، مقاومت به انسولین را در آن‌ها کاهش می‌دهد و باعث بهبود شکل‌پذیری سیناپسی می‌گردد (۳۳). وانگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که عوارض عصبی دیابت در نتیجه افزایش استرس اکسایشی ناشی از هیپرگلیسمی بروز می‌کنند (۳۴). مشخص شده است که فعال‌سازی پروتئین کیناز B در نتیجه تمرینات ورزشی باعث کاهش استرس اکسایشی و در نتیجه کاهش مرگ آپوپتوزی نورون‌ها می‌گردد (۳). بطور کلی، یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات محافظت نورونی تمرین ورزشی در مقابل مرگ سلولی آپوپتوزی در رت‌های دیابتی در این مطالعه، می‌تواند افزایش بیان و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز B و در نتیجه افزایش بیان و فسفوریلاسیون پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و مهار پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و کاهش فعالیت کاسپازی باشد.

همچنین، تمرین ورزشی از طریق تنظیم افزایشی پروتئین-های محافظتی حساس به استرس از قبیل فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-kB) و پروتئین‌های شوک گرمایی (HSP-90, HSP-70)، دارای پتانسلی برای کاهش آپوپتوز می-باشد (۳۵). افزایش در میزان پروتین‌های شوک گرمایی (HSPs) هیپوکامپ در نتیجه تمرین ورزشی می‌تواند یکی دیگر از جنبه‌های درمانی فعالیت ورزشی در بیماری دیابت باشد. به خوبی ثابت شده است که HSP ها نقش مهمی در محافظت و بازسازی بافت‌ها در برابر تعدادی از شرایط پاتوفیزیولوژیک از جمله دیابت دارند (۳۶). در سیستم عصبی، HSP ها به عنوان یک محافظ عمل می‌کنند و سلول‌های عصبی را در بسیاری از بیماری‌های تحلیل عصبی، در برابر مواردی مانند تجمع پروتئین‌های متراکم شده و سمیت ناشی از آنها، آپوپتوز و التهاب، محافظت می-کنند (۳۷). همچنین نشان داده شده است که HSP-72 می‌تواند در کاهش مقاومت انسولین و کاهش اختلالات عصبی ناشی از دیابت مشارکت داشته باشد (۳۸). تمرینات ورزشی استقامتی بیان HSP ها را افزایش داده و می‌تواند در برابر فشار اکسیداتیو محافظت بیشتری را فراهم نماید (۳۹).

اثرات مفید فعالیت ورزشی روی کاهش عوارض دیابت، می-تواند در بخشی به دلیل بهبود مارکرهای التهابی باشد. التهاب می‌تواند نقش مهمی را در پاتوژنز دیابت داشته باشد. سطوح سایتوکاین‌های پیش التهابی (IL-6، IL-1، TNFα) در افراد دیابتی افزایش می‌یابد (۴۰). این سایتوکاین‌ها نقش مهمی در التهاب سیستمیک دارند و افزایش سطوح آنها موجب افزایش مقاومت به انسولین خواهد شد (۴۱). یافته‌های مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فعالیت بدنی منظم، با افزایش سطوح سایتوکاین‌های ضدالتهابی نسبت به سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، می‌تواند باعث کاهش التهاب سیستمی و به دنبال آن بهبود حساسیت به انسولین شود (۴۲).

اثرات نوروپروتکتیو فعالیت ورزشی در بخشی دیگر ممکن است از طریق تنظیم افزایشی بیان نوروتروفین‌ها صورت گیرد. این پروتئین‌ها موجب افزایش نوروژنز شده و با فراهم کردن یک شبکه عصبی گسترده‌تر، موجب افزایش قابلیت احیا (رژنراسیون) سلول‌های عصبی می‌شوند. نشان داده شده است که سطوح ژنی فاکتور رشد مشتق‌شده از مغز (BDNF) و فاکتور رشد عصبی (NGF) پس از چند هفته ورزش مداوم، تنظیم افزایشی می‌شوند. تنظیم افزایشی این پروتئین‌ها پس از تمرین ورزشی با کاهش آسیب‌ها و اختلالات نورولوژیکی همراه خواهد بود (۲۸). علاوه بر آثار نوروپروتکتیو نوروتروفین‌ها، نشانه‌هایی وجود دارد که BDNF فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارد (۴۳). تنظیم افزایشی BDNF در اثر تمرین ورزشی، با افزایش فعالیت

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

آنتی‌اکسیدانی موجب حفاظت از نورون‌ها در برابر نوروپاتی دیابتی خواهد شد (۴۴).

