

تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن RAGE و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر مبتلا به درد نوروپاتی دیابت

امید دستگردی^۱، احمد کاکي^{*}

چکیده

مقدمه: التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو نقش محوری در درد نوروپاتی دیابت دارند. هدف پژوهش حاضر تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن RAGE و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت است.

روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی نر و بیستار ۸ هفته‌ای (محدوده‌ی وزنی $20.4 \pm 11/3$ گرم) به‌طور تصادفی در پنج گروه (n = ۸) شامل: نوروپاتی دیابت (۵۰ mg/kg استرپتوزوسین تزریق درون صفاقی)، نوروپاتی دیابت ملاتونین (۱۰ mg/kg ملاتونین روزانه به‌مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابت تمرین (۳۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت ۱۵ متر در دقیقه، ۵ روز در هفته به‌مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین و کنترل سالم قرار گرفتند. پس از تأیید ایجاد نوروپاتی دیابت توسط تست‌های رفتاری، پروتکل تمرین و مصرف مکمل اجرا گردید. میزان بیان ژن RAGE با تکنیک ریل تایم و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت نخاع با روش اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید.

یافته‌ها: تمرین و ملاتونین موجب کاهش حساسیت سیستم عصبی به هایپراآلژیا حرارتی و آلودینیای مکانیکی گردید. تمرین هوازی به‌همراه ملاتونین باعث کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن RAGE و غلظت MDA و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT نسبت به گروه نوروپاتی دیابت شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی همراه با ملاتونین میزان بیان ژن RAGE و شاخص‌های استرس اکسیداتیو را تعدیل و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را بهبود بخشید. پیشنهاد می‌شود از تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش درد نوروپاتیک استفاده شود.

واژگان کلیدی: التهاب عصبی، RAGE، استرس اکسیداتیو، نوروپاتی محیطی دیابت

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

* **نشانی:** اهواز، بزرگراه گلستان، فرهنگ شهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، گروه فیزیولوژی ورزشی، کد پستی ۶۱۳۴۹-۳۷۳۳۳۳ صندوق

پستی ۱۹۱۵، نمابر: ۳۳۲۹۲۰۰، تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۶۰۳۹۴۳۹، پست الکترونیکی: ahvaz.kaki@yahoo.com

مقدمه

نوروپاتی محیطی دیابتی (DPN)^۱ به عنوان یکی از علل شایع ناتوانی در بیش از نیمی از بیماران دیابتی، پیشرفت کننده و برگشتناپذیر است که به دنبال تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی آکسونی، میلین زدایی، کاهش تارهای عصبی و کند شدن باسازی تارهای عصبی ایجاد می‌شود [۱]. در مرحله اولیهی پیدایش این عارضه، اختلال در اعصاب حسی رخ می‌دهد و علائمی همچون درد، بی حسی، مورمور شدن و ضعف در اندام‌های انتهایی ظاهر می‌شود. در این میان، درد یکی از ناراحت کننده‌ترین علائم نوروپاتی محیطی دیابتی است که با خصوصیتی نظیر هایپرآلژیا حرارتی و آلودینایی مکانیکی مشخص می‌شود [۱]. تحقیقات متعددی دو سازوکار اصلی درگیر در پاتوژنز درد نوروپاتیک دیابت از جمله، افزایش التهاب عصبی ناشی از فعالیت بیش از حد گلیاسل‌ها در سیستم عصبی در نتیجه اختلال متابولیسم گلوکز و همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و یا نقص در دفاع آنتی اکسیدانی را مطرح کرده‌اند [۲]. مطالعات نشان داده‌اند که در نتیجهی استرس ناشی از هایپرگلیسمی، گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها، تولید محصولات نهایی گلیاسیون پیشرفته (AGEs) را در سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد. AGEها، گیرنده‌ی خود را در سطح سلول، به نام RAGE را فعال می‌کنند. تعامل AGE-RAGE، موجب تنظیم مثبت عامل رونویسی فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB) در ژن هدف می‌شود. NF-κB، به عنوان یک فاکتور رونویسی حساس به سیستم اکسید و احیاء درون سلولی، نقش مهمی در تنظیم ژن‌های دخیل در پاسخ‌های سلولی از قبیل التهاب و آپوپتوز دارد [۳]. همچنین شواهد موجود نشان می‌دهد که فعال شدن گیرنده‌ی RAGE توسط لیگاندهای درون‌زا مربوط به عامل پاتوژن در نتیجه‌ی هایپرگلیسمی مزمن در سلول‌های گلیاسل سیستم عصبی، فشار اکسایشی را از طریق فعالیت اکسیدازی NADPH تحریک می‌کند. محققین بر این باورند که RAGE به عنوان رستپور مبدل سیگنال، مسیر پیام‌رسانی فرودستی را القاء

