(مقاله پژوهشی)

تاثیر تمرین هوازی بر میزان بیان ژن گیرنده شبه تول ۴ و میانجی‌های التهابی در بخش حسی نخاع موش های صحرایی نر دارای درد نوروپاتی دیابت

احمد کاکی[۱]، مسعود نیکبخت[۲*]، عبدالحمید حبیبی[۳]، هادی فتحی مقدم[۴]

۱-دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی.
۲-دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی.
۳-استاد گروه فیزیولوژی ورزشی.
۴-استاد گروه فیزیولوژی پزشکی.

۱و۲و۳-گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۴-گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
مسعود نیکبخت؛ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۰۶۰۰۳۶۹۶
Email: nikbakht7@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بیان TLR4 در سیستم عصبی، از عوامل پاتوفیزیولوژیکی نوروپاتی محیطی دیابت است. هدف این مطالعه بررسی تاثیر تمرین هوازی بر بیان ژنTLR4 و میانجی‌های التهابی در بخش حسی نخاع موش های صحرایی نر دارای درد نوروپاتی دیابت بود.

روش بررسی: ۴۰ سر موش صحرایی نر ۸ هفته‌ای(محدوده وزنی۱۰/۲±۲۲۰ گرم) در چهار گروه نوروپاتی دیابتی، نوروپاتی دیابتی تمرین، کنترل سالم تمرین و کنترل سالم قرار گرفتند. دیابت با تزریقSTZ(۵۰ mg/kg) ایجاد شد. پس از تایید ایجاد نوروپاتی دیابت توسط تست‌های رفتاری، گروه‌های تمرین، ۶ هفته تمرین هوازی تداومی با شدت متوسط ۱۵متر در دقیقه برای۳۰ دقیقه روی تردمیل اجرا کردند. میزان بیان ژن-های TLR4 ، TNF-α و IL-1β در نرون‌های حسی L4-L6 نخاع با تکنیک ریل تایم اندازه‌گیری شد. آزمون آنالیز واریانس دو راهه و آزمون تعقیبی LSD برای تحلیل آماری استفاده گردید.

یافته‌ها: بیان ژن‌هایTLR4، TNF-α و IL-1β در بخش حسی نخاع گروه نوروپاتی دیابت تمرین به طور معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت کمتر بود ($P<0.05$). همچنین بین گروه‌های سالم کنترل و نوروپاتی دیابت تفاوت معنی‌داری بود و بیان ژن در گروه نوروپاتی دیابت افزایش یافت($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی می‌تواند میزان بیان ژن TLR4 و نشانه‌گرهای التهابی را در بخش حسی نخاع کاهش دهد و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا که در نتیجه تخریب پیشرونده نرون‌های حسی در اثر دیابت رخ می‌دهد را بهبود بخشد. 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، TLR4 ، میانجی‌های التهابی، نوروپاتی محیطی دیابت.

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۹/۲۶ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹

مقدمه

نوروپاتی محیطی دیابتی(DPN) یکی از عوارض ناشی از دیابت می‌باشد. تقریباً بیش از نیمی از تمام بیماران دیابتی مبتلا به این نوع عارضه می‌شوند که به طور قابل توجهی، کیفیت زندگی آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۱, ۲) DPN با علائم آشکاری چون درد، بی‌حسی، مورمور شدن و ضعف که معمولاً در دست و یا پا تجربه می‌شود، مشخص می‌گردد(۳). محققین بر این باورند، که این علائم حسی، ابتدا با اختلال در عملکرد ساختار فیبرهای حسی صورت می‌گیرد؛ به گونه‌ای که نورون‌های حسی دچار آتروفی آکسونی و میلین‌زدایی می‌شوند(۴). به طوری که حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا افزایش می‌یابد و هایپرآلژزیا و آلودینیا دیابتی بروز می‌کند(۵). پاتوژنز DPN به طور کامل شناخته نشده است. نظریه‌های متعددی برای مکانیسم‌های درگیر در درد نوروپاتیک مطرح شده است؛ از جمله: تغییر در عروق خونی تامین کننده اعصاب محیطی، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها، کاهش حمایت نوروتروفیک، تغییر در بیان کانال‌های سدیم و کلسیم و اخیراً مکانیسم‌های درد مرکزی؛ مانند افزایش واسکولاریتی تالاموس و عدم تعادل در مسیرهای نزولی تسهیل کننده/ مهارکننده بیان شده است(۶–۸). شواهد حاصل از مدل‌های حیوانی و انسانی نشان می‌دهد که التهاب سیستمیک در فرآیند پاتوفیزیولوژیکی DPN دخیل است(۹–۱۱). که با پاسخ‌های ایمنی ذاتی تسهیل می‌شود(۱۲, ۱۳). گیرنده‌های شبه Toll(TLRs) از خانواده گیرنده‌های شناسایی کننده الگو(PRRs) بوده و از اجزای حیاتی سیستم ایمنی ذاتی‌اند. TLRها در شناسایی الگوهای ملکولی وابسته به عامل بیماری‌زا(PAMPs) و الگوهای مولکولی وابسته به آسیب(DAMPs) نقش دارند (۱۴). وقتی که TLRها به وسیله لیگاندهای مربوط به عامل پاتوژن یا میزبان فعال می‌شوند، سیگنال‌های پایین دست را القاء می‌کنند که منجر به تولید سیتوکین‌ها و کموکین‌ها و شروع پاسخ‌های التهابی می‌شود(۱۵). TLR4 یکی از اعضای خانواده TLRها به شمار می‌رود که افزایش بیان آن در منوسیت‌ها و ماکروفاژهای موش‌های دیابتی به خوبی نشان داده شده است(۱۶). سطوح لیگاندهای درون‌زا (HSP60، HMGB1) و برون‌زا (اندوتوکسین) TLR4 در افراد دیابتی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد(۱۶). این مولکول‌ها، از مسیر سیگنالی TLR4 به عنوان رسپتور مبدل سیگنال، منجر به انتشار سیتوکاین‌های پیش التهابی در منوسیت‌ها، ماکروفاژها و میکروگلیاها می‌شوند(۱۷). تحقیقات TLR4 ، TNF-α و IL-1β را به عنوان بیومارکرهای DPN شناسایی کرده‌اند(۱۸, ۱۹). تائوزو و همکاران(۲۰۱۲) نشان دادند که سطوح پروتئین‌های TNF-α و IL-1β از سایتوکاین‌های پیش التهابی فرودست مسیر سیگنالینگ TLR4 در نخاع موش‌های دیابتی القاء شده با STZ به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و پیشنهاد کردند که TLR4 و مسیر سیگنالینگ آن با نوروپاتی درد در مدل‌های دیابتی مرتبط است. تیاهو و همکاران(۲۰۱۷) نشان دادند که مهار گیرنده TLR4 سطح TNF-α را در DRG موش‌های نوروپاتی دیابتی کاهش می‌دهد. بنابراین محققین به این نتیجه رسیدند که یکی از راهکارهای مقابله با این شرایط پاتوفیزیولوژیکی، مهار TLR4 به عنوان گیرنده القاء میانجی‌های التهابی، می‌تواند روشی جدید برای درمان DPN باشد(۱۳, ۲۰). به هر حال استفاده از مهارکننده‌های دارویی برای گیرنده TLR4، تاثیرگذاری محدودی داشته و دارای عوارض جانبی می‌باشد(۲۱). لذا عامل غیردارویی که بتواند این نقص فیزیولوژیکی را مهار کند، به عنوان ابزار درمانی مطرح می‌شود.