بطور کلی، نتایج این مطالعه حاکی از آن است که تمرین ورزشی به طور قابل توجهی مرگ سلولی ناشی از دیابت را در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد. این مطالعه نشان داد که فعالیت ورزشی اثرات محافظتی را در برابر نوروپاتی دیابتی به دنبال خواهد شد. این مکانیسم‌های نوروپروتکتیو فعالیت ورزشی، یک دیدگاه درمانی نوین را فراهم می‌کند و می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر در کاهش عوارض مغزی ناشی از دیابت مورد توجه قرار گیرد.

References

1. Nathan D. Long term complications of diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 328:1676-85.
2. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke an integrated view. Trends Neurosci 1999; 22:391-7.
3.Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic Rats. Mol Med Rep 2013; 7:1745-50.
4.Wang S. Eldeiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. Oncogene 2003; 22:8628-33.
5.Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, Xu L, Xu YG. RNA interference mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. Acta Pharmacol Sin 2009; 30:919-27.
6.Schoenle EJ, Schoenle D, Molinari L, Largo RH. Impaired intellectual development in children with type1 diabetes association with HbA1C age at diagnosis and sex. Diabetologia 2002; 45:108-14.
7.Rahimi R. Diabetic neuropathy and oxidative stress. Diabetes Metab Res Rev 2006; 22:257-73.
8.Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocrinol Rev 2001; 5:599-622.
9. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β-cell dysfunction? Diabetes 2003; 52:1-8.
10.Muhammadi M, Salehi I, Farajnia SA. The effects swimming exerciser on oxidative stress in the hippocampus of male diabetic rats. J Tabriz Uni Med Sci 2009; 30:111-8.
11. Orlovsky MA, Spiga F, Lebed YV, Skibo GG. Early molecular events in the hippocampus of Rats with Streptozotocin-induced diabetes. Neuropsychology 2007; 6:435-8.
12. Reisi P, Alaei H, Babri S, Sharifi MR, Mohaddes G. Effects of treadmill running on spatial learning and memory in Streptozotocin induced diabetic rats. Neurosci Lett 2009; 455:79-83.
13.Mueller SG, Stables L, Du AT, Schuff N, Truran D, Cashdollar N, et al. Measurement of hippocampal subfields and age related changes with high resolution MRI at 4 T. Neurobiol Aging 2007; 28:719-26.
14. Alipour M, Salehi I, Ghadirisoufi F. Effect of exercise on diabetes-induced oxidative stress in the Rat hippocampus. Iran Red Cres Med J 2012; 14:222-8.
15. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the Rat. Neuroscience 1999; 89:1229-39.
16. Kim DH, Ko IG, Kim BK, Kim TW, Kim SE, Shin MS, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. Physiol Behav 2010; 101:660-5.
17.Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. Metab Brain Dis 2011; 26:291-7.
18. Derouich M, Boutayeb A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. J Biomech 2002; 35:911-7.
19. Kim BK, Shin MS, Kim CJ, Baek SB, Ko YC, Kim YP. Treadmill exercise