می‌کند که منجر به تولید سیتوکاین‌ها و شروع پاسخ‌های التهابی در سیستم عصبی می‌شود [۴]. مجموعه‌ی این فرآیندها اثر توکسیک بر ساختار و عملکرد نرون‌های حسی داشته و از این طریق در توسعه و حفظ درد نوروپاتیک دیابت اثر گذار است. مطالعات نشان داده‌اند که سطح گیرنده‌ی RAGE در DPN افزایش بیان شده و منجر به تولید درد و اختلالات هدایت عصبی و آتروفی آکسونی می‌گردد [۵]. بنابراین محققین به این نتیجه رسیده‌اند که مهارگیرنده RAGE و تعدیل در شاخص‌های استرس اکسیداتیو در DPN، ممکن است، از راهکارهای احتمالی مقابله با شرایط پاتوفیزیولوژیکی درد نوروپاتی دیابت باشد. بنابراین، بررسی گزینه‌های درمانی جدید با عملکرد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی که منجر به کاهش روند پیشرفت آسیب‌های نورونی شود، ضروری به نظر می‌رسد. ملاتونین یا (N-استیل ۵-متوکسی تریپتامین) یک آیدل آمین است که در غده‌ی پینه آل ترشح می‌شود. مهم‌ترین فعالیت‌های بیولوژیکی این هورمون، القاء کننده خواب، آنالژزی، آنتی اکسیدان قوی، حذف کننده‌ی طیف وسیعی از رادیکال‌های آزاد، دارای اثرات ضد التهابی، پیشگیری از آسیب میتوکندری و آپوپتوز در بدن است [۶]. تحقیقات نشان داده‌اند که ملاتونین با تنظیم مثبت بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از جمله؛ SOD، کاتالاز و GSH-Px و همچنین از طریق مهار مسیرهای التهابی بر درد نوروپاتیک دیابت اثر گذار است [۶]. از طرفی فعالیت ورزش به عنوان یک راهبرد غیردارویی به عنوان یک عامل ضد التهابی و آنتی اکسیدانی جهت کاهش عوارض ناشی از دیابت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تمرین هوازی با افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی، افزایش سطوح سایتوکین‌های ضد التهابی، کاهش فعالیت میکروگلیاهای نخاع و کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد توانسته است، سطوح نشانگرهای التهابی و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و از تخریب پیشرونده‌ی نرون‌های حسی جلوگیری کند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهد [۲]. با این حال بررسی سازوکار اثر تعاملی تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین به عنوان یک مداخله‌ی درمانی غیر دارویی و غیر تهاجمی بر درد نوروپاتی ناشی از

¹ Diabetic peripheral neuropathy

تمرینی هر هفته و نیز پایان دوره، قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد [۹].

تزریق ملاتونین: دو هفته پس از القای دیابت با تأیید درد نوروپاتیک دیابتی، همراه با شروع پروتکل تمرین هوازی، گروه‌های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین، جهت جلوگیری از ایجاد هایپراآلژی نوروپاتیک دیابتی، ماده‌ی ملاتونین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت درون صفاقی، حل شده در سالین حاوی اتانول، به‌طور روزانه و به‌مدت ۶ هفته تزریق گردید [۱۰].

آزمون‌های رفتاری

پیش از القاء دیابت، به‌منظور سازگاری جهت آزمون‌های رفتاری، حیوانات سه روز در معرض آزمایش (دو بار برای هر آزمون) قرار گرفتند. دو هفته پس از القای دیابت، آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک به‌عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و برای تأیید و میزان درد نوروپاتیک از تمامی گروه‌ها به‌عمل آمد [۱۱-۱۳]. به‌منظور بررسی اثرات طولانی مدت تمرین و تزریق ملاتونین هر هفته و تا پایان پروتکل تمرین هوازی و تزریق ملاتونین آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک اجرا شد، برای اجتناب از عوامل مداخله‌گر نظیر اثرات ضد دردی القاء شده توسط استرس آزمایش‌های رفتاری میان ساعت ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد [۱۳].

آزمون‌های پللیت: برای اندازه‌گیری تغییر آستانه‌ی درد حرارتی (هایپراآلژیای حرارتی) از آزمون‌های پللیت استفاده شد. این آزمون براساس روش والف و مکدونالد انجام گرفت [۱۴]. برای انجام این آزمون، از دستگاه‌های پللیت مدل ام اچ - ۹۵۰۰ ساخت شرکت برج صنعت آزما، که دارای یک صفحه‌ی فلزی به قطر ۱۹ سانتی‌متر و محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس (۳۰×۲۵×۲۵ سانتی‌متر) استفاده شد. دستگاه مجهز به زمان‌سنج و ترموستات بود. شدت درجه‌ی گرمایی صفحه‌ی دستگاه در 52 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. قبل از انجام آزمون، برای آشنایی، موش‌ها به‌مدت ۲ دقیقه بر روی صفحه‌ی دستگاه قرار گرفتند؛ سپس دستگاه روشن شد تا دمای صفحه‌ی دستگاه

دیابت در سطح سلولی کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از این‌رو، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر میزان بیان ژن RAGE و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی با درد نوروپاتی دیابت است.

روش‌ها

در پژوهش حاضر روش تحقیق از نوع تجربی بود. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفتگی با محدوده‌ی وزنی 20.4 ± 11.3 گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه و در گروه‌های چهارتایی در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد تحت چرخه‌ی ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی - روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه‌ی موش نگه‌داری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نورگردان و دستکاری، موش‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه ($n = 8$) نوروپاتی دیابت، نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین و سالم کنترل تقسیم شدند.

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 0.05 M با $\text{pH}: 4.5$ به 50 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌منظور ایجاد دیابت نوع یک صورت گرفت [۸، ۷]. به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات 0.05 M با $\text{pH}: 4.5$ به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانس بر روی ورید دم، یک قطره‌ی خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه‌ی آلمان) اندازه‌گیری و موش‌های صحرایی که قند خون آنها بیشتر از 250 mg/dl بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون، در طول دوره برنامه‌ی

مدت شش هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر پروتکل تمرین هوازی براساس مطالعه‌ی 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 دیابت تمرین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین در معرض تمرین نوارگردان، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند [۱۶]. 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.

