ORIGINAL ARTICLE

# *Effect of 6-Week Endurance Training on BDNF Expression in Motor Root of Spinal Cord in Rats with Diabetic Neuropathy*

Rasoul Eslami[1],
Ghazaleh Sorkhkamanzadeh[2],
Abdol-Reza Kazemi[3],
Reza Gharakhanlou[4],
Abdol-ali Banaifar[5]

[1] Assistant professor, Department of Sports Injuries and Corrective Exercise, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Allameh Tabataba'i University, Tehran, Iran
[2] MSc of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanity, ValiAsr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
[4] Associate Professor, Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran

(Received August 10, 2014 ; Accepted May 10, 2015)

## *Abstract*

**Background and purpose:** Etiology of diabetic neuropathy is unclear, however, the accumulation of final products of glycation, vascular dysfunction, oxidative stress, and changes in neurotrophic support are considered as important factors in the genesis of this disease. The aim of this study was to investigate the effect of a 6-week endurance training program on gene expression of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the Sciatic nerve motor roots of rats with diabetic neuropathy.

**Materials and methods:** Twenty eight adult male Wistar rats in the body mass range of 271±11.2 gr, were randomly assigned into four groups: diabetic control, diabetic training, healthy control, and healthy training. For inducing diabetic neuropathy, Streptozotocin (45 mg/kg, ip body wt.) was injected after twelve hours of food deprivation. Two weeks later, the endurance training protocol was performed for six weeks and 24hr after the last training session, the rats were sacrificed and spinal cords were processed for histological examination. Real-Time PCR was used for BDNF expression. For data Analysis, two-way ANOVA and LSD post hoc test were applied.

**Results:** Data indicate that diabetes decreased BDNF expression in Sciatic nerve motor roots (P=0.05). However, 6 weeks of endurance training could partly compensate the BDNF expression decrease induced by diabetic neuropathy (P=0.05). However, this intervention could not return the BDNF expression level to that of the healthy control group (P=0.01).

**Conclusion:** This study showed that diabetes can decrease BDNF expression in Sciatic nerve motor roots. But this decrease could somewhat be improved by endurance training. Our study supports the hypothesis that neurotrophic support decreases in diabetic neuropathy.

***Keywords:*** Diabetic neuropathy, endurance training, brain derived neurotrophic factor (BDNF), spinal cord

**J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(124): 94-106 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۴ اردیبهشت سال ۱۳۹۴ (۱۰۶-۹۴)

# اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در بخش حرکتی نخاع موش های صحرایی دارای نروپاتی دیابتی

رسول اسلامی[۱]
غزاله سرخ کمان زاده[۲]
عبدالرضا کاظمی[۳]
رضا قراخانلو[۴]
عبدالعلی بنایی فر[۵]

## چکیده

**سابقه و هدف:** علت شناسی نروپاتی دیابتی نامعلوم است. با این حال، تجمع تولیدات نهایی گلیکیشن، اختلال در عملکرد عروقی، فشار اکسیداتیو و تغییر در حمایت نروتروفیکی به عنوان فاکتورهای مهم در پیدایش این بیماری مورد توجه هستند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر شش هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن BDNF در ریشه‌های حرکتی عصب سیاتیک موش های صحرایی دارای نروپاتی دیابتی است.

**مواد و روش‌ها:** ۲۸ سر موش صحرایی از نژاد ویستار با میانگین توده بدنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم به طور تصادفی در چهار گروه دیابت کنترل، دیابت تمرین، سالم کنترل و سالم تمرین قرار گرفتند. جهت القا نروپاتی دیابتی، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، از روش تزریق درون صفاقی محلول STZ (۴۵mg/kg) استفاده گردید. دو هفته پس از تزریق STZ پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت شش هفته انجام گردید و ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی بافت برداری انجام شد. بیان ژن BDNF با استفاده از تکنیک Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که دیابت باعث کاهش معنی‌دار در بیان ژن BDNF در بخش حرکتی ریشه‌های عصب سیاتیک گردید (p=۰/۰۵). با این حال، شش هفته تمرین استقامتی توانست این کاهش بیانBDNF ناشی از دیابت را تا حدودی جبران کند (p=۰/۰۵)، اما نتوانست آن را به سطح گروه کنترل بازگرداند. بین گروه کنترل سالم و تمرین دیابتی برای BDNF اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۱).