ورزش بعنوان یک استراتژی غیردارویی جهت کاهش عوارض ناشی از دیابت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. یوون و همکاران(۲۰۱۲) نشان داده‌اند که فعالیت‌های هوازی باعث کاهش درد نوروپاتیک و کاهش شاخص‌های پیش التهابی IL-1β و TNF-α بعد از Chronic constriction injury (CCI) عصب

سیاتیک می‌شود(۲۲). مونون و همکاران(۲۰۱۵) نشان دادند که تمرین هوازی با شدت پائین منجر به افزایش بیان ناقل عصبی مهاری انکفالین، کاهش سطح سایتوکین‌های پیش التهابی و کاهش در کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ در DRG موش‌های دیابتی القاء شده با STZ می‌شود و از این طریق باعث بهبود در نوروپاتی حسی دیابت می‌گردد(۲۳). از طرفی بورتون و همکاران(۲۰۱۲) نشان دادند که تمرین هوازی با شدت بالا منجر به افزایش سطوح میانجی‌های التهابی و همچنین هایپرگلیسمی در افراد دیابتی نوع ۱ می‌شود(۲۴). بنابراین سازوکارهای اثر تمرینات هوازی با شدت متوسط به عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی و غیرتهاجمی به صورت عمقی و در سطح گیرنده و مولکول در التهاب ناشی از دیابت در سیستم عصبی به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته است. از این رو این مطالعه به بررسی تاثیر ۶ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن TLR4 و میانجی‌های التهابی، در بخش حسی نخاع موش‌های صحرایی نر دارای نوروپاتی درد دیابتی می‌پردازد.

روش بررسی

در پژوهش حاضر راهبرد تحقیق از نوع تجربی بود. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر در سن ۸ هفتگی با محدوده وزنی ۱۰/۲±۲۲۰ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه و در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های استاندارد پلی کربنات در شرایط دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی – روشنایی نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نوارگردان و دستکاری، موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه با تعداد مساوی (n=۱۰) شامل گروه نوروپاتی دیابتی، گروه نوروپاتی دیابتی تمرین، گروه کنترل سالم تمرین و گروه کنترل سالم تقسیم شدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق با کد (EE/97.24.3.69973/scu.ac.ir) مورد تایید قرار گرفت.

القاء دیابت: پس از اتمام پروتکل آشناسازی، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القاء دیابت با تزریق درون صفاقی ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، محلول استروپتوزوتوسین STZ (Sigma, St. Louis, MO)؛ حل شده در بافر سیترات M ۰/۰۵ با pH:۴/۵ به منظور ایجاد دیابت نوع ۱ انجام شد(۱۳). به موش‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات M ۰/۰۵ با pH:۴/۵ به صورت درون صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست بر روی ورید دمی، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) اندازه‌گیری و موش‌های صحرائی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰mg/dl باشد، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته می‌شد. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون در پایان برنامه تمرینی نیز قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد(۲۵).

آزمون‌های رفتاری: دو هفته پس از القای دیابت (پیش از شروع پروتکل تمرین هوازی) آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک به عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت از تمامی گروه ها مطابق پژوهش تیان هوان چن و هائو لی (۲۰۱۷) به عمل آمد(۲۶). به منظور بررسی اثرات طولانی مدت تمرین، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، مجدداً آزمون های 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(۲۷).

آزمون تیل فلیک(Tail-Flick): برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی(هایپرآلژزیای حرارتی) از آزمون تیل فلیک استفاده شد. این آزمون بر اساس روش دی آمور و اسمیث انجام گرفت(۲۸).در این آزمون، حیوان به صورت افقی در محفظه مخصوص نگهداری حیوان قرار گرفت، به طوری که دُم 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 یک سوم 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 تاخیر (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 تآخیر ثبت گردید.

آزمون فرمالین: برای اجرای آزمون فرمالین از روش متداول دنیس و دوبوژن استفاده گردید(۲۹). بدین ترتیب که حیوان را در یک محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس (۳۰×۲۵×۲۵ سانتی‌متر) که روی سطح شیشه‌ای دستگاه فرمالین قرار داشت، گذاشته شد و پس از گذشت ۱۵ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد (رقیق شده با محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم) به صورت زیرجلدی به سطح پشتی پنجهٔ پای عقب و راست موش تزریق و بلافاصله به محفظه مزبور برگردانده می‌شد. آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه زیر سطح شیشه‌ای قرار دارد تا بتوان پنجه پای حیوان را به طور دقیق مشاهده کرد. به دنبال تزریق فرمالین، رفتارهای دردناک از حیوان بروز می‌کند، که شدت درد در حیوان بر اساس یک تقسیم‌بندی قراردادی به روش دنیس و دوبوژن(۲۹) بر اساس نوع رفتار مشاهده شده، ۴ درجه تفکیکی به طریق ذیل به حیوان داده می‌شد.