استخراج نمونه و روش اندازه‌گیری: در پایان شش هفته برنامه‌ی تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، تحت شرایط استریل و مطابق روش Gelderd و چوپین سال ۱۹۷۷ [۱۷]، سریعاً قطعه‌ی نخاعی حاوی بخش خلفی نخاع از سطح L4 تا L6، که سگمنت‌های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه‌ی مهره‌های T13-L1 ستون فقرات است، ابتدا ناحیه‌ی مورد نظر مشخص گشت و با برش در پائین‌ترین بخش ممکن از ستون فقرات جدا شد. سپس ستون فقرات با استفاده از کانال مرکزی به‌عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه را به‌عنوان نمونه، در نیتروژن ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های ملکولی در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

به دمای مورد نظر ثابت شود. حیوان بر روی صفحه‌ی داغ قرار گرفت و هم‌زمان با آن، زمان سنج دستگاه روشن شد. زمانی که حیوان شروع به لیسیدن، بالا بردن و یا لرزیدن پا کرد، به‌عنوان نقطه‌ی پایانی و شاخص احساس درد تلقی شد و فوراً زمان سنج متوقف و حیوان از دستگاه خارج می‌شد. مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw withdrawal latency) و یا فاصله زمانی شروع قرار گرفتن حیوان بر روی صفحه داغ تا پیدایش پاسخ به درد توسط حیوان، در سه مرحله و به فاصله‌ی ۵ دقیقه در گروه‌های مختلف بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد. و میانگین آنها به‌عنوان زمان تأخیر ثبت گردید. زمان عدم واکنش حیوان به صفحه داغ ۳۰ ثانیه (Cut of time) در نظر گرفته شد.

آزمون آلودینای مکانیکی: به‌منظور اندازه‌گیری، حیوان روی یک شبکه‌ی سیمی و داخل یک محفظه‌ی پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه‌ی مشبک قرار گرفتند. در ادامه به منظور سنجش آلودینای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Frey در محدوده‌ی ۲ تا ۶۰ گرم (۶۰، ۲۶، ۱۵، ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲) ساخت شرکت Stoelting Inc جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع می‌شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به‌ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده می‌گردید. همچنین چنانچه دو بار متوالی پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به‌عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه^۲ (PWT) ثبت می‌شد و آزمون خاتمه می‌یافت. در مقابل، اگر حیوان به هیچ یک از تارها از جمله تار شماره‌ی ۶۰ پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه‌ی پاسخ در نظر گرفته می‌شد. هر آزمایش سه بار و به تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به‌عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه منظور گردید [۱۵].

پروتکل تمرین هوازی: پس از اطمینان از حصول نوروپاتی دیابت در موش‌های صحرایی نر، پروتکل تمرین هوازی به

² Paw withdrawal threshold

$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. همچنین برای ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو، بافت مربوطه، به‌وسیله ترازو دیجیتال سارتریوس مدل CPA224S با دقت هزارم میلی‌گرم، وزن کشتی و میزان ۵۰ mg جدا و پس از اضافه نمودن بافر فسفات سالین (PBS) حاوی آنتی پروتئاز سیگما به نسبت ۱:۱۰ با استفاده از هموژنایزر، هموژنه شده و پس از آن نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو؛ غلظت مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز توسط کیت‌های مخصوص شرکت زلیبو، ساخت کشور آلمان و به روش اسپکتروفتومتری^۵ و رنگ سنجی استفاده شد. **روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلو موگروف-اسمیرنوف استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنی‌داری، 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 معنی‌داری ۰/۵ ($P < 0.05$) انجام شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که وزن اولیه‌ی گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت ($P < 0.05$)، اما در هفته‌های پایانی پژوهش، میانگین تغییرات وزن موش‌های گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه کنترل سالم به‌صورت معناداری کمتر بود ($P < 0.05$). همچنین، میانگین تغییرات وزن گروه‌های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت اگرچه پس از شش هفته تمرین افزایش یافت، اما این افزایش معنادار نبود ($P < 0.05$) (جدول ۱).

ریل تایم^۳: حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت نخاع جهت استخراج RNA کل به نسبت ۱ به ۱۰ با استفاده از کیت QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول در دمای ۴ سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با محلول کلروفرم مخلوط و به‌مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت یک به نیم با محلول ایزوپروپانول مخلوط و به‌مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در محلول اتانول شستشو و در ۲۰ μ L آب RNase-free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد طبق شرکت (Eppendorf Germany-) و به نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تلخیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA تک رشته‌ای از پرایمر (Oligo dt MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و براساس پروتکل مربوطه انجام شد. از تکنیک RT-qPCR جهت تأیید بیان ژن RAGE به‌صورت کمی استفاده شد، هر واکنش PCR با استفاده از دستگاه (PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه (Applied Biosystems, ABI Step One Sequence Detection Systems. Foster City, CA) پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه‌ی آستانه (CT)^۴ مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول

³ Real Time-PCR

⁴ Threshold Cycle

⁵ Spectrophotometry

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

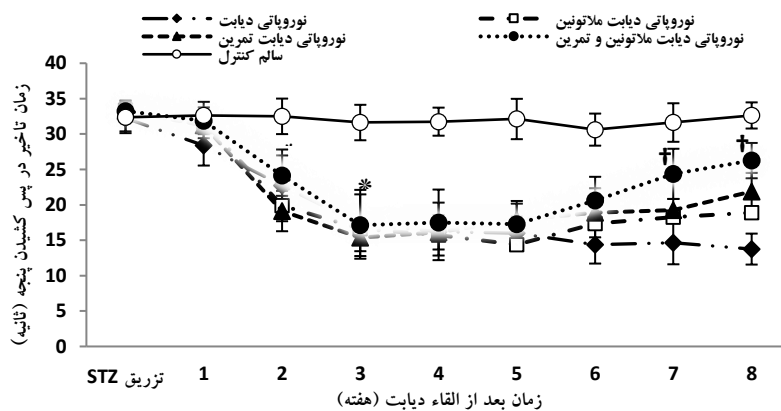
گروه‌ها					متغیر
کنترل سالم (n = ۸)	نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین (n = ۸)	نوروپاتی دیابت تمرین (n = ۸)	نوروپاتی دیابت ملاتونین (n = ۸)	نوروپاتی دیابت (n = ۸)	
۲۰۶/۸±۱۱/۴	۱۹۸/۸±۹/۱	۲۱۰/۶±۹/۶	۲۰۴/۶±۱۱/۵	۲۰۵/۴±۱۳/۱	القاء دیابت
۲۱۴/۶±۱۱/۱	۱۹۴/۵±۱۳/۵	۲۰۳/۳±۸/۷	۱۹۶/۱±۱۲/۲	۱۹۸/۰±۱۰/۲	هفته‌ی دوم
۲۲۹/۳±۹/۱	۱۸۴/۴±۷/۳	۱۸۷/۴±۶/۹	۱۸۵/۶±۱۲/۱	۱۸۵/۵±۱۰/۴	هفته‌ی چهارم
۲۴۲/۸±۸/۱	۱۶۸/۰±۷/۹*	۱۸۶/۰±۶/۴*	۱۸۸/۵±۱۱/۳*	۱۶۰/۱±۸/۱*	هفته‌ی ششم
۲۵۸/۵±۹/۸	۲۰۱/۸±۱۰/۹*	۲۱۰/۴±۹/۸*	۲۰۶/۴±۱۰/۷*	۱۴۱/۰±۷/۴*	هفته‌ی هشتم
۱۰۶/۸±۱۳/۸	۴۵۴/۵±۱۱۰/۸*	۴۹۵/۱±۷۱/۶*	۴۶۳/۹±۹۴/۲*	۴۲۱/۹±۱۱۳/۱*	القاء دیابت
۱۰۸/۱±۱۳/۸	۵۲۹/۳±۸۳/۱	۵۲۲/۴±۵۷/۹	۵۲۳/۶±۷۵/۱	۴۶۵/۴±۸۱/۱	هفته‌ی دوم
۱۰۲/۱±۱۴/۱	۴۹۵/۵±۹۴/۹	۵۲۲/۴±۳۴/۸	۵۱۹/۵±۶۷/۳	۵۱۵/۹±۶۱/۳	هفته‌ی چهارم
۱۰۱/۶±۱۳/۳	۴۰۳/۶±۵۶/۵	۴۳۴/۵±۵۵/۱	۴۶۹/۴±۶۱/۳	۵۶۳/۴±۴۱/۰	هفته‌ی ششم
۱۰۴/۳±۱۷/۷	۳۶۷/۹±۷۳/۹†	۳۵۵/۳±۶۰/۸†	۴۳۰/۹±۸۹/۲†	۶۰۱/۹±۲۴/۱†	هفته‌ی هشتم

کلیه‌ی مقادیر جدول به‌صورت انحراف استاندارد ± میانگین هستند. * اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

القاء دیابت در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<0.05). همچنین در هفته‌های پایانی اجرای پروتکل تمرین هوازی و مکمل ملاتونین، میانگین مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی در گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<0.05) (نمودار ۱).

پس از القاء دیابت، سطوح گلوکز خون به‌صورت معناداری در گروه‌های نوروپاتی دیابت افزایش یافت (P<0.05)، و این اختلاف تا پایان دوره‌ی پژوهش در مقایسه با گروه کنترل سالم همچنان معنی‌دار بود (P<0.05)، همچنین، در پایان‌برنامه تمرینی و مکمل‌دهی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به‌صورت معناداری پایین‌تر بود (P<0.05) (جدول ۱).

میانگین مدت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw withdrawal latency) در آزمون‌های پلید دو هفته پس از

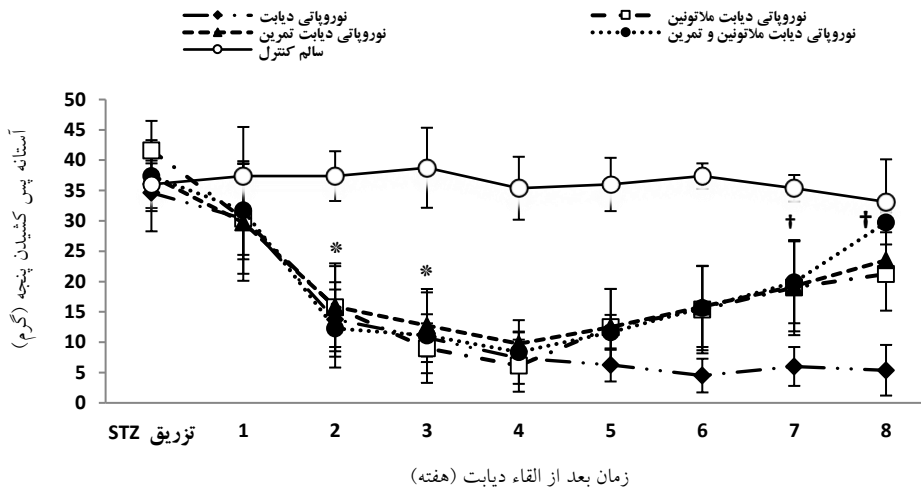


نمودار ۱- تغییرات زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی گروه‌های مختلف

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

پروتکل، میانگین تغییرات آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین افزایش معنی داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت داشتند ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

دو هفته بعد از القاء دیابت، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه های سالم به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). از طرفی در هفته های پایانی اجرای

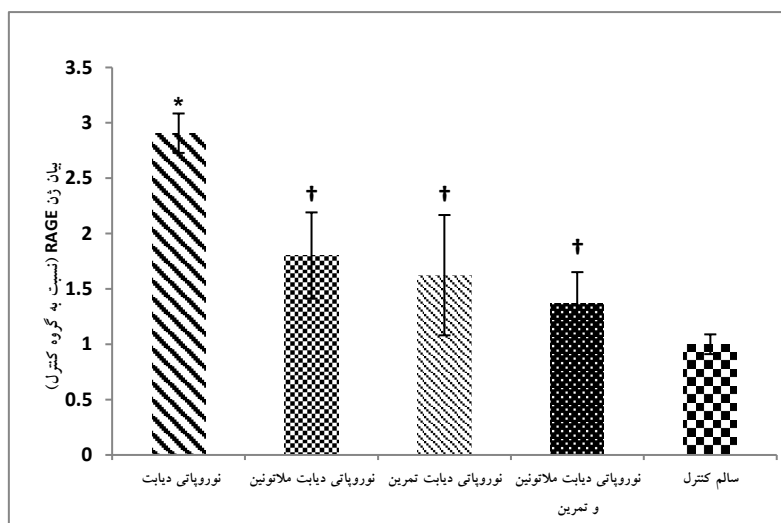


نمودار ۲- تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی گروه های مختلف

* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

ملاتونین، نوروپاتی تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین به طور معناداری نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی پائین تر بود ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