**استنتاج:** تحقیق حاضر نشان داد که دیابت می‌تواند باعث کاهش بیانBDNF در ریشه‌های حرکتی عصب سیاتیک گردد که تا حدودی با تمرین استقامتی قابل جبران است. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند نقطه روشنی بر اثبات فرضیه کاهش حمایت نروتروفیکی در نروپاتی دیابت باشد.

**واژه های کلیدی:** نروپاتی دیابتی، تمرین استقامتی، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، نخاع

## مقدمه

نروپاتی دیابتی Diabetic neuropathy یکی از عوارض شایع و پر هزینه دیابت نوع اول و دوم است. شیوع نروپاتی در بیمارانی که به تازگی دچار این بیماری می‌شوند ۸ درصد و در بیماران با سابقه طولانی،

**مولف مسئول: رسول اسلامی**- تهران، دانشکده تربیت بدنی دانشگاه علامه طباطبایی E-mail: R_eslami1000@yahoo.com
۱. استادیار، گروه آسیب شناسی و حرکات اصلاحی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علامه طباطبایی،تهران، ایران
۲. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانس، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران
۴. دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۵/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۳/۶/۲۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۲/۲۰

بیش از ۵۰ درصد تخمین زده شده است(۱). هم‌چنین شواهد رو به رشدی نیز وجود دارند که نشان می‌دهند حتی شرایط پیش دیابتی با برخی گونه‌های نروپاتی ارتباط دارد(۲). تخمین زده شده است که در ۱۵ درصد بیماران دیابتی زخم‌های ناشی از دیابت توسعه یافته(۳) و نروپاتی دیابتی عاملی است که منجر به قطع عضو ناشی از آسیب عصبی[1] می‌گردد(۴). در سال‌های اخیر، پیشرفت قابل توجهی در درک مکانیزم‌های بیوشیمیایی مربوط به نروپاتی دیابتی صورت گرفته است و در نتیجه روش‌های درمانی جدید در حال بررسی می‌باشند(۱). نروپاتی دیابتی شامل اختلال اعصاب محیطی در افراد مبتلا به دیابت ملیتوس پس از حذف دیگر عوامل ایجادکننده نروپاتی می‌باشد(۵) که با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی شامل آتروفی آکسون، میلین زدایی، کاهش تارهای عصبی و کند شدن بازسازی تارهای عصبی همراه است(۶). نروپاتی دیابتی می‌تواند منجر به علائمی از قبیل درد و از دست دادن حس شود(۷). هم‌چنین، نروپاتی می‌تواند موجب کاهش قدرت عضلانی شود که ناشی از آتروفی عضلانی پیشرونده می‌باشد(۹،۸). از طرفی، عصب رسانی ناقص نقش مهمی را در کاهش بافت عضلانی و قدرت عضلانی بازی می‌کند(۱۰). علت‌شناسی نروپاتی دیابتی نامعلوم است. با این حال، تجمع تولیدات نهایی گلیکیشن[2]، اختلال در عملکرد عروقی، فشار اکسیداتیو، و تغییر در حمایت نروتروفیکی به عنوان فاکتورهای مهم در پیدایش این بیماری مورد توجه هستند(۱۱). اطلاعات جمع‌آوری شده از مدل‌های حیوانی دیابت نشان داده است که کمبود و نقص فاکتورهای نروتروفیکی و گیرنده‌های آن‌ها در پیشرفت نروپاتی دیابتی دخیل می‌باشد(۱۲). آتروفی و حتی مرگ نرون‌ها می‌تواند به دلیل کاهش فاکتورهای رشدی در نروپاتی دیابتی ایجاد شود(۱۳).

فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز[3](BDNF) اولین عضو خانواده نوروتروفین است که شامل گروه نامتجانسی از ملکول‌های تولید شده توسط نرون‌ها، سلول‌های شوان، پایانه‌های عصبی و عضلات هدف هستند. مطالعات بسیاری نقش نوروتروفین‌ها در زمان رشد و تاثیر آن‌ها بر بقاء جمعیت‌های نورونی ویژه را مورد بررسی قرار داده‌اند(۱۵،۱۴). هم‌چنین، مشخص شده است که سیستم عصبی عضلانی از جایگاه‌هایی است که نوروتروفین‌ها تاثیرات ویژه‌ای را در آن‌جا اعمال می‌کنند. برای مثال، نوروتروفین‌ها به طور مستقیم کارایی سیناپسی را تعدیل کرده و از نقشی حیاتی در تنظیم بقاء و حفظ عملکردهای ویژه برای جمعیت گوناگون نورون‌ها[4] برخوردار هستند(۱۶،۱۴). مطالعات نشان داده‌اند که عصب برداری سبب تغییراتی در سطح نروتروفین‌های عضله شده است(۱۷)، و در چندین مطالعات حیوانی کاهش سطوح NT-3 mRNA و NGF و نیز پروتئین NGF در عضلات دیابتی مشاهده شده است. با این حال، افزایش در سطح BDNF mRNA گزارش شده است(۱۹،۱۸). هم‌چنین، آندرسِن[5] و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از تکنیک بیوپسی عضلات دوقلو[6] و دلتوئید ۴۲ نفر از افراد دیابتی را مورد بررسی قرار دادند. آندرسِن و همکاران دریافتند که نروپاتی دیابتی باعث کاهش بیان BDNF و NGF در عضلات دیستال نسبت به عضلات پروگزیمال شده است(۹). علاوه بر این، نشان داده شده است که کاهش سطوح سرمی BDNF در نتیجه دیابت همراه با اختلالات شناختی می‌باشد(۲۰). از طرفی، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که افزایش فعالیت بدنی می‌تواند حمایت تروفیکی را در اعصاب محیطی و بافت‌های هدف آن‌ها افزایش دهد. برای مثال، افزایش بسیار زیاد بیان BDNF در سرتاسر سیستم عصبی، متناسب با مسافت پیموده شده توسط حیوانات، مکرراً به دنبال دویدن

1. Nontraumatic limb amputation
2. Glycation end-products
3. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
4. Neurons
5. Andreassen
6. Gastrocnemius

اختیاری بر روی چرخ دوّار مشاهده شده است(۲۱،۲۲). اگرچه پروتکل‌های تمرینی اختیاری اغلب دوره‌های تمرینی چهار هفته‌ای و بیش‌تر را به کار گرفته‌اند، اما افزایش عمده‌ای نیز در بیان BDNF به دنبال دوره‌های ۳ تا ۷ روزه در نخاع شوکی ناحیه کمر و عضله سولئوس دیده شده است(۲۳). بنابراین، باتوجه به این فرضیه که بیان نوتروفیک در عضله اسکلتی به سبب نروپاتی تغییر می‌کند و میل به کاهش دارد و، از طرف دیگر، افزایش فعالیت بدنی باعث افزایش بیان آن می‌شود، ما انتظار خواهیم داشت که بیان نوتروفین BDNF با افزایش قابلیت حرکتی و فعالیت بدنی در شرایط دیابت تنظیم مثبت شود.

## مواد و روش ها

*حیوانات و شرایط نگهداری*

تحقیق حاضر از نوع تجربی بوده که برای این منظور ۲۸ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با ۱۰ هفته سن و میانگین وزنی ۱۱/۲±۲۷۱ گرم از انستیتو رازی خریداری شد. کلیه موش‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید و رسیدن به وزن مطلوب ۸/۴±۳۲۶/۳ گرم(۲۴) موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه هفت تایی، دیابت تمرین کرده (DTG)[1]، گروه دیابت کنترل (DCG)[2]، گروه سالم تمرین کرده (HTG)[3] وگروه سالم کنترل (HCG)[4] تقسیم شدند. کلیه مراحل اجرای مطالعه حاضر در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در طول مرحله آشناسازی، به منظور سازگار شدن به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری، حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند.

