

Effects of Endurance Training on mRNA levels of the KIF1B Motor Protein in Sensory areas of the Spinal Cord of Rats with Diabetic Neuropathy

Masoud Rahmati¹, Reza Gharakhanlou^{2*}, Mansoureh Movahedin³, Seyad Javed Mowla⁴, Ali Khazeni¹, Zohreh Mazaheri⁵

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 5- Postdoc Researcher, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ghara_re@modares.ac.ir

Received: 29/Jul/2013, Accepted: 08/Oct/2013

Abstract

Objective: Diabetic neuropathy leads to axonal transport abnormalities. However its mechanism and the beneficial effects of exercise on these abnormalities are not well documented. The present study aims to investigate KIF1B mRNA in spinal cord sensory neuron tissue of Wistar male rats with diabetic neuropathy following endurance training.

Methods: We randomly assigned 12 male Wistar rats into three groups: diabetic trained, diabetic untrained and healthy control. Intraperitoneal injection of a STZ (streptozotocin) solution (45 mg/kg) was used to induce diabetes. At two weeks after STZ injections, the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia tests demonstrated the presence of diabetic neuropathy. A moderate endurance training protocol was performed for a six-week period. At 24 hours after the final training session, the rats were sacrificed and the L4-L6 sensory neurons of the spinal cord tissue were removed. KIF1B mRNA expression was performed using real time-PCR.

Results: Diabetic neuropathy led to increased KIF1B gene expression in the diabetic untrained group compared with the intact control group ($p=0.03$). Compared with the diabetic untrained group, training significantly decreased KIF1B gene expression ($P<0.05$) and blood glucose levels ($P=0.0001$) in the diabetic trained group.

Conclusion: KIF1B mRNA up-regulation in sensory neurons of STZ-diabetic rats is a factor which can be involved in abnormal axonal transport. Endurance training as a non-pharmacotherapy strategy can modulate and return KIF1B to approximate normal levels.

Keywords: Diabetic neuropathy, Endurance training, Sensory neurons, KIF1B mRNA

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 25-38

تأثیر تمرین استقامتی بر سطوح mRNA موتور پروتئین KIF1B در بخش‌های حسی نخاع رت‌های دارای نوروپاتی دیابت

مسعود رحمتی^۱، رضا قراخانلو^{۲*}، منصوره موحدین^۳، سیدجواد مولی^۴، علی خازنی^۱، زهره مظاهری^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- پژوهشگر فرا دکتری، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

Email: ghara_re@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۷/۱۷

دریافت مقاله: ۹۲/۰۴/۰۹

چکیده

هدف: نوروپاتی دیابت منجر به اختلالات انتقال آکسونی می‌شود اما ساز و کارهای آن به همراه آثار مفید ورزش بر این اختلالات به‌طور کامل مشخص نشده است. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی KIF1B mRNA در نوروپاتی حسی بافت نخاع رت‌های نروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی بود.

مواد و روش‌ها: ۱۲ سر رت صحرایی بالغ نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی در سه گروه چهار تایی: دیابت + تمرین، دیابت و کنترل سالم قرار گرفتند. برای القای دیابت از روش تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوسین (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد. ۲ هفته پس از تزریق استرپتوزوسین، با اثبات نوروپاتی دیابت توسط آزمون‌های آلودینای مکانیکی و هایپرآلژیا حرارتی، برنامه تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت ۶ هفته اجرا شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها تشریح و نوروپاتی حسی L4-L6 بافت نخاع استخراج شد. بیان KIF1B mRNA نیز به روش Real-Time PCR بررسی شد.

نتایج: در مقایسه با گروه کنترل سالم، نوروپاتی دیابت منجر به افزایش KIF1B mRNA در گروه دیابت شد ($P=0/03$). همچنین تمرین منجر به کاهش معنی‌دار KIF1B mRNA و سطوح گلوکز خون در گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه دیابت شد (به ترتیب $P=0/04$ و $P=0/0001$).

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد یکی از عوامل احتمالی درگیر در اختلال انتقال آکسونی در نوروپاتی دیابت، می‌تواند ناشی از تنظیم افزایشی KIF1B mRNA در نوروپاتی حسی رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوسین باشد و تمرین استقامتی می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد غیر دارویی، این افزایش را تعدیل و به سطوح طبیعی نزدیک کند.