با توجه به میانگین گروه ها، مشخص شد که القاء دیابت موجب افزایش معنادار در میزان بیان ژن RAGE موش های نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه سالم کنترل شد ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان ژن RAGE در گروه های نوروپاتی دیابت

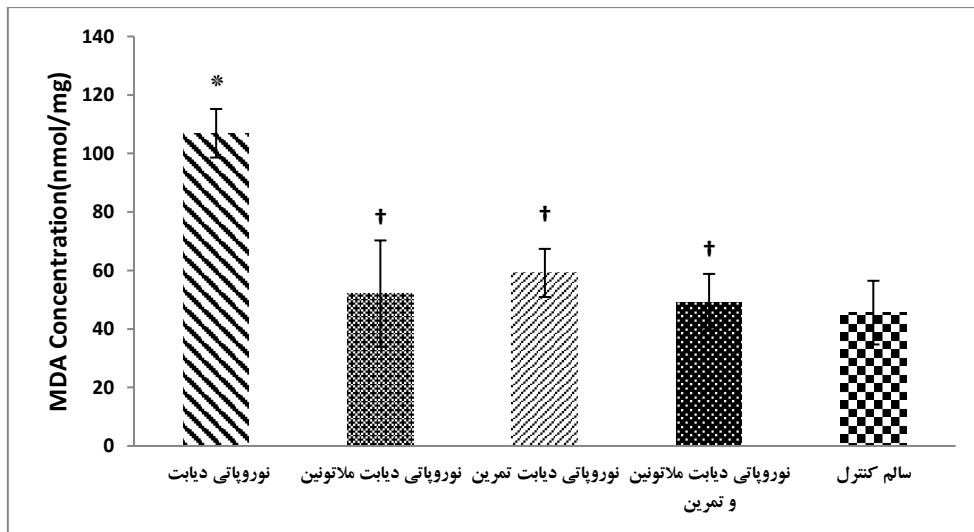


نمودار ۳- میزان بیان ژن RAGE در بخش خلفی نخاع گروه های مختلف

* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

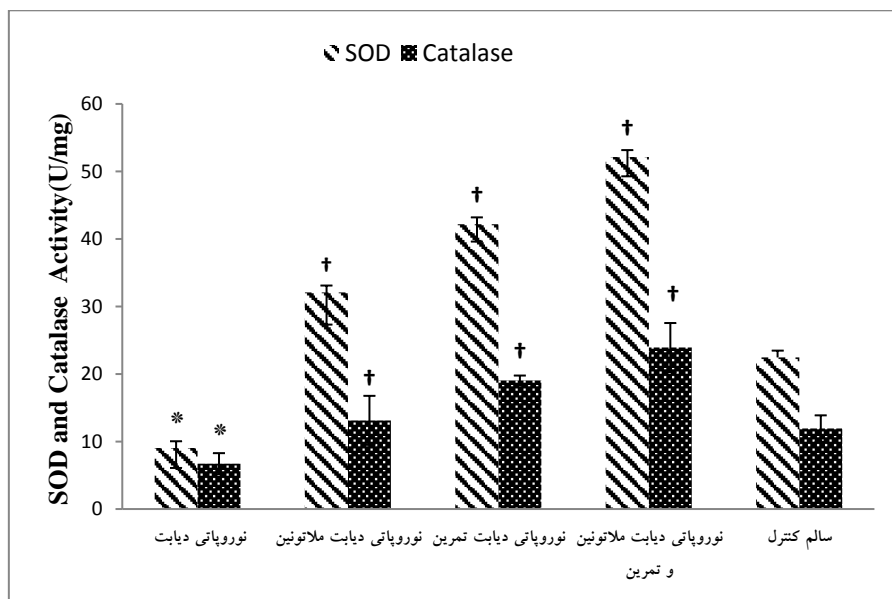
میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). همچنین افزایش معنی داری در بین گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۵)

افزایش معنی داری در میزان غلظت محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدهید در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین کاهش معنی داری در گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به با گروه نوروپاتی دیابت وجود داشت ($P < 0.05$) (نمودار ۴).



نمودار ۴- میزان غلظت مالون دی آلدهید در بخش خلفی نخاع گروه های مختلف

* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).



نمودار ۵- میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه های مختلف

* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ($P < 0.05$). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی پتانسیل درمانی فعالیت هورزی به همراه مصرف ملاتونین برونزا در برابر آسیب‌های عصبی ناشی از التهاب و استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی استریتوزوسین باعث تخریب سلول‌های بتای پانکراس و هایپر گلیسمی مزمن در موش‌های صحرایی می‌شود به طوری که سطوح گلوکز خون در گروه‌های دیابتی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود. همچنین نتایج نشان داد که دو هفته بعد از تزریق STZ، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرآلژیا حرارتی) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش یافته بود. تحقیقات متعددی این موضوع را مورد تأیید و نشان داده‌اند که افزایش حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا در اندام‌های محیطی، نشان بر اختلال عملکرد ساختار فیبرهای حسی شامل آتروفی آکسونی و یا میلین زدایی در نتیجه‌ی هایپرگلیسمی مزمن است [۱۸، ۱۹]. اگرچه سازوکارهایی که منجر به این گونه اختلالات عصبی در دیابت می‌شوند به طور کامل درک نشده‌اند، با این وجود در طی سال‌های گذشته، آزمایش‌های حیوانی و مطالعات *In Vitro* مسیرهای بیوشیمیایی احتمالی مهمی در توسعه‌ی درد نوروپاتیک دیابتی شناسایی کرده‌اند [۱۹]. مدارک اخیر حاکی از آن است که التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو مرتبط با مسمومیت گلوکز دو عامل اصلی و محوری در انحطاط آکسونی و تغییر ساختار غلاف میلین هستند [۲۰]. پژوهشگران این روند را در نتیجه‌ی تغییر در عروق خونی تأمین کننده‌ی اعصاب محیطی، شامل افزایش انقباض پذیری سلول‌های اندوتلیال عروقی و کاهش نفوذپذیری مویرگی و در نتیجه‌ی ایسکمی نورونی ناشی از کاهش جریان خون عروقی می‌دانند [۲۱]. پژوهش‌های ملکولی که بر اختلال در مسیرهای متابولیکی گلوکز متمرکز شده‌اند نشان داده‌اند که با افزایش قند خون، محصولات نهایی گلاسیون پیشرفته (AGEs) در سیستم عصبی تجمع می‌یابند، AGEs رسپتور