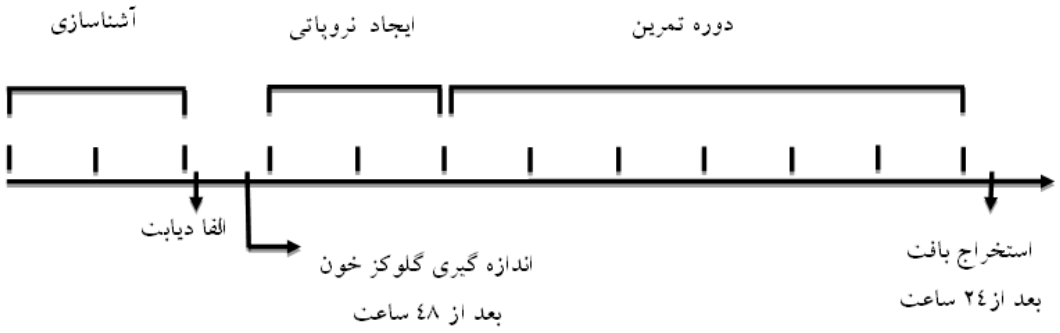
*نحوه القا دیابت توسط STZ*

پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول STZ (Sigma, St.Louis, MO؛ mg/Kg ۴۵ حل شده در بافر سیترات تازه mol/L ۰/۵ ، PH:۴/۵) دیابت القا گردید. به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست روی ورید دم موش‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) خوانده شد. موش‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از mg/dL ۳۰۰ بود، به‌عنوان موش‌های دیابتی وارد مطالعه حاضر شدند(۲۴). لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه علائم ناشی از تزریق اشتباه نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید. دو هفته پس از القا دیابت پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته انجام گردید و تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد. در طول دوره تحقیق، وزن حیوانات به صورت هفتگی و منظم در انتهای هر هفته اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. اندازه‌گیری وزن با استفاده از ترازوی دیجیتال و با دقت یک گرم انجام شد. هم‌چنین، اندازه‌گیری قند خون نیز در ابتدا و انتهای پروتکل تمرین و برای تمام گروه‌ها انجام گرفت. برای اندازه‌گیری قند خون از دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) استفاده شد.

*برنامه تمرینی*

در مطالعه حاضر از شدت تمرینی متوسط (۵۰ تا ۵۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و در عین حال کارآمد از لحاظ فیزیولوژیک استفاده گردید(۲۵). بدین صورت

1. Diabetic Training Group
2. Diabetic Control Group
3. Healthy Training Group
4. Healthy Control Group




**تصویر شماره ۱:** طرح شماتیک ۱۲ هفته‌ای اجرای مراحل مختلف در مطالعه حاضر

که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوارگردان با شدت متوسط برای ۵ روز در هفته و به مدت شش هفته قرار گرفتند. 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 تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ 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 افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی ثابت نگه داشته شدند(۲۵). هم‌چنین، از هیچ گونه شوک تمرینی در طول برنامه تمرین استقامتی استفاده نگردید و در صورت لزوم با استفاده از تیمار حیوانات و یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین می‌گردیدند.

*آزمون‌های رفتاری آلودنیای مکانیکی و هایپر آلژزیای حرارتی*

برای اطمینان از وجود نروپاتی در حیوانات دیابتی از گروه‌های دیابت کنترل و دیابت تمرین آزمون‌های آلودنیای مکانیکی و هایپر آلژزیای حرارتی به عمل آمد. هایپرآلژزیای حرارتی با استفاده از روش هارگریوز و همکاران (۱۹۹۸) مورد سنجش قرار گرفت(۲۶). به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil, Italy) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول ۲۲ cm × عرض ۲۲ cm × ارتفاع ۱۳/۳ cm) و بر روی یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار می‌گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه‌جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار می‌گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال می‌شد و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف می‌گردید و با ثبت زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه (PWL[1]) میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار می‌گرفت. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه برای سه بار آزمایش می‌شد و میانگین آن‌ها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت می‌گردید. هم‌چنین، جهت جلوگیری از آسیب بافتی، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. در نهایت، پردردی حرارتی به عنوان درصد حداکثر اثر ممکن با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌گردید:

((تاخیر پایه-زمان cut off)/(تاخیر پایه-تاخیر پس از تزریق استرپتوزین)×۱۰۰)=%MPE. به علاوه، میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تاخیر پایه در نظر گرفته شد(۲۷).

هم‌چنین به منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه

1. Paw Withdrawal Latency

پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفت. به منظور عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار می‌گرفتند. جهت سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stolting (USA) برای سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کم‌ترین وزن شروع می‌شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده می‌گردید. چنانچه دو بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌شد، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) محسوب می‌شد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. در صورتی که حیوان به هیچ یک از تارها از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. هم‌چنین، هر آزمایش سه بار و به تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید(۲۸). به طور کلی، سنجش آلودینای مکانیکی و هایپرآلژزیای حرارتی قبل از تزریق STZ و ۱۴ روز پس از تزریق به عمل آمد. نتایج نشان داد که از بین ۱۴ حیوان مبتلا به دیابت همگی نشانه‌های نروپاتی را از خود بروز دادند. بنابراین، این دو آزمون وجود نروپاتی دیابتی را در حیوانات گروه دیابت کنترل و دیابت تمرین تایید کرد.