۱- حیوان روی پای تزریق شده می‌نشیند و یا راه می‌رود: نمره صفر

۲- حیوان پنجه پایی 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 پایی که فرمالین به آن تزریق شده را از سطح تماس جدا می‌کند: نمره ۲

۴- حیوان پنجه پایی که فرمالین به آن تزریق شده را می‌لیسد، گاز می‌گیرد و یا به شدت تکان می‌دهد: نمره ۳

ثبت پاسخ‌های رفتاری در اینتروال‌های ۱۵ ثانیه‌ای بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ (زمان آزمون) به صورت ۱۲ بلوک ۵ دقیقه ای محاسبه می‌شد. در این ارتباط پاسخ در هر اینتروال 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 اینتروال بدست آمد. میانگین نمره درد در هر ۵ دقیقه طبق فرمول زیر محاسبه می‌شد:

$$\text{نمره درد} = \frac{(0\times T0)+(1\times T1)+(2\times T2)+(3\times T3)}{20}$$

به ترتیب، T0، T1، T2 و T3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای رفتار صفر، ۱،۲و 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 یافتن از حصول نوروپاتی دیابت در موش‌های صحرایی نر، پروتکل تمرین هوازی به مدت ۶ هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر پروتکل تمرین هوازی بر اساس مطالعه چانگ هوان و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت؛ ابتدا به منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری حیوان 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(۳۰). 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 ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۴تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم و ۱۸ تا ۱۷ متر در دقیقه برای۳۰ دقیقه در هفته پنجم و ششم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی درهفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شد. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶–۱۸ عصر برگزار شد.

استخراج نمونه: 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 (۱۰mg/kg) بی هوش شدند. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، تحت شرایط استریل و مطابق روش گلدرد و چوپین سال ۱۹۷۷، (۳۱) سریعاً قطعه نخاعی حاوی بخش خلفی نخاع از سطح L4 تا L6، که سگمنت-های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه مهره های T13-L1 ستون فقرات است، ابتدا ناحیه مورد نظر مشخص گشت و با برش در پائین‌ترین بخش ممکن از ستون فقرات جدا شد. سپس ستون فقرات با استفاده از کانال مرکزی به عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه را به عنوان نمونه، در نیتروژن ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های ملکولی در فریزر۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ریل تایم Real Time-PCR: حدود ۵۰ میلی گرم از بافت نخاع جهت استخراج RNA کل به نسبت ۱ به ۱۰ با استفاده از کیت QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید.به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول در دمای ۴ سانتیگراد، به مدت۱۰دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با محلول کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵دقیقه، 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 به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در محلول اتانول شستشو و در ۲۰ µL 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 به عنوان تلخیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA تک رشته‌ای از پرایمر (Oligo dt MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. . از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن‌های TLR4، TNF-α و IL-1β به صورت کمی استفاده شد، هر واکنش PCR با استفاده از دستگاه (PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems. Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی-گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰–۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند.ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول $R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس دو طرفه و در صورت معنی‌داری، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌های دو گروهی از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم

افزارSPSS-22 انجام و سطح معنی‌داری ۰/۵ ($P<0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پیش از اجرای برنامه تمرینی، اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن گروه‌های مختلف وجود نداشت($P<0.05$). پس از ۶ هفته تمرین استقامتی، میانگین وزن گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل بیشتر بود. اگر چه میانگین وزن گروه‌های سالم نسبت به گروه‌های نوروپاتی تمرین بیشتر بود این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود($P<0.05$) (نمودار۱).

قبل از شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر بود($P<0.05$). پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود($P<0.05$). در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل به طور معنی‌داری پایین‌تر بود($P<0.05$) (نمودار۲).

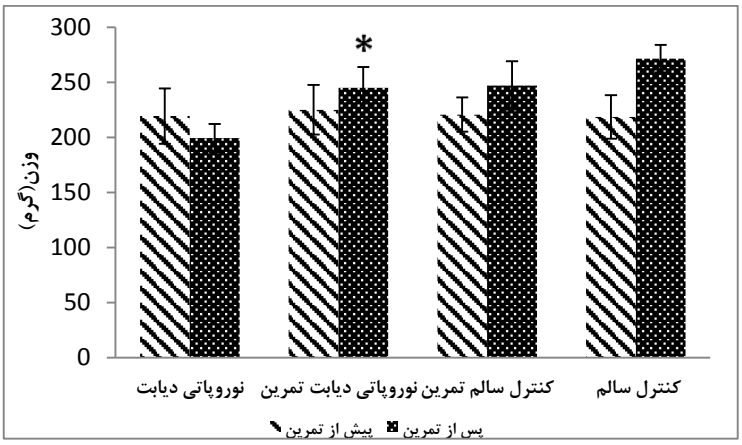
میانگین مدت زمان تاخیر (Tail-Flick latancy) در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی تیل فیلیک دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های نوروپاتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌داری کمتر بود($P<0.05$). همچنین پس از ۶ هفته تمرین هوازی میانگین مدت زمان تاخیر در پس کشیدن دم در آزمون تیل فیلیک در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود($P<0.05$) (نمودار۳).

پس از اجرای ۶ 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 سالم در مقایسه با گروه های نوروپاتی به طور معنی‌داری کمتر بود($P<0.05$). همچنین میانگین مدت زمان پاسخ به درد ناشی از تزریق فرمالین در مرحله حاد و مزمن در گروه نوروپاتی تمرین نسبت به نوروپاتی دیابتی به طور معنی-داری کمتر بود($P<0.05$) (نمودار۴).