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

27. Lee HH, Shin MS, Kim YS, Yang HY, Chang HK, Lee TH, et al. Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage- induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocininduced hyperglycemic rats. J Diabetes Comp 2005; 19:339-46.
28. Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection associated with running is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? Neuroscience 2003; 118:335-45.
29. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes oxidative stress and physical exercise. J Sports Sci Med 2002; 1:1-14.
30. Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin induced diabetic Rats. Clin Chim Acta 2004; 340:107-15.
31. Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant antioxidant equilibriumin in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. Neurosci Lett 2009; 452:281-5.
32. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. Hindawi Publication. 2013; P.1-9.
33. Aguiar AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, et al. Short bouts of mild intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. Mech Age Dev 2011; 132:560-7.
34. Wang Q, Pfister F, Dornbeineke A, Vomhagen F, Lin J, Feng Y, et al. Low dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. Diabetologia 2010; 53:1227-38.
35. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. J Exe Rehabil 2013; 9:212-9.
36. Powers SK, Locke M, Demirel HA. Exercise heat shock proteins and myocardial protection from I-R injury. Med Sci Sports Exe 2001; 33:386-92.
37. Turturici G, Sconzo G, Geraci F. Hsp70 and Its Molecular role in nervous system improves short term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta induced Alzheimer disease Rats. J Exe Rehabil 2014; 10:2-8.
20. Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H, Nikbakht F. Pre ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. J Physiol Sci 2015; 65:435-43.
21. Ozkan Y, Yilmaz O, Ozturk AI, Erşan Y. Effects of triple antioxidant combination vitamin E, vitamin C and alpha lipoic acid with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. Cell Biol Int 2005; 29:754-60.
22. Ito D, Cao P, Kakihana T, Sato E, Suda C, Muroya Y, et al. Chronic running exercise alleviates early progression of nephropathy with upregulation of nitric oxide synthases and suppression of glycation in Zucker diabetic Rats. Plos One 2015; 17: 138037.
23. Rahmati M, Gharakhanlou R, Movahedin M, Mowla SJ, Khazani A, Fouladvand M, et al. Treadmill training modifies KIF5B motor protein in the STZ induced diabetic Rat spinal cord and sciatic nerve. Arch Iran Med 2015; 18:94-101.
24. Aboutaleb N, Kalalianmoghaddam H, Eftekhari S, Shahbazi A, Abbaspour H, Khaksari M. Apelin-13 inhibits apoptosis of cortical neurons following brain ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia. Int J Pep Res Ther 2014; 20:127-32.
25. Kiernan JA. Histological and histochemical methods. 3th ed. Oxford Butterworth Heinemann Publication.1999; P. 105-18.
26. Gheibi S, Aboutaleb N, Khaksari M, Kalalianmoghaddam H, Vakili A, Asadi Y, et al. Hydrogen sulfide protects the brain against ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia. J Mol Neurosci 2014; 54:264-70.

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

diseases. Biochem Res Int 2011; 2011:618127.
38. Hooper PL. Inflammation heat shock proteins and type 2 diabetes. Cell Stress Chap 2009; 14:113-5.
39. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereirasilva L, et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. Am J Physiol Reg Int Comp Physiol 2000; 279:1539-45.
40. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia 1997; 40:1286-92.
41. Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes mellitus. Diabet Res Clin Pract 2010; 88:171-6.
42. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, et al. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise cytokine kinetics. Exe Immunol Rev 2002; 8:6-48.
43. Tsai CY, Chan JY, Hsu KS, Chang AY, Chan SH. Brain derived neurotrophic factor ameliorates brain stem cardiovascular dysregulation during experimental temporal lobe status epilepticus. Plos One 2012;7:33527.
44. Cristy P, Mehmet AB, Malathi S, Ahmad S. Neuroprotective effects of physical activity on the brain a closer look at trophic factor signaling. Front Cell Neurosci 2014; 8:170.

[DOI: 10.29252/sjimu.25.1.1]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:18 IRST on Thursday December 13th 2018

The Effect of a Continuous Training on Necrosis and Apoptosis Changes in the Hippocampus of Diabetic Rats

Shamsaei N[1], Abdi H[2], Shamsi M[3]*

(Received: November 21, 2015 Accepted: December 26, 2015)

Abstract

Introduction: Diabetes is associated with different neurological disorders in the nervous system that will eventually lead to cell damage. The previous studies have shown the beneficial effects of exercise on brain damage caused by diabetic neuropathy in animal models. In the present study, the effect of aerobic exercise training on cell death in the hippocampal CA1 area neurons in diabetic male rats was investigated.

Materials & methods: 21 adult male Wistar rats (weighing 260-300 g) were purchased from Tehran Pasteur Institute and were randomly divided into three groups: sham group, diabetic group and diabetic + exercise training group (7 rats per group). Diabetes was induced intraperitoneally streptozotocin (STZ) administration at the dose of 60mg/kg. The diabetes criterion was the blood glucose level higher than 250 mg/dl. One week after induction of diabetes, the rats in exercise training group were trained to run on a treadmill 5 days a week for 4 weeks. Necrotic cell death was detected by Nissl staining and apoptosis was detected by TUNEL staining.

Findings: The results showed that aerobic exercise training significantly reduced the diabetes-induced necrotic cell death ($p<0.01$) and apoptosis ($p<0.05$) in the hippocampal CA1 area neurons.

Discussion & conclusions: This study showed that aerobic exercise training has neuroprotective effects against diabetic neuropathy. This neuroprotective mechanism of exercise can be an effective way to reduce cerebral complications of diabetes.

Keywords: Exercise training, Diabetes, Necrosis, Apoptosis

1. Dept of Physical Education and Sports Science, Faculty of Literature and Humanities, Ilam University, Ilam, Iran
2. Dept of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
** Correspondin author Email: shamsaeinabi@gmail.com*