RAGE را در سطح سلول فعال کرده، تعامل AGE-RAGE موجب تنظیم مثبت فاکتور رونویسی NF- κ B در ژن هدف شده و در نتیجه‌ی آن تولید سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها و شروع پاسخ‌های التهابی در سیستم عصبی افزایش می‌یابد [۲۳، ۲۲]. شواهد زیادی حاکی از آن است که این گیرنده به‌عنوان وساطت کننده‌ی پاسخ‌های التهابی نقش مهمی در پاتوژنز درد نوروپاتی دیابت دارد [۲۴، ۲۵]. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر این موضوع را مورد تأیید قرار داد و نشان داد که افزایش بیان ژن RAGE در نورون‌های حسی بخش خلفی نخاع در موش‌های نوروپاتی دیابت بیشتر از گروه کنترل سالم بود. از طرفی نشان داده شده است که در نوروپاتی دیابت، افزایش سطوح گیرنده RAGE از طریق بیان عامل رونویسی NF- κ B یک شرایط التهابی در سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های شوان و همچنین نورون‌ها ایجاد و موجب تجزیه‌ی میلین و آسیب اکسایشی سلول‌های عصبی می‌شود [۲۶]. همچنین پژوهش‌ها نشان داده‌اند که AGE-RAGE تولید ROS را بالا برده و فشار استرس اکسیداتیو را از طریق سازوکار NADPH افزایش می‌دهد [۵]. تحقیق حاضر این موضوع را مورد تأیید قرار داد و نشان داد که گروه‌های نوروپاتی دیابت، میزان غلظت مالون دی آلدید را افزایش و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را در بافت نخاع نسب به گروه کنترل سالم کاهش یافته بود. بنابراین با وجود اینکه التهاب و استرس اکسیداتیو نقش برجسته‌ای در رخداد بیماری‌های عصبی دارند ولی هنوز درمانی ایمن و کارآمد برای کنترل این عوامل پاتولوژیکی تنظیم نشده است. لذا ترکیباتی که بتوانند از بیان ژن‌های دخیل در التهاب و استرس اکسیداتیو جلوگیری به‌عمل آورند، به‌عنوان راهکار درمانی به‌کار گرفته می‌شوند. ملاتونین یک مولکول لیپوفیلی است که توسط غده‌ی صنوبری ترشح می‌شود و تقریباً در تمامی بافت‌ها ترشح آن تشخیص داده شده است که نشان دهنده‌ی اهمیت آن در بدن انسان است [۲۷]. مطالعات اثرات محافظتی ملاتونین را در طی شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از جمله تنظیم سیستم ایمنی، ضد التهابی و به‌عنوان آنتی اکسیدان قوی به خوبی به اثبات رسانده‌اند [۲۸]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که

ملاتونین اختلال عملکرد سیناپسی، ROS، استرس اکسیداتیو، التهاب عصبی و باسازی سلول‌های عصبی را از طرق مسیر سیگنالینگ RAGE/NF- κ B/JNK کاهش می‌دهد [۲۹، ۳۰]. مطالعات نشان داده اند که سازوکارهای محافظتی ملاتونین در برابر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو شامل مهار مستقیم رادیکال‌ها و محصولات رادیکالی، القاء بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش فعال‌سازی آنزیم‌های پراکسیداسیون و حفظ هموستاز میتوکندری است [۳۱]. از طرفی نشان داده شده است که ملاتونین از مسیرهای دیگری از جمله مهار سیکلو‌اکسیژنازاها و مهار تولید رادیکال‌های آزاد باعث سرکوب التهاب در سیستم عصبی شده و از این طریق در کاهش درد های نوروپاتیکی دخالت می‌کند [۶، ۳۱]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، گروه نوروپاتی دیابتی که ملاتونین مصرف کرده بودند، کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن RAGE و غلظت MAD و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT نسبت به گروه نوروپاتی دیابت داشتند. از طرفی برخی معتقدند که فعالیت‌های ورزشی ممکن است به‌عنوان راهبرد موثر درمانی غیردارویی برای تعدیل عوامل التهابی و استرس اکسیداتیو نقش داشته باشند [۳۲]. نتیجه‌ی تحقیق حاضر نشان داد که شش هفته تمرین هوازی، میزان بیان ژن RAGE در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابت تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی کمتر بود. همچنین در این مطالعه، کاهش معنی‌داری در غلظت مالون آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت دیده شد. از طرفی نتایج آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیکی نشان داد که تمرین هوازی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش زمان تأخیر در عقب کشیدن پا در هایپرآلژیای حرارتی و افزایش آستانه‌ی پاسخ به آلودینیای مکانیکی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که تمرین هوازی به تنهایی و به همراه مصرف مکمل ملاتونین پتانسیل درمانی مؤثر در مقابل درد نوروپاتی ناشی از دیابت از طرق سرکوب التهاب با کاهش بیان ژن RAGE، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی غشای سلول‌های عصبی باشد. در ارتباط با شناسایی