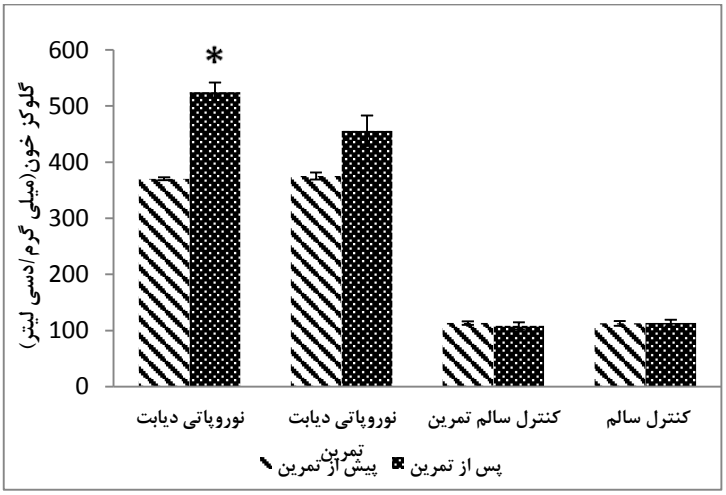
میزان بیان ژن TLR4در نرون‌های بخش خلفی نخاع در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین، سالم تمرین و سالم کنترل به طور معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی پایین‌تر بود. تفاوت معنی‌داری در سطوح بیان ژن TLR4بین گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به سالم کنترل و سالم تمرین مشاهده نشد($P<0.05$). تفاوت میزان بیان ژن TLR4 در گروه سالم تمرین نسبت به سالم کنترل با کاهش همراه بود هرچند که به لحاظ آماری با تغییرات معنی‌داری همراه نبود($P<0.05$) (نمودار۵).

میزان بیان ژن TNF-αدر نرون‌های بخش خلفی نخاع در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین، سالم تمرین و سالم کنترل به طور معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی پایین‌تر بود. تفاوت معنی‌داری در سطوح بیان ژن TNF-αبین گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به سالم کنترل و سالم تمرین مشاهده نشد($P<0.05$). تفاوت میزان بیان ژن TNF-α در گروه سالم تمرین نسبت به سالم کنترل با کاهش همراه بود هرچند که به لحاظ آماری با تغییرات معنی‌داری همراه نبود($P<0.05$) (نمودار۶).

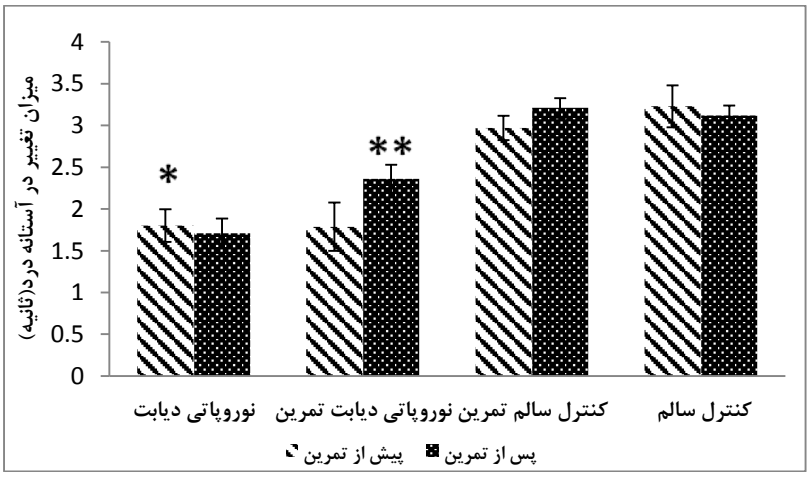
میزان بیان ژن IL-1β در نرون‌های بخش خلفی نخاع در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین، سالم تمرین و سالم کنترل به طور معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی پایین‌تر بود. تفاوت معنی‌داری در سطوح بیان ژن IL-1β بین گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به سالم کنترل و سالم تمرین مشاهده نشد($P<0.05$). تفاوت میزان بیان ژن IL-1β در گروه سالم تمرین نسبت به سالم کنترل با کاهش همراه بود هرچند که به لحاظ آماری با تغییرات معنی‌داری همراه نبود($P<0.05$) (نمودار۷).



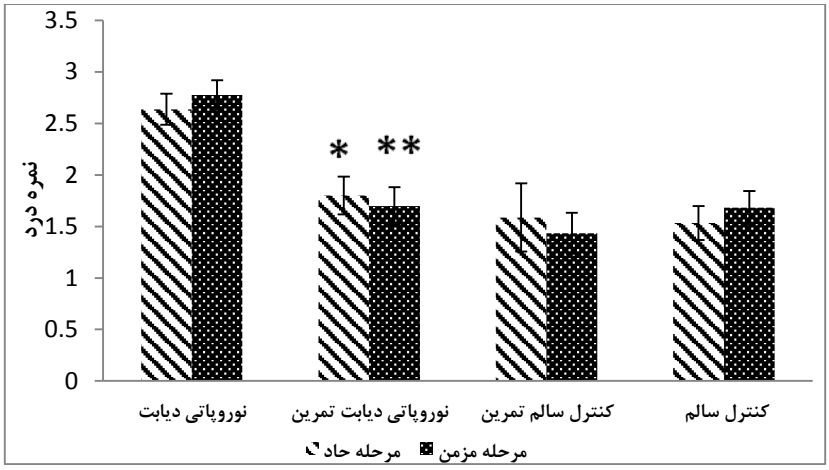
نمودار ۱: تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف * اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابت (P<0.05).



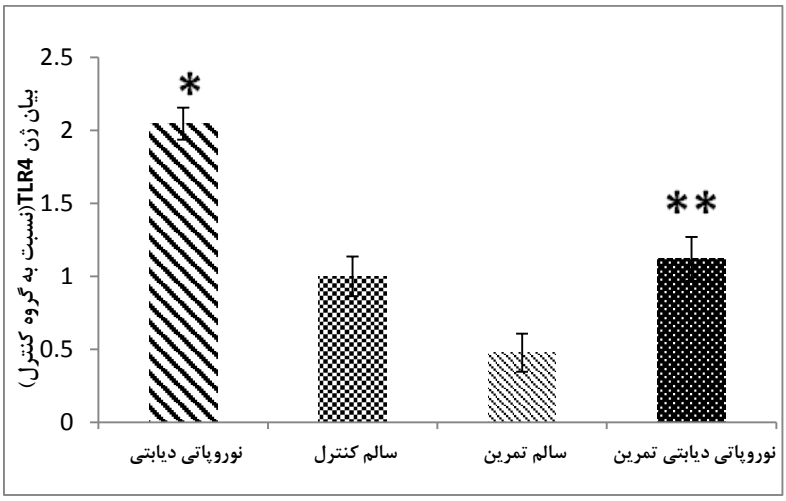
نمودار۲: تغییرات گلوکز خون در گروه‌های مختلف * اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابت تمرین و کنترل سالم(P<0.05).