*استخراج بافت*

در پایان شش هفته برنامه تمرینی، ۱۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیب زایلازین و کتامین بیهوش شده و تحت شرایط استریل بخش حرکتی سگمنت‌های نخاعی L4، L5 و L6 جدا شد. بافت مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید و این نمونه تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر $^0C$ ۷۰- منجمد و نگهداری شد.

*استخراج RNA و سنتز cDNA*

حدود ۵۰ میلی گرم بافت نخاعی به صورت جداگانه جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در $4^0C$، ۱۰min، 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 $^0C$ ۴، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. سپس بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در $^0C$ ۴، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در 20Lμ آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از gμ1 از RNA و با به کارگیری Random hexamer primer و آنزیم transcriptase Mmulv Reverse انجام گرفت.

*Real time – PCR*

۱- جهت اندازه‌گیری سطوح بیان NGF mRNA از روش کّمی Real time-PCR با به کارگیری Primix syber green II استفاده شد (Applied USA Biosystems,). مخلوط واکنش در حجم نهایی 20Lμ و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های BDNF و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ گزارش شده است (از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید). برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، و ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$

**جدول شماره ۱:** توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

| Genes | Primer sequence | Product size | Tm | Gene Bank |
|---|---|---|---|---|
| BDNF | For: 5′- CGACGTCCCTGGCTGACACTTTT -3′<br>Rev: 5′- GTAAGGGCCCGAACATACGATTGG-3′ | 491bp | 59.39<br>58.64 | NM_012513.3 |
| GAPDH | For: 5′- GACATGCCGCCTGGAGAAAC -3′<br>Rev: 5′- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT -3′ | 92bp | 60.8<br>60.2 | NM_017008 |

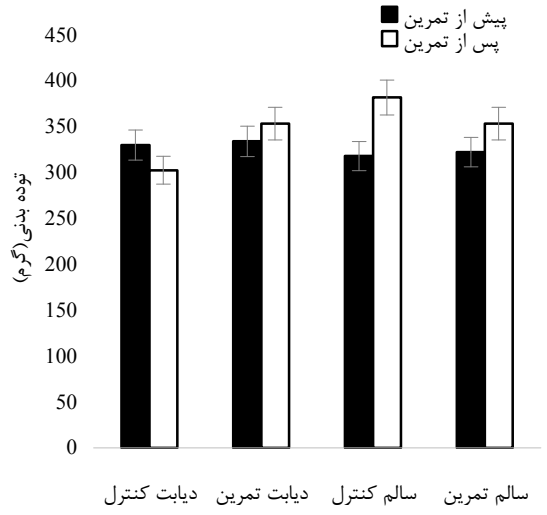
اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از اختصاصی عمل کردن پرایمرها بخشی از مستر میکس با PCR معمولی ران می‌گردید و محصول بر روی ژل آگاروز برده می‌شد و در صورت نیاز نیز برای تعیین توالی ارسال می‌گرید.

*تجزیه و تحلیل آماری*

تمامی داده‌ها براساس میانگین± انحراف استاندارد توصیف شده‌اند. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، و همسان بودن واریانس‌ها از آزمون Leven استفاده شد. با توجه به این که تحقیق حاضر یک طرح عملی ۲*۲ بود جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها و تعامل متغیرها از تحلیل واریانس دوطرفه[1] و آزمون تعقیبی LSD[2] استفاده گردید. سطح معناداری نیز $p\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

## یافته ها

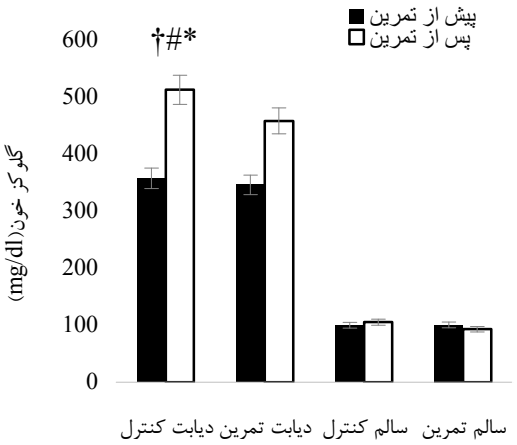
نتایج مربوط به تغییرات توده بدنی طی شش هفته برای هر چهار گروه در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که شش هفته دیابت باعث کاهش وزن معنی داری در این گروه نسبت به پیش آزمون شده است (p<۰/۰۱) که حاکی از آتروفی ناشی از دیابت می‌باشد. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین گروه دیابت تمرین کرده با دیابت کنترل (p<۰/۰۱) و گروه سالم کنترل و تمرین کرده (p<۰/۰۱) وجود دارد که نشان می‌دهد هرچند تمرین استقامتی از این کاهش وزن ناشی از دیابت کاسته است اما نتوانسته آن را کاملاً جبران نماید.