کلیدواژه‌گان: نوروپاتی دیابت، تمرین استقامتی، نوروپاتی حسی، KIF1B mRNA

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۲۵-۳۸

دیابت یکی از بیماری‌های متابولیکی رایج در جهان است که عوارض وخیمی نظیر نوروپاتی (Nephropathy)، نوروپاتی (Neuropathy)، رتینوپاتی (Retinopathy)، مشکلات قلبی - عروقی، اختلالات معده‌ای - روده‌ای، نقصان در سیستم ایمنی و آتروفی عضله اسکلتی (Muscular Atrophy) را به همراه دارد [۱]. در میان عوارض مختلف بیماری دیابت، کاهش ظرفیت نوزایش عصبی اصلی‌ترین عامل درگیر در بیماران و حیوانات دیابتی دارای نوروپاتی است. آسیب عصبی علاوه بر تغییرات پایدار در نوروپاتی دیابت، موجب تحریک تغییرات ویژه آسیب‌رسان در عوامل نورو تروفیک (Neurotrophic Factors)، گیرنده‌های آن‌ها و مسیرهای پیام‌رسان درون سلولی مرتبط با عملکردهای نورونی تغییر یافته می‌شود. اگرچه ساز و کارهای این تغییرات به طور کامل تبیین نشده است [۲، ۳]. از سوی دیگر، نورون‌ها گونه‌های سلولی خاصی هستند که برای انتقال مجموعه‌های پروتئینی، mRNA و دیگر اجزای عصبی در مسافت طولانی از جسم سلولی به نوک آکسون‌ها و شاخه‌های دندردی به طور ویژه به انتقال حرکتی وابسته هستند [۴]. به طور کلی چنین انتقالی توسط دو دسته از موتور پروتئین‌های وابسته به میکروتوبول در نورون‌ها و دیگر سلول‌ها صورت می‌پذیرد که شامل کاینزین‌ها (Kinesins) و داینسین‌ها (Dyneins) هستند و به ترتیب انتقال رو به جلو و رو به عقب را هدایت می‌کنند. پروتئین‌های خانواده کاینزین، موتورهای مولکولی هستند که نقل و انتقال مواد مختلف را در آکسون‌ها بر عهده دارند و تاکنون در پستانداران ۱۵ خانواده از کاینزین‌ها شناسایی شده است. KIF1B (Kinesin Family member 1B) نیز یکی از اعضای خانواده کاینزین ۳ است که در آکسون‌ها مواد را از جسم سلولی به سیناپس منتقل می‌کند [۵]. با توجه به نقش اصلی KIF1B در انتقال رو به جلو میتوکندری [۵] و وزیکول‌های پیش‌سیناپسی [۶] در سلول‌های عصبی و نسبت دادن بخش اعظم اختلالات حسی مشاهده شده در نوروپاتی

تأثیر تمرین استقامتی بر KIF1B در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی

دیابت به اختلالات میتوکندری در بخش‌های مختلف نورون [۷] و نقصان‌های متعدد سیناپسی [۸، ۹]، در پژوهش حاضر به بررسی سطوح mRNA این موتور پروتئین از میان کاینزین‌های موجود پرداخته شد.

همچنین مطالعات نشان می‌دهد فعالیت ورزشی، جنبه‌های گوناگونی از فعالیت‌های سلول‌های عصبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال ورزش می‌تواند شکل‌پذیری مغز [۱۰]، سیستم ضد اکسایشی [۱۱] و تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها (Neurotrophins) را ارتقا بخشد [۱۲] و از مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) سلول‌های عصبی نیز جلوگیری کند [۱۳]. ورزش همچنین می‌تواند بیوستتر RNA [۱۴]، افزایش انتقال آکسونی [۱۵]، و افزایش میزان جوانه‌زنی عصبی به دنبال برش عصبی را به همراه داشته باشد [۱۰]. از سوی دیگر؛ مطالعات نشان می‌دهد اختلال انتقال آکسونی در اثر جهش در ژن‌های کاینزین با بیماری‌های تخریب عصبی ارتباط دارد. برای مثال در صورت ایجاد اختلال در موتور پروتئین KIF1B، شاهد به وجود آمدن بیماری‌های متعدد تخریب عصبی نظیر آلزایمر (Alzheimer) [۱۶]، شارکوت - ماری - توث (Charcot-Marie-Tooth) [۱۷]، فلج جانبی آمیوتروفیک (Amyotrophic Lateral Sclerosis) [۱۸]، هانتینگتون (Huntington) [۱۹] و پارکینسون (Parkinson) [۲۰] خواهیم بود.

براساس اطلاعات موجود تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی اختلالات احتمالی موتور پروتئین KIF1B در نوروپاتی دیابت و از سوی دیگر آثار احتمالی ورزش بر این اختلالات نپرداخته است. بنابراین با توجه به این‌که در نوروپاتی دیابت، بخش اعظم اختلالات مشاهده شده ناشی از نقصان در نورون‌های حسی است [۲۱] و این نقصان‌ها در رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (Streptozotocin: STZ) نیز مشاهده شده است [۲۲]؛ در پژوهش حاضر سطوح mRNA موتور پروتئین KIF1B در بخش حسی ریشه‌های نخاعی عصب سیاتیک رت‌های نر و ایستار دارای نوروپاتی دیابت در پی تمرین استقامتی به بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر ۱۲ سر رت صحرایی بالغ نر ۱۰ هفته‌ای از نژاد ویستار با محدوده وزنی $11/2 \pm 271/3$ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات رازی تهیه و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 3 ± 22 درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه رت نگهداری شدند. در پژوهش حاضر کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس بررسی و تأیید شده است. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب $8/4 \pm 326/3$ گرم [۲۲]، رت‌ها به‌طور تصادفی در سه گروه چهار تایی قرار گرفتند: گروه اول (گروه دیابت + تمرین)، گروه دوم (گروه دیابت) و گروه سوم (گروه کنترل سالم). ۲ هفته پس از القای دیابت، آزمایش‌های رفتاری درد نوروپاتی به‌عنوان شاخص عملکرد نورون‌های حسی [۲۳] اجرا و پس از اطمینان یافتن از حصول نوروپاتی حسی در رت‌ها [۲۴، ۲۵]، برنامه تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته انجام شد [۲۶]. ابتدا در طول مرحله آشناسازی، به‌منظور سازگاری با نوارگردان و شرایط آزمایشگاه، حیوانات پنج روز در هفته به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. همچنین به‌منظور سازگاری برای آزمایش‌های رفتاری نیز حیوانات به مدت ۳ روز در معرض آزمایش‌های رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار گرفتند. بدین‌صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار گرفتند [۲۷]. سرانجام به‌منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون‌ها دیابت القا شد. ۲ هفته پس از القا دیابت با اجرای مجدد آزمون‌های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نوروپاتی در گروه‌های دیابتی، برنامه تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته انجام شد [۲۶]. تمام جلسات تمرینی در پایان چرخه خواب حیوانات و بین

ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد. همچنین به‌منظور اجتناب از عوامل مداخله‌گر نظیر اثرات ضد دردی القا شده توسط استرس (Stress-Induced Antinociception)، آزمایش‌های رفتاری نیز میان ساعت‌های ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد [۲۷].

القای دیابت

به‌منظور القای دیابت، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، محلول (Sigma) STZ (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم حل شده در بافر سترات تازه ۰/۵ مول/لیتر، pH: ۴/۵) به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. به رت‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسیت روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری (Glucometer Strip) قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت Roche آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۲۲].

نحوه اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی

به‌منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی (Mechanical Allodynia)، حیوان روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی‌گلاس (Plexiglass) به ابعاد 20×20 و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت. برای عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه مشبک قرار گرفت. برای سنجش آلودینیای مکانیکی از تارهای مختلف Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stolting آمریکا برای سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده شد. در مواردی که ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده شد، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (Paw

تأثیر تمرین استقامتی بر KIF1B در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی

اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک [۲۶]، استفاده شد؛ بدین صورت که گروه ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفت. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۴-۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۷-۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. برای رسیدن سازگاری‌های به‌دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند [۲۶].

استخراج نمونه

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (Ketamine) (۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش و قطعه‌های نخاعی تشکیل دهنده عصب سیاتیک (L4-L6) [۲۵] که در رت، میان دنده‌های T10-T12 (۲۰-۲۵ میلی‌متر) قرار گرفته‌اند [۳۰]، با برش در پایین‌ترین بخش ممکن بلافاصله استخراج شد. سپس بافت نخاع با استفاده از کانال مرکزی به‌عنوان شاخص به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی آن که حاوی نورون‌های حسی بود [۳۱]، در نیتروژن -۸۰ درجه سانتی‌گراد منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA به‌وسیله QIAzol[®] Lysis Reagent (Qiagen، آلمان) و کلروفرم (Qiagen، آلمان) به روش دستی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بدین صورت که حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت حسی به‌صورت جداگانه، برای استخراج RNA کل (Total RNA) به نسبت ۱ به ۱۰ در

Withdrawal Threshold: PWT) محسوب شد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نکرد. در مواردی که حیوان به هیچ‌یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نداد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته شد. همچنین هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار و میانگین آن‌ها به‌عنوان PWT منظور شد [۲۸، ۲۹]. به‌طور کلی سنجش آلودینای مکانیکی، قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق انجام شد.

نحوه اندازه‌گیری هایپرآلژیای حرارتی

هایپرآلژیای حرارتی (Thermal Hyperalgesia) با استفاده از روش هارگریوز (Hargreaves) و همکاران (۱۹۸۸) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد [۲۴]. به‌طور خلاصه با استفاده از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil، ایتالیا) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی‌گلاس (طول ۲۲ سانتی‌متر × عرض ۲۲ سانتی‌متر × ارتفاع ۱۳/۳ سانتی‌متر) و روی یک صفحه پلکسی‌گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه‌جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی‌گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، زمان‌سنج فعال و با کشیدن پا، تابش نور قطع و زمان‌سنج متوقف شد و با ثبت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (Paw Withdrawal Latency: PWL) میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب‌رسان حرارتی ارزیابی شد. هر پا به‌طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان آستانه درد حرارتی ثبت شد. همچنین برای جلوگیری از آسیب بافت، حد نهایی (Cut Off) آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. به‌طور کلی سنجش هایپرآلژیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد.

برنامه تمرین

در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۰-۵۵ درصد

II انجام شد (Applied Biosystems Step One، آمریکا). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر آغازگر جلویی (Forward Primer)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی (Reverse)، ۷ میکرولیتر آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) و ۱۰ میکرولیتر Syber Green) و هر واکنش به صورت مضاعف (Duplicate) صورت پذیرفت. طراحی آغازگرها براساس اطلاعات ژن‌های KIF1B و GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) NCBI National Center of Biotechnology) در بانک ژنی (Information) و توسط شرکت Qiagen (آلمان) انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است؛ ضمن این‌که از GAPDH به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه - ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) بود. نمودار ذوب (شکل ۱) برای بررسی درستی داده‌ها و نمودار استاندارد (شکل ۲) به‌منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم شد و بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن KIF1B به ژن مرجع محاسبه شد. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد [۳۲].