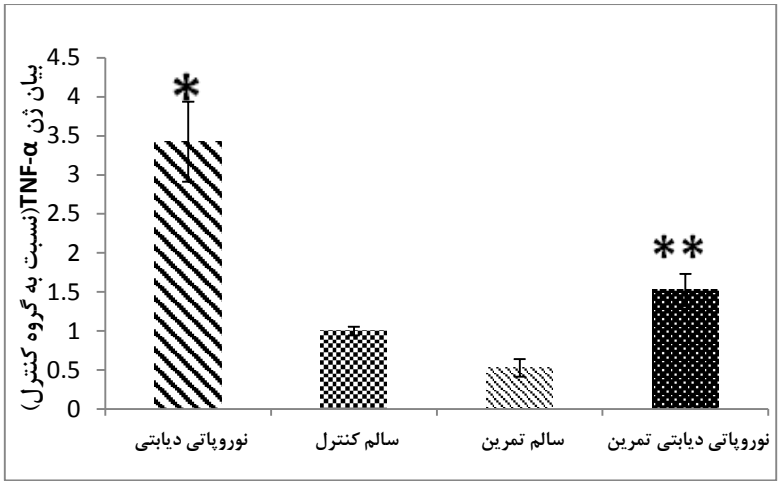
نمودار ۳: تغییرات مدت زمان تاخیر در عقب کشیدن دم در آزمون پردردی حرارتی تیل فلیک قبل و بعد از دوره تمرینی در گروه-های مختلف(ثانیه)* اختلاف معنی دار با گروه سالم دو هفته بعد از القای دیابتP<0.05). ** اختلاف معنی دار نسبت به گروه نوروپاتی دیابت بعد از اجرای پروتکل تمرین(P<0.05).



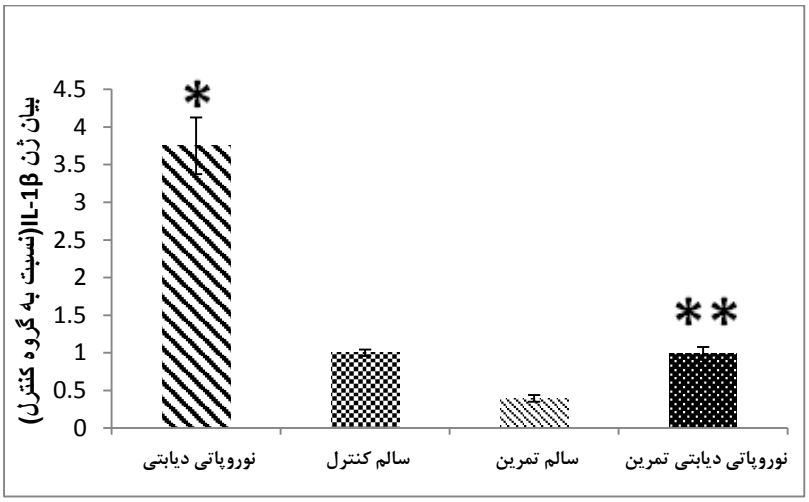
نمودار ۴: میزان احساس درد ناشی از تزریق فرمالین در واحد زمان بر مبنای پاسخ جمع کردن پنجه‌ی پا در مرحله حاد و مزمن گروه‌های مختلف. هر نقطه نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار در ۸ رأس موش است. مقدار کل درد احساس شده در بازه زمانی ۱۰-۰ دقیقه (مرحله حاد) و ۶۰-۱۵ دقیقه (مرحله مزمن) است.* اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابت در مرحله حاد (P<0.05). اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابت در مرحله مزمن (P<0.05).**



نمودار ۵: میزان بیان ژن TLR4در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). ** اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).



نمودار ۶: میزان بیان ژن TNF-α در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). ** اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).



نمودار ۷: میزان بیان ژن IL-1β در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل (P<0.05). ** اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<0.05).

بحث

در این مطالعه اثر تمرین هوازی بر بیان ژن TLR4 و میانجی‌های التهابی، در بخش حسی نخاع موش‌های با درد نوروپاتی دیابت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمرین هوازی با شدت متوسط؛ مانع از کاهش وزن غیرطبیعی و کاهش میزان قند خون در موش‌های دیابتی القاء شده با STZ می‌شود. همچنین در اثر تمرین هوازی، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا که با افزایش مدت زمان تاخیر در آزمون تیل فلیک و کاهش میانگین نمره درد در مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در آزمون-های رفتاری درد نوروپاتیک اندازه‌گیری شد، دچار تغییر شده است به طوری که آستانه درد در موش‌های نوروپاتی تمرین به شکل معنی‌داری بالاتر رفته است. همچنین نتایج نشان دادند که تمرین هوازی موجب جلوگیری از افزایش بیان گیرنده TLR4 در نورون‌های حسی موش‌های دارای نوروپاتی دیابت می‌شود و افزایش بیان سایتوکین‌های پیش