**نمودار شماره ۱:** تغییرات توده بدن در گروه های مختلف.
* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین نکرده (p<۰/۰۱)؛
# اختلاف معنی دار با گروه سالم تمرین کرده (p<۰/۰۱)؛
† اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت تمرین نکرده (p< ۰/۰۱).

هم‌چنین، داده های مربوط به گلوکز پلاسمای پیش و پس آزمون چهار گروه نشان می‌دهد که در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر بود (p=۰/۰۰۰۱) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز هم‌چنان از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود (p=۰/۰۰۰۱). به علاوه، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابتی تمرین کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (p=۰/۰۰۰۱) که نشان می‌دهد شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی موش‌های دیابتی شود (نمودار شماره ۲).

1. Two Way ANOVA
2. Post Hoc LSD Test




**نمودار شماره ۲:** تغییرات گلوکز پلاسما در گروه های مختلف.
* اختلاف معنی دار با گروه سالم تمرین نکرده (p<۰/۰۱)؛
# اختلاف معنی‌دار با گروه سالم تمرین کرده (p<۰/۰۱)؛
† اختلاف معنی دار با گروه دیابت تمرین نکرده (p< ۰/۰۱).

میانگین CTها برای ژن‌های BDNF و GAPDH برای چهار گروه در جدول شماره ۲ آمده است. به علاوه، نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که برای BDNFmRNA بین گروه سالم کنترل و دیابت کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۵) یعنی دیابت باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن BDNF در ریشه‌های حرکتی عصب سیاتیک شده است. هم‌چنین، تمرین استقامتی به تنهایی نتوانست تغییری در بیان ژن BDNF ایجاد کند (p=۰/۲۹۹). با این حال، این نتایج نشان داد که مقادیر BDNFmRNA گروه دیابتی تمرین کرده در مقایسه با گروه دیابت کنترل بالاتر بود، اما در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری پایین تر بود (p=۰/۰۱). به عبارت دیگر، شش هفته تمرین توانسته است این کاهش بیانBDNF ناشی از دیابت را تا حدودی جبران کند اما نتوانسته آن را به سطح اولیه خود بازگرداند.

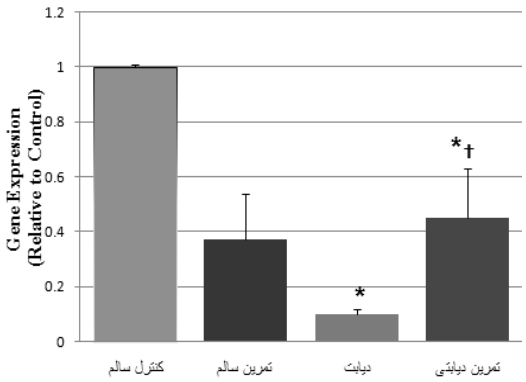
**جدول شماره ۲:** میانگین CTها برای ژن ها در چهار گروه

| گروه / ژن | تمرین سالم | کنترل سالم | دیابت تمرین | دیابت کنترل |
|---|---|---|---|---|
| BDNF | ۲۷/۶۱ | ۲۸/۰۶ | ۲۶/۹۳ | ۲۸/۹۱ |
| GAPDH | ۱۸/۳۹ | ۲۱/۶۴ | ۱۷/۷۵ | ۱۸/۵۱ |