QIAzol[®] Lysis Reagent به روش هاون‌کوبی همگن شد و به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول (Isopropanol) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA اندازه‌گیری شد (Eppendorf، آلمان) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen، آلمان) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

Real-Time PCR

برای اندازه‌گیری سطوح بیان KIF1B mRNA از روش کمی Real-Time PCR با استفاده از Primix Syber Green

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

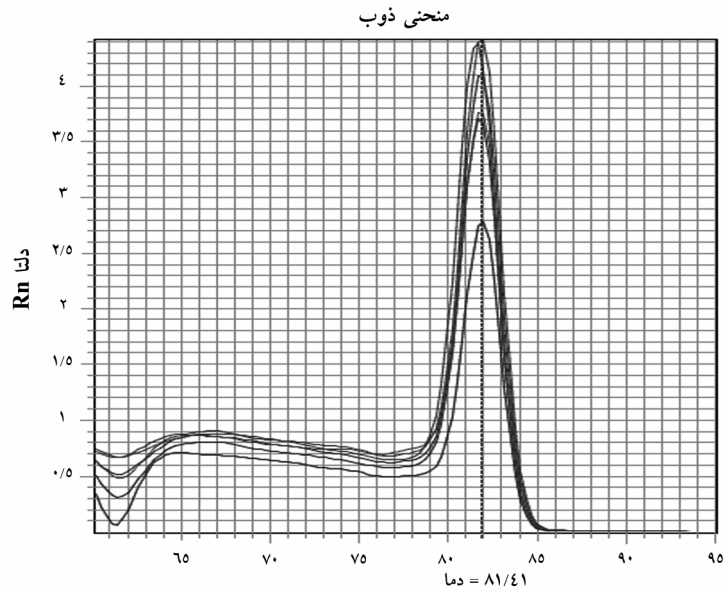
ژن	توالی آغازگر	کد ژنتیکی	منحنی ذوب دما (درجه سانتی‌گراد)
KIF1B	جلویی: 5'-CTCGCCTGAAGACCCCTGCT-3'	NM_057200	۸۱/۵۵
	برگشتی: 5'-CCTGGCTCTCTTCTGTTTCCC-3'		
GAPDH	جلویی: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'	NM_017008	۸۲/۵۹
	برگشتی: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTAGT-3'		

تجزیه و تحلیل آماری

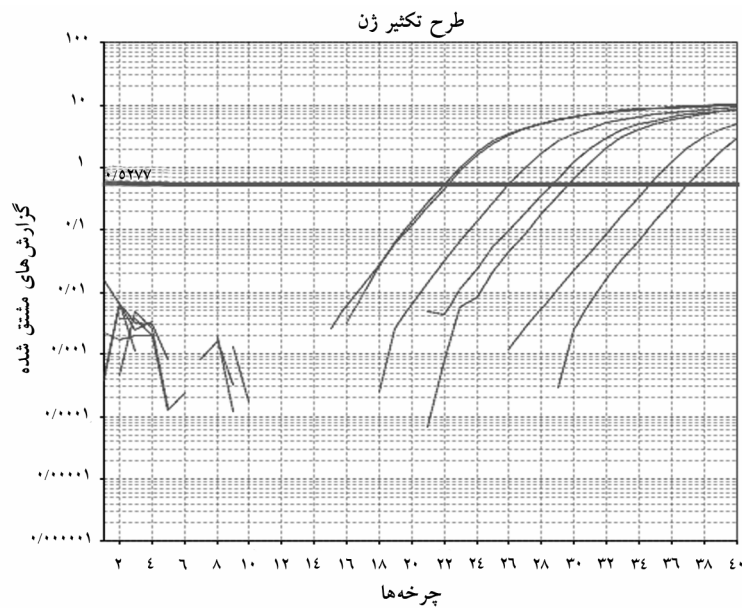
عمل آمد. سطح معنی‌داری نیز $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS/Win نسخه ۱۶ انجام گرفت.

برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای مورد مطالعه از تحلیل واریانس دو طرفه استفاده شد. برای انجام آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر LSD (Least Significant Difference) به

تأثیر تمرین استقامتی بر KIF1B در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی



شکل ۱ نمودار منحنی دمای ذوب ژن KIF1B؛ وجود انحنای در این نمودار نشان دهنده یک دمای ذوب منحصر است که عدم وجود آلودگی و عملکرد اختصاصی آغازگرها را نشان می‌دهد.



شکل ۲ نمودار بیان ژن KIF1B

استقامتی را به‌طور مداوم انجام دهند. نتایج آنالیز واریانس دو طرفه (تمرین × دیابت) نشانگر اثر معنی‌دار تمرین بر mRNA KIF1B ($F=8/29$, $P=0/003$) و اثر تعاملی ($P=0/001$).