التهابی TNF-α و IL-1β را در بخش حسی نخاع موش-های دیابتی القاء شده با STZ را سرکوب می‌کند.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که دیابتی کردن موش‌ها با تزریق STZ منجر به مرگ سلول‌های بتای پانکراس و موجب هایپرگلیسمی ، هیپوانسولینمی و هایپرلیپیدمی مزمن می‌گردد(۳۲). این عوامل منجر به آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش سطح P38MAPK و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C و فعال شدن فاکتور نسخه‌برداری NF-κB می‌شوند و نتیجه آن تجمع اضافی عوامل التهابی در سیستم عصبی و افزایش حساسیت نوسیسپتورها در نوروپاتی ناشی از دیابت می‌شود(۱۳, ۳۲). تعامل بین هایپرگلیسمی، التهاب و دیابت دلالت بر درگیر بودن سیستم ایمنی می‌باشد(۳۳, ۳۴) تحقیقات نشان داده-اند که یکی از گیرنده‌های شبه تول از خانواده گیرنده‌های شناساگر الگو به نام TLR4 در نتیجهٔ هایپرگلیسمی در نرون‌های حسی اولیه، میکروگلیاها و آستروسیت‌ها افزایش بیان می‌شود. این گیرنده به عنوان وساطت‌کننده پاسخ‌های التهابی نقش مهمی در پاتوژنز درد نوروپاتی دیابت دارد(۳۵, ۳۶). مطالعه حاضر این موضوع را مورد تایید قرار داد و نشان داد که افزایش بیان ژن TLR4 در نورون‌های حسی بخش خلفی نخاع در موش‌های با نوروپاتی دیابت بیشتر از گروه کنترل سالم بود. محققین از راهکارهای دارویی برای اثبات و کنترل این شرایط پاتولوژیکی استفاده کردند. تیان هوان چن و همکاران(۲۰۱۷) از مهار کننده TAK-242 برای مسدود کردن مسیر پیام رسانی TLR4 و همچنین دانگ می زوا و همکاران(۲۰۱۷) از دولوکستین برای مهار پیام‌رسانی TLR4 مسیر وابسته به پروتئین تطبیق‌دهنده MyD88 به عنوان راهکارهای دارویی برای کاهش التهاب استفاده کردند و نشان دادند که سطوح سایتوکین‌های پیش‌التهابی TNF-α و IL-1β در DRG و شاخ خلفی نخاع موش‌های دیابتی القاء شده با STZ کاهش و حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا کمتر شده بود و به این نتیجه رسیدند که مهار TLR4 به عنوان میانجی پاسخ التهابی و پیشرو آسیب بافتی می‌تواند یک هدف بالقوه برای درمان درد نوروپاتیک دیابتی باشد(۲۰, ۳۵). بسیاری از مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که تمرینات ورزشی ممکن است به عنوان راهبرد موثر درمانی غیردارویی برای تعدیل عوامل التهاب نقش داشته باشند(۱۱, ۳۷) نتیجهٔ تحقیق حاضر نشان داد اجرای شش هفته تمرین هوازی با شدت متوسط بر موش‌های دیابتی القاء شده با STZ بیان ژن‌های TLR4 و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی TNFα و IL-1β در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی کمتر بود. همچنین در این مطالعه، کاهش معنی‌داری در میانگین نمره درد در آزمون فرمالین در مرحله حاد و مزمن و افزایش مدت زمان تاخیر در آزمون تیل فلیک بعد از اجرای پروتکل تمرین هوازی در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی مشاهده شد. به نظر می‌رسد که تمرین هوازی با شدت متوسط پتانسیل درمانی در مقابل درد نوروپاتی ناشی از دیابت از طرق سرکوب افزایش بیان ژن‌های TLR4، TNFα و IL-1β دارد که این نتیجه همسو با نتایج کارن ای کوپال و همکاران (۲۰۰۷) بود که نشان دادند تمرین، درد القاء شده توسط فرمالین را در جوندگان کاهش می‌دهد و این عامل را در نتیجه کنترل التهاب ناشی از تمرین دانسته‌اند(۳۷) هی جی یان و همکاران(۲۰۱۵) نشان دادند تمرین هوازی منجر به کاهش درد نوروپاتیک مرتبط با دیابت می‌شود، به طوری که هایپرآلژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را در موش-های دیابتی القاء شده با STZ را بهبود می‌بخشد. در این تحقیق، اثر ضد دردی تمرین هوازی را در نتیجه افزایش رهاسازی نوروترنسمیتر مهاری انکفالین و کاهش سطوح افزایش یافته سایتوکاین‌های پیش‌التهابیTNF-α و IL-1β در سیستم عصبی پیرامونی نسبت داده‌اند(۲۳, ۳۸). نیکولاجی و همکاران(۲۰۱۱) در تحقیقی نشان دادند که اجرای ۵ هفته تمرین هوازی بر روی تردمیل باعث افزایش رهاسازی اپیوئیدهای درون‌زا مانند بتااندروفین و مت-انکفالین می‌گردد. آنها پیشنهاد کردند که کاهش سطح