سازوکارهای درگیر در اثرات تجویز فعالیت‌های هوازی به همرا مصرف مکمل ملاتونین بر کاهش بیان ژن گیرنده‌ی التهابی RAGE و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در نخاع موش‌های مدل درد نوروپاتی دیابت و بهبود عملکرد نورو ن‌های حسی و کاهش درد نوروپاتی می‌توان استدلال کرد که تمرین هوازی و ملاتونین با افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی [۳۳]، افزایش سطوح سایتوکین‌های ضد التهابی و کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد توانسته‌اند، سطوح نشانگرهای التهابی را کاهش دهند و از تخریب پیشرونده‌ی نرون‌های حسی جلوگیری کنند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهند [۲]. از طرفی، فعالیت ورزشی و همچنین ملاتونین ظرفیت سازوکارهای دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی را بالا می‌برد [۳۴]، بنابراین این احتمال وجود دارد که فعالیت هوازی و ملاتونین برونزا به‌واسطه‌ی فعال کردن فاکتور رونویسی NRF2، تولید پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان را تنظیم مثبت و از این طریق سطوح لیگاندهای AGEs و HMGB1 گیرنده‌ی RAGE را مهار کنند [۳۵]. شواهد گواه بر این است که سطوح گیرنده RAGE توسط سایتوکین‌های ضد التهابی IL-10 تعدیل می‌شود [۳۶]. از طرفی غلظت گردش خون سایتوکین‌های ضد التهابی بعد از ورزش افزایش می‌یابد به‌طوری که گزارش شده فعالیت‌های هوازی غلظت IL-10 به‌عنوان یک مهار کننده‌ی طبیعی مسیر سیگنالینگ NF- κ B افزایش می‌دهند [۳۷]. محققین بر این باورند که سایتوکین ضد التهابی IL-10 تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی و مهارکننده میانجی‌های التهابی نظیر سایتوکین‌های پیش التهابی است [۳۸]. از طرفی شواهد حاکی از آن است که هایپرگلیسمی باعث کاهش سطوح HSP ها می‌گردد [۳۹]. کاهش سطوح HSPها باعث افزایش فعال شدن سایتوکین های التهابی می‌شود [۳۹]. Tang و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش سطح HSP70 و منجر به مهار فعال‌سازی P38MAPK می‌شود [۴۰]. بنابراین به‌نظر می‌رسد که فعالیت‌های هوازی از طریق افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی باعث مهار گیرنده‌ی RAGE و کاهش سطوح سایتوکین‌های التهابی شود. با این وجود پیشنهاد

نوسیسپتورها به عوامل دردزا که در نتیجه تخریب پیشرونده‌ی نرون‌های حسی رخ می‌دهد را بهبود بخشیدند. لذا به نظر می‌رسد، کاهش میزان بیان ژن RAGE می‌تواند یک پاسخ جبرانی برای کاهش سطح سایتوکین‌های پیش‌التهابی باشد و تمرین هوازی با مصرف مکمل ملاتونین به‌عنوان راهبردی مؤثر برای تعدیل این تغییرات و درد نوروپاتیکی دیابتی ناشی از این عوامل باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که از تمرین استقامتی به شکل هوازی با شدت متوسط و همراه با مصرف مکمل ملاتونین برای بیماران دیابتی به‌منظور کاهش درد نوروپاتیکی به‌کار گرفته شود.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر برگرفته از یافته‌های پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد آقای امید دستگردی دانشجوی رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی گرایش تغذیه ورزشی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز است. کلیه‌ی هزینه‌های این طرح شخصی تأمین شده است.

می‌شود در پژوهش‌های آتی، همراه با اندازه‌گیری گیرنده‌ی التهابی RAGE و شاخص‌های استرس اکسیداتیو، برای دستیابی به شرایط قطعی‌تر، سطوح لیگاند‌های فعال‌کننده‌ی این رسپتور، فاکتور رونویسی NF- κ B و سایتوکین‌های پیش‌التهابی که در مسیر پیام‌رسانی این گیرنده قرار دارند و همچنین عوامل مهارکننده این گیرنده همانند سطوح سایتوکین‌های ضد‌التهابی، پروتئین‌های شوک گرمایی را مورد بررسی قرار دهند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که گیرنده‌ی التهابی RAGE در نوروپاتی محیطی دیابتی دچار افزایش بیان شده و شرایط التهابی را به‌وجود می‌آورد. تصور بر این است که از عوامل احتمالی درگیر در درد نوروپاتیکی دیابتی، افزایش در شاخص‌های التهابی و استرس اکسیداتیو باشد. از سوی دیگر تمرین هوازی به تنهایی و به همراه مصرف مکمل ملاتونین میزان بیان ژن RAGE و شاخص‌های استرس اکسیداتیو را در بخش خلفی نخاع کاهش دادند و همچنین حساسیت

مآخذ

- Feldman EL, et al. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron* 2017; 93(6):1296-1313.
- Mee-Inta O, Zhao ZW, and Kuo YM. Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation. *Cells* 2019; (7)8:691.
- Juranek JK, et al. RAGE deficiency improves postinjury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice. *Diabetes* 2013; 62(3):931-943.
- Hosseini A, and Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013.
- Sandireddy R, et al. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *International journal of endocrinology* 2014.
- Negi G, Kumar A, and Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *Journal of pineal research*, 2011. 50(2): p. 124-131.
- Yan Je, et al. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. *Neuroscience letters* 2012; 526(1):54-58.
- Morrow TJ. *Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model*. Current protocols in neuroscience, 2004. 29(1):9.18. 1-9.18. 11.
- Wei M, et al., The streptozotocin- diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung & Circulation* 2003; 12(1):44-50.
- Zangiabadi N, et al. Effects of melatonin in prevention of neuropathy in STZ-induced diabetic rats. *American Journal of pharmacology and toxicology* 2011; 6(2):59-67.
- Malmberg, A.B. and A.W. Bannon, 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.
- Chen YW, et al. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesthesia & Analgesia* 2013. 116(2):482-490.
- Yoon H, et al. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Experimental neurology* 2015. 267:107-114.
- Rossi DM, Valenti VE, and Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in

- streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clinics* 2011; 66(9): 1615-1619.
15. Gong YH, et al., Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2011; 49(1): p. 16-20.
 16. Chae, CH, et al. 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): 235-241.
 17. Gelderd JB, and Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *The Anatomical Record* 1977;188(1):45-47.
 18. Kishore, L., N. Kaur, and R. Singh, Effect of Kaempferol isolated from seeds of *Eruca sativa* on changes of pain sensitivity in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology* 2018; 26(4): 993-1003.
 19. Bestall SM, et al. Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1–RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *Journal of cell science* 2018; 131(14).
 20. Wilson N; and Wright D. Inflammatory mediators in diabetic neuropathy. *J Diabetes Metab* 2011. 5(004).
 21. Shi X, et al. Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation* 2013; 10(1): 1-9.
 22. Li X, et al. Enhanced RAGE expression in the dorsal root ganglion may contribute to neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Pain Medicine* 2016; 17(5): 803-812.
 23. Tobon-Velasco C; Cuevas JE, and Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-kB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 2014; 13(9): 1615-1626.
 24. Lam D, et al. RAGE-dependent potentiation of TRPV1 currents in sensory neurons exposed to high glucose. *PLoS One* 2018; 13(2):e0193312.
 25. Le Bagge S, et al. Targeting the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in type 1 diabetes. *Medicinal Research Reviews*, 2020.
 26. Sugimoto K, Yasujima M, and Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current pharmaceutical design* 2008; 14(10):953-961.
 27. Zhang HM. and Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of pineal research* 2014. 57(2):131-146.
 28. Mok JX, et al. A new prospective on the role of melatonin in diabetes and its complications. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2019; 40(1).
 29. Muhammad T, et al. Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2019; 14(2):278-294.
 30. Jin H, et al. Melatonin protects endothelial progenitor cells against AGE-induced apoptosis via autophagy flux stimulation and promotes wound healing in diabetic mice. *Experimental & molecular medicine* 2018; 50(11):1-15.
 31. Metwally MM, Ebraheim LL, and Galal AA. Potential therapeutic role of melatonin on STZ-induced diabetic central neuropathy: A biochemical, histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta histochemica*, 2018. 120(8):828-836.
 32. Safakhah HA, et al. Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation. *Journal of Pain Research* 2017. 10:1457.
 33. Khadir A, et al. Physical exercise enhanced heat shock protein 60 expression and attenuated inflammation in the adipose tissue of human diabetic obese. *Frontiers in endocrinology* 2018. 9:16.
 34. Petersen AMW. and Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology* 2005. 98(4):1154-1162.
 35. Ali T, et al. Melatonin attenuates D- galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *Journal of pineal research* 201; 58(1): p. 71-85.
 36. Noto MJ, et al. RAGE-mediated suppression of interleukin-10 results in enhanced mortality in a murine model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Infection and immunity* 2017; 85(3)
 37. Ortega E. The “bioregulatory effect of exercise” on the innate/inflammatory responses. *Journal of physiology and biochemistry*, 2016; 72(2):361-369.
 38. Ip WE, et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* 2017; 356(6337):513-519.
 39. Hirsch GE, and Heck TG. Inflammation, oxidative stress and altered heat shock response in type 2 diabetes: the basis for new pharmacological and non-pharmacological interventions. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2019; p.1-15.
 40. Tang D. 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):7376-7384.

THE EFFECT OF AEROBIC EXERCISE WITH MELATONIN ON RAGE GENE EXPRESSION AND SOME INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS IN MALE RATS WITH DIABETIC NEUROPATHIC PAIN

Omid Dastgerdi¹, Ahmad Kaki^{2*}

1. Department of physical education, Ahvaz branch, Islamic Azad university, Ahvaz, Iran

ABSTRACT

Background: Neuroinflammation and oxidative stress play a pivotal role in the diabetic neuropathic pain. The aim of this study was to evaluate the effect of aerobic exercise with melatonin on RAGE gene expression and some indicators of oxidative stress in rats with diabetic neuropathic pain

Methods: Forty 8-week-old male Wistar rats (weight range 204 ± 11.3 g) were randomly divided into five of 8 groups including: diabetic neuropathy (50 mg / kg streptozotocin intraperitoneal injection), diabetic melatonin neuropathy (mg / kg 10 melatonin daily for 6 weeks), diabetic neuropathy exercise (30 minutes of aerobic exercise at 15 meters per minute, 5 days a week for 6 weeks), diabetes melatonin neuropathy and healthy exercise and control. After confirmation of diabetic neuropathy by behavioral tests, exercise protocol and supplementation were performed. RAGE gene expression was measured by real-time technique and oxidative stress indices in spinal cord tissue by spectrophotometer. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis.

Results: Exercise and melatonin reduced the sensitivity of the nervous system to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Aerobic exercise with melatonin significantly reduced RAGE gene expression and MAD concentration and increased the activity of SOD and CAT enzymes compared to the diabetic neuropathy group ($P < 0.05$).

Conclusion: Aerobic exercise with melatonin modulates the expression of RAGE gene and oxidative stress indices and improves the sensitivity of nociceptors to pain factors. It is recommended to use aerobic exercise with melatonin for diabetics to reduce neuropathic pain.

Keywords: Neuroinflammation, RAGE, Oxidative stress, Diabetic peripheral neuropathy

* Department of Sports Physiology, Islamic Azad University, Ahvaz Branch, Golestan Highway, Farhang Shahr, Ahvaz, Iran. Postal Code 61349-373333, PO Box 1915, Fax: 3329200, Phone: 00989166039439, Email: ahvaz.kaki@yahoo.com