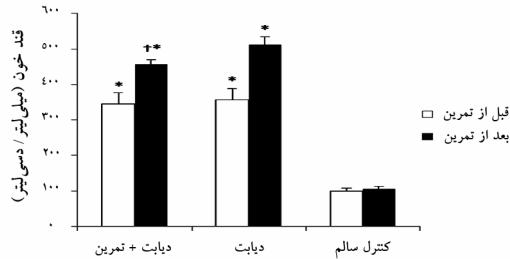
نتایج

تمام رت‌ها در گروه تمرینی توانستند ۶ هفته تمرین

$F=37/86$ بین دو متغیر فوق بود.

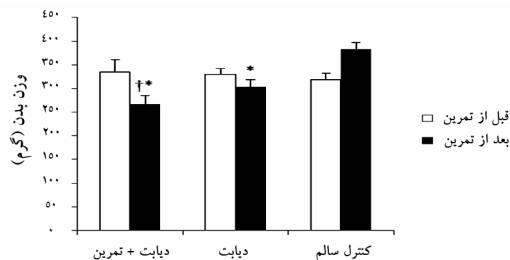
میانگین تغییرات زمان PWL در آزمون هایپرآلزیای حرارتی دو هفته پس از القای دیابت در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P=0/0001$) (شکل ۳). همچنین در همان زمان، میانگین تغییرات PWT در آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P=0/0001$) (شکل ۴).

(شکل ۵) ($P=0/0001$).



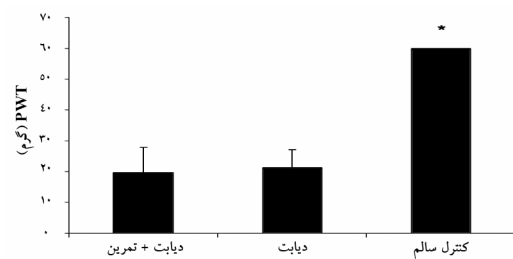
شکل ۵ تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف، * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($P<0/05$), † اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت ($P<0/05$)

وزن اولیه گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($P=0/7$). اما در پایان پژوهش میانگین تغییرات وزن گروه دیابت و دیابت + تمرین نسبت به کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (به‌ترتیب $P=0/0001$ و $P=0/001$). همچنین میانگین وزن گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه دیابت به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P=0/04$) (شکل ۶).

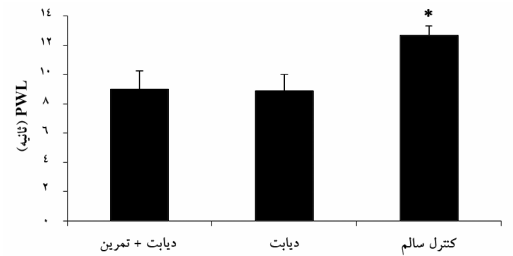


شکل ۶ تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف، * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ($P<0/05$), † اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت ($P<0/05$)

پس از ۶ هفته تمرین استقامتی، میانگین KIF1B mRNA در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P=0/03$). بیان KIF1B mRNA در گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه دیابت نیز به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($P=0/04$). همچنین بین میزان KIF1B mRNA در گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه کنترل سالم نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/32$) (شکل ۷ و جدول ۲).



شکل ۳ تغییرات PWT در آزمون هایپرآلزیای حرارتی در گروه‌های مختلف، * اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P<0/05$)



شکل ۴ تغییرات زمان PWL در آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه‌های مختلف، * اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P<0/05$)

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P=0/0001$) و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود ($P=0/0001$). همچنین در پایان برنامه تمرینی، اگر چه غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی همچنان افزایش یافته بود، اما پس از طی ۶ هفته تمرین استقامتی، غلظت گلوکز خون در گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه دیابت به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود.

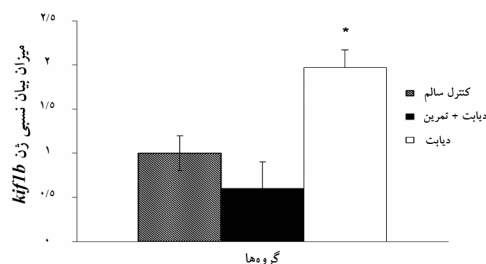
تأثیر تمرین استقامتی بر KIF1B در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی

جدول ۲ مقادیر آستانه چرخه (Cycle Threshold: CT) ژن‌های KIF1B و GAPDH در گروه‌های مختلف [میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD)]

کنترل سالم		دیابت		دیابت + تمرین		گروه
GAPDH	Kif1B	GAPDH	Kif1B	GAPDH	Kif1B	CT
۱۳/۶۴±۰/۳۴	۲۰/۹۳±۰/۴۷	۱۴/۷۹±۰/۲۸	۲۱/۱۱±۰/۴۸	۱۵/۹±۰/۳۵	۲۳/۸۷±۰/۵۱	