نشانگرهای التهابی در نتیجه ترشح مسکن‌های درون‌زا می‌تواند مسئول ضد دردی اثرات مشاهده شده در دوره تمرینی کوتاه مدت باشد(۳۹). یوهان چن و همکاران (۲۰۱۲) طی تحقیقی، اثر تمرین شنا و تمرین هوازی روی تریدمیل بر رفتارهای درد نوروپاتی در مدل CCI مورد بررسی قرار دادند، نشان دادند که تمرین هوازی به طور معنی‌داری موجب افزایش زمان تاخیر در عقب کشیدن پا در هایپرآلژزیای حرارتی و افزایش آستانه پاسخ به آلودینیای مکانیکی و همچنین باعث کاهش سطوح TNF-α، IL-1β و افزایش بیان HSP72 در عصب سیاتیک می‌شود. آنها به این نتیجه رسیدند که افزایش سطوح HSP72 می تواند سطوح سایتوکاپین‌های پیش التهابی را کاهش داده و باعث بهبود درد نوروپاتی پیرامونی شود(۲۲). در ارتباط با شناسایی مکانیسم‌های درگیر در اثرات تجویز فعالیت‌های هوازی بر کاهش بیان ژن‌های TLR4، TNFα و IL-1β در نخاع موش‌های مدل درد نوروپاتی دیابت و بهبود عملکرد نورون‌های حسی و کاهش درد نوروپاتی می‌توان استدلال کرد که فعالیت‌های هوازی از طریق افزایش سطوح سایتوکین‌های ضد التهابی، پروتئین-های شوک گرمایی و گلوکوکورتیکوئید می‌تواند منجر به مهار TLR4 گردد(۴۰). TLR4 به عنوان القاءکننده انتشار سایتوکین‌ها شناخته شده است(۴) از طرفی به نظر می‌رسد که بیان TLR4 توسط سایتوکین‌های ضد التهابی IL-4 و IL-10 تعدیل می‌شود(۴۱, ۴۲) تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که غلظت گردش خون سیتوکین ضد التهابی بعد از ورزش افزایش بیان می‌یابد(۴۳) بنابراین ممکن است که افزایش بیان سایتوکین‌های ضد التهابی ناشی از تمرین عامل مهار TLR4 باشد. از طرفی، هورمون‌های استرس، همانند گلوکوکورتیکوئیدها نقش مهمی در تعدیل و تنظیم سیستم ایمنی مرتبط با ورزش ایفا می‌کنند(۴۴). گلوکوکورتیکوئیدها از طریق مهار P38MAPK سطوح سایتوکاپین‌های پیش التهابی را کاهش می‌دهند(۴۵). افزایش سطوح گلوکوکورتیکوئیدها در نتیجه اثر فعالیت-های ورزشی در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است(۴۶). بنابراین این احتمال وجود دارد که فعالیت‌های هوازی با افزایش سطوح گلوکوکورتیکوئیدها منجر به مهار TLR4 و پاسخ‌های التهابی شود. دیابت باعث کاهش سطوح HSP ها می‌گردد(۴۷). کاهش سطوح HSPها باعث افزایش فعال شدن سایتوکین‌های التهابی می‌شود (۴۸). هوپر(۲۰۰۹) نشان داد که سطوح HSPها ارتباط معکوسی با مقاومت به انسولین، سیتوکین‌های التهابی، سطوح GLUT4 و عملکرد میتوکندریایی دارد(۴۸). چن و همکاران(۲۰۱۳) نشان دادند که فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش سطح HSP70 و منجر به مهار فعال‌سازی P38MAPK می‌شود(۳۸). بنابراین به نظر می‌رسد که فعالیت‌های هوازی از طریق افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی باعث مهار گیرنده TLR4 و کاهش سطوح سایتوکین‌های التهابی شود. با این وجود پیشنهاد می شود در پژوهش های آتی، همراه با اندازه‌گیری گیرنده ایمنی ذاتی و شاخص های التهابی، برای دستیابی به شرایط قطعی تر، عوامل مهارکننده این گیرنده همانند سطوح سایتوکین-های ضد التهابی، پروتئین‌های شوک گرمایی و گلوکوکورتیکوئید را مورد بررسی قرار دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه نشان داد که گیرنده ایمنی ذاتی TLR4 در نوروپاتی محیطی دیابتی دچار افزایش بیان شده و شرایط التهابی را به وجود می‌آورد. تصور بر این است که یکی از عوامل احتمالی در گیر در درد نوروپاتی دیابتی، ناشی از تغییرات در شاخص‌های التهابی باشد. از سوی دیگر تمرین هوازی با شدت متوسط میزان بیان ژن TLR4 و نشانه گرهای التهابی TNF-α و IL-1β را در بخش خلفی نخاع کاهش داد و همچنین حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا که در نتیجه تخریب پیشرونده نرون‌های حسی رخ می‌دهد را بهبود بخشید. لذا به نظر می‌رسد، کاهش میزان بیان ژن TLR4 می‌تواند یک پاسخ جبرانی برای کاهش سطح سایتوکین‌های پیش‌التهابی باشد و تمرین هوازی به عنوان یک راهبرد غیردارویی این تغییرات را

تعدیل و درد نوروپاتیک ناشی از دیابت را بهبود می‌بخشد. پیشنهاد می‌شود که تمرین استقامتی به شکل هوازی با شدت متوسط به عنوان یک مداخله درمانی غیردارویی برای بیماران دیابتی به منظور کاهش درد نوروپاتیک به کار گرفته شود.

منابع

1-Shi, X., et al., Beneficial effect of TNF-α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. Journal of neuroinflammation, 2013. 10(1): p. 836.

2-Van Acker, K., 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. Diabetes & metabolism, 2009. 35(3): p. 206-213.

3-Vincent, A.M., et al., Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. Nature Reviews Neurology, 2011. 7(10): p. 573.

4-Wilson, N. and D. Wright, Inflammatory mediators in diabetic neuropathy. J Diabetes Metab S, 2011. 5: p. 2.

5-Campbell, J.N. and R.A. Meyer, Mechanisms of neuropathic pain. Neuron, 2006. 52(1): p. 77-92.

6-Toth, C., et al., Diabetes mellitus and the sensory neuron. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2004. 63(6): p. 561-573.

7-Schreiber, A.K., et al., Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. World journal of diabetes, 2015. 6(3): p. 432.

8-Gore, M., et al., Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep. Journal of pain and symptom management, 2005. 30(4): p. 374-385.

9-Li, X., et al., TNF-Alpha in Peripheral Neuropathy Patients with Impaired Glucose Regulation. Journal of diabetes research, 2017. 2017.

10-González-Clemente, J., 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): p. 525-529.

11-Thakur, V., et al., Effect of exercise on neurogenic inflammation in spinal cord of Type 1 diabetic rats. Brain research, 2016. 1642: p. 87-94.

12-Thacker, M.A., et al., Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. Anesthesia & Analgesia, 2007. 105(3): p. 838-847.

13-Yan, J.-e., et al., Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. Neuroscience letters, 2012. 526(1): p. 54-58.

14-Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, Cellular and molecular immunology E-book. 2014: Elsevier Health Sciences.

15-Okun, E., et al., Toll-like receptors in neurodegeneration. Brain research reviews, 2009. 59(2): p.۲۹۲-۲۷۸ .

16-Devaraj, S., et al., Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. The journal of clinical endocrinology & metabolism, 2008. 93(2): p. 57.۵۸۳-۸

17-Devaraj, S., et al., Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. Diabetologia, 2009. 52(8): p. 1665-1668.

18-Zhu, T., et al., Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha as diagnostic biomarkers for diabetic peripheral neuropathy. Neuroscience letters, 2015. 585: p. 28-32.

19-Jin, H.Y. and T.S. Park, Role of inflammatory biomarkers in diabetic peripheral neuropathy. Journal of Diabetes Investigation, 2018. 9(5): p. 1016.

20-Chen, T., et al., 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): p. 14923.