## بحث

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر شش هفته فعالیت بدنی به شکل تمرین استقامتی بر بیان ژن BDNF در بخش حرکتی نخاع موش‌های دارای دیابت بود. نتایج نشان داد که دیابت به تنهایی باعث آتروفی و کاهش وزن می‌شود. نکته قابل توجه این است که با توجه به مقایسه درون گروهی (پیش و پس آزمون) شش هفته تمرین استقامتی توانسته است از بروز این آتروفی در گروه دیابت تمرین کرده جلوگیری کند اما زمانی که با گروه کنترل سالم و تمرین کرده مقایسه می‌شوند مشخص می‌شود که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود دارد که نشان می‌دهد اگرچه شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث جلوگیری از کاهش وزن شود اما نتوانسته افزایش وزن طبیعی در طول دوره شش هفته را در گروه دیابت تمرین کرده ایجاد کند (نمودار شماره ۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین استقامتی تنها قسمتی از آتروفی عضلانی ناشی از دیابت را جبران می‌کند و توانایی جبران کامل آن را ندارد. به علاوه، نتایج تحقیقات نشان داد که در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی‌داری بالاتر بود و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز هم‌چنان از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود. با این حال، در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابتی تمرین کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به طور معنی‌دار پایین‌تر بود که نشان می‌دهد شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی موش‌های دیابتی شود (نمودار شماره ۲). این یافته با نتایج تحقیقات متعددی هم‌سو است(۳۰،۲۹). مکانیسم‌های احتمالی برای این کاهش وجود دارد که در این میان می‌توان به افزایش حساسیت انسولینی و افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های گلوکز (Glut4) اشاره کرد(۳۰،۲۹). هم‌چنین، نتایج نشان داد که دیابت باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن BDNF در ریشه‌های حرکتی عصب سیاتیک شده است. شواهد

زیادی نشان می‌دهد که BDNF یک تعدیل کننده قوی برای تحریک نورون و انتقال سیناپسی می‌باشد(۳۱). به نظر می‌رسد که وجود BDNF برای پتانسیل طولانی مدت (LTP) مناسب ضروری است زیرا حیواناتی که در آن‌ها حذف ژنتیکی ژن BDNF اتفاق افتاده است نمی توانند LTP را از خود نشان دهند(۳۲)، در حالی که استفاده اگزوژنزی از BDNF، LTP را در این حیوانات احیا می‌کند(۳۳). در نورون‌های حرکتی نخاع، BDNF پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریک‌کننده در تک سیناپس را تسهیل می‌کند(۳۴). مشخص شده است که رسیدن BDNF به نخاع آسیب دیده، حرکت اندام های عقبی را تحریک می‌کند(۳۵). هم‌چنین، BDNF بیان مولکول‌های مهمی از جمله سیناپسین را تعدیل می‌کند که برای انتقال سیناپسی بسیار مهم است. سیناپسین ۱ یک فسفوپروتئین وزیکولی می‌باشد که سنتز(۳۶) و فسفریلاسیون(۳۷) آن از طریق BDNF تنظیم می‌شود. سیناپسین۱ به شکل‌پذیری سیناپسی از طریق تعدیل انتشار فرستنده(۳۶)، تشکیل و حفظ ساختار پیش سیناپسی(۳۸) و طویل شدن آکسون(۳۹) کمک می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نوروتروفین‌ها و به طور ویژه BDNF از نقش بسیار مهمی در فعالیت عصبی- عضلانی برخوردار است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش بیان ژن BDNF در ریشه حرکتی عصب سیاتیک می‌شود که این موضوع تاییدی بر نظریه کاهش حمایت تروفیکی به عنوان یکی از عوامل بروز نروپاتی دیابتی است. در همین راستا، تحقیقات دیگری نیز نقش نوروتروفین‌هایی ازجمله NGF را در نروپاتی دیابتی آشکار کرده‌اند. یافته‌های حاصل از پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند که دیابت با کاهش در انتقال رو به عقب NGF و بیان کم‌تر ژن و پروتئین NGF (۴۰) و گیرنده‌های p75 و TrkA (۲۵) در بافت‌های هدف نرون‌های حسی محیطی همراه می‌باشد. نقش NGF در اتیولوژی نروپاتی حسی دیابتی به دنبال نقص در حمل رتروگراد I-NGF در عصب سیاتیک(۴۱) و روده موش‌های دیابتی نشان داده شده است. این مطالعات رابطه واضح و آشکاری را بین نمود ناقص NGF در بافت‌های هدف اندام تحتانی اثبات کرده‌اند که حمل رتروگراد NGF اندوژنز به گانگلیون های ریشه خلفی کمر(۱۸) و نمود نوروپپتیدها، پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین و ماده P را کاهش می دهد که هدف‌های نورونی برای NGF در تارهای نوع C می‌باشند(۴۲). به علاوه، تمرین استقامتی کاهش غیر معنی‌دار BDNFmRNA در گروه تمرین سالم را در پی‌داشت. در توضیح این مورد باید گفت که در زمان تمرینات ورزشی نیازمندی به پروتئین BDNF تا حد زیادی افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند باعث افزایش ظرفیت پس‌نسخه برداری شود. به عبارتی، سرعت سنتز پروتئین نسبت به میزان نسخه‌برداری آن بالاتر می‌رود که این خود می‌تواند دلیل کم‌تر بودن میزان BDNFmRNA در گروه تمرین سالم نسبت به گروه کنترل باشد(۴۳). هم‌چنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر BDNFmRNA گروه دیابتی تمرین کرده در مقایسه با گروه دیابت کنترل به طور معنی‌داری بالاتر است اما در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. به عبارت دیگر، شش هفته تمرین توانسته است این کاهش بیانBDNF ناشی از دیابت را تا حدودی جبران کند اما نتوانسته آن را به سطح اولیه خود بازگرداند (نمودار شماره ۳). تحقیقات