می‌شود. برای مثال چانگ (Chung) و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند میزان پروتئین KIF1B در نورون‌های جسم مخطط رت‌های دارای بیماری پارکینسون کاهش می‌یابد [۳۷]. این در حالی است که کیم (Kim) و همکاران (۲۰۰۶) کاهش بیان ژن KIF1B را در نورون‌های جسم سیاه رت‌های دارای بیماری پارکینسون گزارش کردند [۳۸]. پانتلیدو (Pantelidou) و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند بیان ژن KIF1B در کورتکس حرکتی بیماران ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) کاهش می‌یابد [۳۹]. از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهد که انتقال آکسونی رو به جلو p75NTR [۴۰]، BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) [۴۱] و NT-3 (Neurotrophin 3) [۴۲] در رت‌های دیابتی کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که یکی از دلایل احتمالی انتقال آکسونی کاهش یافته در نوروپاتی دیابت، می‌تواند ناشی از افزایش KIF1B mRNA به‌عنوان یک موتور پروتئینی باشد که نقل و انتقال برخی مواد توسط آن صورت می‌پذیرد.

همچنین پژوهش حاضر نشان داد تمرین استقامتی موجب جلوگیری از افزایش KIF1B mRNA در نورون‌های حسی رت‌های دارای نوروپاتی دیابت می‌شود. مالتنی (Molteni) و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند ورزش اختیاری دوییدن روی چرخ گردان، موجب افزایش نوزایش عصبی در نورون‌های حسی پس از آسیب عصب سیاتیک می‌شود. این محققین افزایش نوزایش عصبی نورون‌های حسی را به افزایش بیان ژن‌های BDNF، NT-3، synapsin I و GAP-43 نسبت داده‌اند [۴۳]. الرشدان (Alrashdan) و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند فعالیت افزایش یافته به شکل ۳۰ دقیقه تحریک الکتریکی پس از آسیب عصبی، موجب افزایش شمار نورون‌های حسی،



شکل ۷ میزان بیان ژن KIF1B در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل، * اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P < 0.05$)

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوروپاتی دیابت منجر به افزایش mRNA موتور پروتئین KIF1B در نورون‌های حسی رت‌های نر دیابتی شده توسط STZ می‌شود. وقوع نوروپاتی در بیماری دیابت، ابتدا با اختلال در عملکرد و ساختار نورون‌های حسی صورت می‌گیرد؛ به گونه‌ای که نورون‌های حسی با از دست دادن عصب‌رسانی پوست و پس‌زدگی انشعاب‌های تحتانی، مورد هدف قرار گرفته و در نهایت متحمل آتروفی شده و سرانجام عصب‌رسانی خود را از دست می‌دهند [۲۱]. همسو با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات نشان دهنده اختلالات مولکولی بسیاری نظیر تنظیم کاهش mRNA پروتئین‌های ساختاری نظیر نوروفیلانت (Neurofilament) و زیرواحدهای توبولین [۳۳] و دیگر پروتئین‌ها نظیر GAP-43 (Growth Associated Protein 43) [۳۴]، TrkA (TRK-) [۳۵] و (1-Transforming Tyrosine Kinase Protein) [۳۶] و CGRP (Calcitonin Gene-related Peptide) [۳۶] در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی شده توسط STZ هستند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند بیان ژن و میزان پروتئین KIF1B در دیگر بیماری‌های تخریب عصبی نیز دچار اختلال

تعداد آکسون‌ها، ضخامت میلین و افزایش بیان ژن BDNF در نورون‌های حسی می‌شود [۴۴]. چن (Chen) و همکاران (۲۰۱۲) آثار تمرین ورزشی بر بهبود عملکرد نورون‌های حسی را به کاهش بیان اینترلوکین ۱ بتا (Interleukin 1 β : IL-1 β) و افزایش TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) و سطوح Hsp72 در عصب سیاتیک نسبت داده‌اند [۴۵]. شارما (Sharma) و همکاران (۲۰۱۰) این موضوع را به افزایش وابسته به ورزش بیان mRNA و سطوح پروتئین NT-3 در عضله اسکلتی نسبت داده‌اند [۲۷]. این مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت افزایش یافته به شکل تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش سائتوکاین‌های (Cytokines) التهابی و پیش‌التهابی و عوامل نروتروفیک به بهبود وضعیت نورون‌های حسی بیانجامد. این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پس از طی ۶ هفته تمرین ورزشی استقامتی با شدت متوسط، اگر چه سطوح گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به زمان قبل از شروع تمرین افزایش یافته بود، اما در گروه دیابت + تمرین نسبت به گروه دیابت به‌طور معنی‌دار پایین‌تر بوده است. لازم به ذکر است که افزایش سطوح گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نشانگر مدل‌سازی صحیح نوروپاتی دیابت در پژوهش حاضر است و نشان می‌دهد که استفاده از دوز پایین STZ و مطابق با وزن حیوانات، روشی مناسبی برای القای نوروپاتی دیابت است [۲۲، ۲۳]. بنابراین در پژوهش حاضر اگر چه سایر احتمالات و ساز و کارها که در سطور پیشین مورد اشاره قرار گرفتند رد نمی‌شود؛ اما این احتمال می‌رود که ورزش از طریق آثاری که بر کاهش هایپرگلیسمی (Hyperglycemia) داشته است موجب بهبود انتقال آکسونی در نورون‌های حسی رت‌های دیابتی تمرین کرده شده است. این نتیجه همسو با تحقیقاتی است که هایپرگلیسمی القا شده توسط STZ را در توسعه اختلالات حسی نوروپاتی دیابت سهمیم دانسته‌اند و نشان داده‌اند که درمان انسولین می‌تواند به بهبود عملکرد نورون‌های حسی بیانجامد [۴۵-۴۹].