21-Jurga, A.M., et al., Blockade of toll-like receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. Neural plasticity, 2016. 2016.

22-Chen, Y.-W., et al., Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. Anesthesia & Analgesia, 2012. 114(6): p. 1330-1337.

23-Yoon, H., et al., Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. Experimental neurology, 2015. 267: p. 107-114.

24-Bortolon, J.R., et al., Persistence of inflammatory response to intense exercise in diabetic rats. Experimental Diabetes Research, 2012. 2012.

25-Wei, M., et al., The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung & Circulation, 2003. 12(1): p. 44-50.

26-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): p. 8.9. 1-8.9. 15.

27-Sharma, N.K., et al., Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin ۳-synthesis in an animal model of chronic widespread pain. Physical therapy, 2010. 90(5): p. 714-725.

28-D'Amour, F.E. and D.L. Smith, A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther, 1941. 72(1): p. 74-9.

29-Dubuisson, D. and S.G .Dennis, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain, 1977. 4: p. 161-174.

30-Chae, C.-H., 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): p. 235-241.

31-Gelderd, J.B. and S.F. Chopin, The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. The Anatomical Record, 1977. 188(1): p. 45-47.

32-Lee, J.Y., et al., GS-KG9 ameliorates diabetic neuropathic pain induced by streptozotocin in rats. Journal of Ginseng Research, 2017.

33-Wada, J. and H. Makino, Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. Nature Reviews Nephrology, 2016. 12(1): p. 13.

34-Dasu, M.R., et al., High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. Diabetes, 2008.

35-Zhou, D.-m., et al., Effects of Duloxetine on the Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway in Spinal Dorsal Horn in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. Pain Medicine, 2017. 19(3): p. 580-588.

36-Lin, S., et al., Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. Journal of neuroinflammation, 2012. 9(1): p. 46.

37-Kuphal, K.E., E.E. Fibuch, and B.K. Taylor, Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. The Journal of Pain :(۱۲)۸ .۲۰۰۷ ,p. 989-997.

38-Chen, Y.-W., 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): p. 482-490.

39-Stagg ,N.J., et al., Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain modelrole of endogenous opioids. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 2011. 114(4): p. 940-948.

40-Gleeson, M., B. McFarlin ,and M. Flynn, Exercise and Toll-like receptors. Exerc Immunol Rev, 2006. 12(1): p. 34-53.

41-Mita, Y., 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): p. 71-7.۵

42-Curtale, G., et al., Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10–dependent microRNA-146b. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. 110(28): p. 11499-11504.

43-Petersen, A.M.W. and B.K. Pedersen, The anti-inflammatory effect of exercise. Journal of applied physiology, 2005. 98(4): p. 1154-1162.

44-Pedersen, B., et al., Exercise-induced immunomodulation-possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. International journal of sports medicine, 1997. 18(S 1): p .S2-S7.

45-Bhattacharyya, S., et al., Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4–mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. Blood, 2007. 109(10): p. 4313-4319.

46-Beaudry, J.L. and M.C. Riddell, Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic β-cell function and diabetes development. Diabetes/metabolism research and reviews, 2012. 28(7): p. 560-573.

47-Padmalayam, I., The heat shock response: its role in pathogenesis of type 2 diabetes and its complications, and implications for therapeutic intervention. Discov Med, 2014. 18(97): p. 29-39.

48-Hooper, P.L. and P.L. Hooper, Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. Cell Stress and Chaperones, 2009. 14(2): p. 113-115.

Effect Aerobic Exercise on the Level of Expression of Toll-like Receptor 4 and Inflammatory Mediators in the Sensory Spinal Cord of Male Rats with Diabetic Neuropathic Pain

Ahmad Kaki [1], Masoud Nikbakht [2*], Abdolhamid Habibi [3], Hadi Fathi Moghaddam[4]

1-Ph.D Student of Physiology of Sport.
2-Associate Professor of Sport Physiology.
3-Professor of Sport Physiology.
4-Professor of Medical Physiology.

1,2,3-Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4-Department of Physiology, Faculty of Medicine, Physiology Reserch Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Masoud Nikbakht; Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, Ahvaz Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
Tel:+989106003696
Email: nikbakht7@ut.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Increased expression of TLR4 in the nervous system is one of the factors involved in the pathophysiology of Diabetic Peripheral Neuropathy. The purpose of this study was to determine the effect of aerobic training on the expression of TLR4 gene and inflammatory mediators in the sensory spinal cord of male rats with DPN.

Subjects and Methods: Forty male rats (220 ±2.2 g weight) were divided into four equal groups: diabetic neuropathy, diabetic neuropathy training, healthy control training and healthy control**.** Diabetes was induced by STZ injection. After confirming the development of conditions for DPN by behavioral tests, exercise groups performed 6 weeks of continuous aerobic exercise on treadmill. The level of expression of TLR4, TNF-α and IL-1β genes in sensory neurons of L4-L6 spinal cord were measured by Real-Time PCR technique. Two-way ANOVA and post-hoc LSD test were used for statistical analysis.

Results: The expression of TLR4, TNF-α and IL-1β genes in the diabetic neuropathy training group was significantly lower than the diabetic neuropathy group ($P<0.05$). In addition, there was a significantly higher TLR4 gene expression in the diabetic neuropathy group than those for healthy control groups ($P<0.05$).

Conclusion: Aerobic training can reduce the expression of TLR4 gene and inflammatory markers in the sensory part of the spinal cord and improve the sensitivity of the nosepectors to painful factors. Therefore, the findings of this study suggest that aerobic exercise can be useful as a non-prescriptive therapeutic intervention for diabetic patients to reduce neuropathic pain.

Keywords: Aerobic Exercise, TLR4, Inflammatory mediators, DPN.

►*Please cite this paper as:*
Kaki A, Nikbakht M, Habibi AH, Fathi Moghaddam H. Effect Aerobic Exercise on the Level of Expression of Toll-like Receptor 4 and Inflammatory Mediators in the Sensory Spinal Cord of Male Rats with Diabetic Neuropathic Pain. Jundishapur Sci Med J 2018; 17(5):503-517.

Received: Dec 17, 2018 **Revised: Jan 12, 2019** **Accepted: Jan 19, 2019**