با توجه به نتایج پژوهش حاضر و مطالعات انجام شده روی

اختلالات آکسونی در دیگر بیماری‌های تخریب عصبی، می‌توان نظریه احتمالی جدیدی تحت عنوان حمل‌کننده و حامل (Cargo & Driver Theory) در زمینه انتقال آکسونی و بیماری‌های تخریب عصبی نظیر نوروپاتی دیابت که با پیشرفت بیماری، عصب‌رسانی پوست و انشعاب‌های تحتانی آکسون در اثر فراهم نشدن مواد مورد نیاز به میزان کافی دچار اختلال می‌شود [۲۱]، تلفیقی از ۲ عامل است: ۱- تنظیم کاهشی مواد مورد نیاز برای حفظ بقای عصبی که (این عامل در مطالعات متعدد [۴۲، ۵۰، ۵۱] به اثبات رسیده است) و ۲- اختلال در موتور پروتئین‌هایی که در حمل این مواد نقش ایفا می‌کنند. به‌طور کلی مجموع این دو عامل منجر به ناتوانی بقای نورون می‌شود که در بیماری نوروپاتی دیابت در بخش‌های انتهایی آکسون‌های طولی نمود پیدا می‌کند. اگر چه این موضوع به‌طور مستقیم در پژوهش حاضر ارزیابی نشده است و برای تکمیل این نظریه نیاز است که پژوهش‌های آینده بر اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین KIF1B و دیگر موتور پروتئین‌های آکسونی در نوروپاتی دیابت و دیگر بیماری‌های تخریب عصبی متمرکز شود. به‌طور کلی پژوهش حاضر پیشنهاد می‌کند یکی از عوامل احتمالی درگیر در انتقال آکسونی اختلال یافته در نوروپاتی دیابت می‌تواند ناشی از افزایش KIF1B mRNA در نورون‌های حسی باشد و تمرین استقامتی می‌تواند به عنوان یک راهبرد غیر دارویی، این افزایش را تعدیل و به سطوح طبیعی نزدیک کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود موتور پروتئین‌های آکسونی به‌عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماری دیابت مورد توجه قرار گیرد؛ هر چند که نکات متعددی در این ارتباط وجود دارد و در آینده باید مطالعه شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل رساله دکتری رشته تربیت بدنی و علوم ورزشی در گرایش فیزیولوژی ورزش است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

- [1] Chen GQ, Mou CY, Yang YQ, Wang S, Zhao ZW. Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes. *Life Sci* 2011; 89(1-2): 44-9.
- [2] Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003; 69(4): 229-85.
- [3] Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120(1): 1-34.
- [4] Klopfenstein DR, Vale RD. The lipid binding pleckstrin homology domain in UNC-104 kinesin is necessary for synaptic vesicle transport in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 2004; 15(8): 3729-39.
- [5] Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 2010; 68(4): 610-38.
- [6] Pack-Chung E, Kurshan PT, Dickman DK, Schwarz TL. A *Drosophila* kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport. *Nat Neurosci* 2007; 10(8): 980-9.
- [7] Chowdhury SK, Smith DR, Fernyhough P. The role of aberrant mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 2013; 51: 56-65.
- [8] Leandri M, Ghignotti M, Emionite L, Leandri S, Cilli M. Electrophysiological features of the mouse tail nerves and their changes in chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN). *J Neurosci Methods* 2012; 209(2): 403-9.
- [9] Sanyal SN, Wada T, Yamabe M, Anai H, Miyamoto S, Shimada T, Ono K. Synaptic degradation of cardiac autonomic nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathophysiology* 2012; 19(4): 299-307.
- [10] 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(4): 1229-39.
- [11] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77-88
- [12] Hoffman MD, Shepanski MA, Mackenzie SP, Clifford PS. Experimentally induced pain perception is acutely reduced by aerobic exercise in people with chronic low back pain. *J Rehabil Res Dev* 2005; 42(2): 183-90.
- [13] Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther* 2006; 109(1-2): 210-26.
- [14] Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain* 2007; 8(12): 989-97.
- [15] Lange-Asschenfeldt C, Kojda G. Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp Gerontol* 2008; 43(6): 499-504.
- [16] Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O.

- Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci* 2009; 29(11): 3365-73.
- [17] Bucci C, Bakke O, Progida C. Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog Neurobiol* 2012; 99(3): 191-225.
- [18] Ferraiuolo L, Heath PR, Holden H, Kasher P, Kirby J, Shaw PJ. Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci* 2007; 27(34): 9201-19.
- [19] Boudreau RL, McBride JL, Martins I, Shen S, Xing Y, Carter BJ, Davidson BL. Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 2009; 17(6): 1053-63.
- [20] Deleidi M, Hallett PJ, Koprach JB, Chung CY, Isacson O. The Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic: polycytidylic acid triggers nigrostriatal dopaminergic degeneration. *J Neurosci* 2010; 30(48): 16091-101.
- [21] Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3(6): 331-40.
- [22] Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. *Methods Mol Med* 2004; 99: 55-65.
- [23] Calcutt NA, Freshwater JD, O'Brien JS. Protection of sensory function and antihyperalgesic properties of a prosaposin-derived peptide in diabetic rats. *Anesthesiology* 2000; 93(5): 1271-8.
- [24] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77-88.
- [25] Prodanov D, Feirabend HK. Morphometric analysis of the fiber populations of the rat sciatic nerve, its spinal roots, and its major branches. *J Comp Neurol* 2007; 503(1): 85-100.
- [26] Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009; 164(4): 1665-73.
- [27] Sharma NK, Ryals JM, Gajewski BJ, Wright DE. Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin-3 synthesis in an animal model of chronic widespread pain. *Phys Ther* 2010; 90(5): 714-25.
- [28] Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996; 68(2-3): 293-9.
- [29] Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 1994; 57(3): 375-82.
- [30] Liu S, Bréjot T, Cressant A, Bacci J, Saïd G, Tadié M, Heard JM. Reinnervation of hind limb extremity after lumbar dorsal root ganglion

- injury. *Exp Neurol* 2005; 196(2): 401-12.
- [31] Berger JV, Deumens R, Goursaud S, Schäfer S, Lavand'homme P, Joosten EA, Hermans E. Enhanced neuroinflammation and pain hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats expressing mutated superoxide dismutase 1. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 33.
- [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
- [33] Moskowitz PF, Smith R, Pickett J, Frankfurter A, Oblinger MM. Expression of the class III beta-tubulin gene during axonal regeneration of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 1993; 34(1): 129-34.
- [34] Pekiner C, Dent EW, Roberts RE, Meiri KF, McLean WG. Altered GAP-43 immunoreactivity in regenerating sciatic nerve of diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45(2): 199-204.
- [35] Mohiuddin L, Tomlinson DR. Impaired molecular regenerative responses in sensory neurones of diabetic rats: gene expression changes in dorsal root ganglia after sciatic nerve crush. *Diabetes* 1997; 46(12): 2057-62.
- [36] Diemel LT, Brewster WJ, Fernyhough P, Tomlinson DR. Expression of neuropeptides in experimental diabetes; effects of treatment with nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 21(1-2): 171-5.
- [37] Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci* 2009; 29(11): 3365-73.
- [38] Kim JM, Lee KH, Jeon YJ, Oh JH, Jeong SY, Song IS, Kim JM, Lee DS, Kim NS. Identification of genes related to Parkinson's disease using expressed sequence tags. *DNA Res* 2006; 13(6): 275-86.
- [39] Pantelidou M, Zographos SE, Lederer CW, Kyriakides T, Pfaffl MW, Santama N. Differential expression of molecular motors in the motor cortex of sporadic ALS. *Neurobiol Dis* 2007; 26(3): 577-89.
- [40] Delcroix JD, Michael GJ, Priestley JV, Tomlinson DR, Fernyhough P. Effect of nerve growth factor treatment on p75NTR gene expression in lumbar dorsal root ganglia of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1998; 47(11): 1779-85.
- [41] Mizisin AP, DiStefano PS, Liu X, Garrett DN, Tonra JR. Decreased accumulation of endogenous brain-derived neurotrophic factor against constricting sciatic nerve ligatures in streptozotocin-diabetic and galactose-fed rats. *Neurosci Lett* 1999; 263(2-3): 149-52.
- [42] Fernyhough P, Diemel LT, Tomlinson DR. Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1998; 41(3): 300-6.
- [43] Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(22): 8473-8.
- [44] Alrashdan MS, Sung MA, Kwon YK, Chung HJ, Kim SJ, Lee JH. Effects of combining electrical stimulation with BDNF gene transfer on the regeneration of crushed rat sciatic nerve.

- Acta Neurochir (Wien) 2011; 153(10): 2021-9.
- [45] Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg* 2012; 114(6): 1330-7.
- [46] Lee JH, McCarty R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. *Physiol Behav* 1990; 47(2): 225-30.
- [47] Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain* 1992; 50(2): 231-6.
- [48] Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Dos Santos UD, Speckhann B, Gadotti VM, Sigwalt AR, Guglielmo LG, Santos AR. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain* 2010; 11(12): 1384-93.
- [49] Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57(1): 1-164.
- [50] Rodríguez-Peña A, Botana M, González M, Requejo F. Expression of neurotrophins and their receptors in sciatic nerve of experimentally diabetic rats. *Neurosci Lett* 1995; 200(1): 37-40.
- [51] Bitar MS, Pilcher CW, Khan I, Waldbillig RJ. Diabetes-induced suppression of IGF-1 and its receptor mRNA levels in rat superior cervical ganglia. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 38(2): 73-80.