**نمودار شماره ۳:** مقدار BDNFmRNA در گروه ها.
* اختلاف معنی‌دار با گروه سالم کنترل($P$=۰/۰۵)؛
† اختلاف معنی دار با گروه دیابت ($P$=۰/۰۱).

قبلی مشخص کرده‌اند که بیان BDNF به سرعت تحت تأثیر فعالیت فیزیکی قرار می‌گیرد، به طوری‌که سطوح آن به طور معنی‌داری حتی پس از شش ساعت فعالیت ورزشی اختیاری در موش‌ها افزایش نشان داد که این افزایش با ازدیاد سلول‌های عصبی و نورون‌زایی در ارتباط بود(۴۴). در مقابل، در موش‌هایی که فعالیت ورزشی با شدت زیاد انجام دادند، ارتباط معکوسی بین شدت تمرین و افزایش عوامل نوروتروفیک مشاهده شد که نشان می‌دهد محدودیت‌هایی در نورون‌زایی ناشی از فعالیت ورزشی در برنامه‌های تمرینی وجود دارد و فعالیت ورزشی با شدت متوسط منجر به افزایش BDNF می‌شود(۴۵). به تازگی شواهدی به دست آمده است که نشان می‌دهد فعالیت ورزشی موجب پیشبرد شکل‌پذیری نورونی مغز می‌شود که با افزایش فاکتورهای نوروتروفیک مانند BDNF ناشی از فعالیت ورزشی ارتباط دارد ولی ساز و کار عمل آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است(۴۶). هرچند تحقیقات قبلی تاثیرپذیری BDNF از تمرینات ورزشی را نشان داده‌اند، اما تاکنون کسی تاثیر تمرینات ورزشی بر بیان BDNF در ریشه‌های حرکتی و حسی عصب سیاتیک افراد دیابتی را مورد بررسی قرار نداده است. از این‌رو، پژوهش حاضر برای اولین بار این موضوع را مورد بررسی قرار داد که نتایج آن حاکی از تاثیر مثبت تمرین ورزشی بر بیان ژن BDNF در افراد دیابتی بود. با این حال، این موضوع نیازمند بررسی بیش‌تری توسط تحقیقات آینده است.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که در مجموع، تحقیق حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش بیان ژن BDNF در ریشه حرکتی عصب سیاتیک می‌شود. با این حال، شش هفته تمرین استقامتی توانسته است این کاهش بیانBDNF ناشی از دیابت را تا حدودی جبران کند اما نتوانسته آن را به سطح اولیه خود بازگرداند. نتایج این تحقیق می تواند نقطه روشنی بر اثبات فرضیه کاهش حمایت نوروتروفیکی در نروپاتی دیابتی باشد.

## References

1. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. Diabetes Care 2005; 28(4): 956-962.
2. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. Diabetes 2003; 52(12): 2867-2873.
3. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. Diabetes Care 2003; 26(6): 1790-1795.
4. Thomas PK. Diabetic peripheral neuropathies: their cost to patient and society and the value of knowledge of risk factors for development of interventions. Eur Neuro 1999; 41(Suppl 1): 35-43.
5. Bril V. Treatments for diabetic neuropathy. Journal of the Peripheral Nervous System 2012; 17(suppl 2): 22-27.
6. Farmer K. The Effect Of Voluntary Exercise On Neuropathic Pain: University of Kansas; 2010.
7. Kluding PM, Pasnoor M, Singh R, Jernigan S, Farmer K, Rucker J, et al. The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. J Diabetes Complications 2012; 26(5): 424-429.
8. Andreassen CS, Jakobsen J, Flyvbjerg A, Andersen H. Expression of neurotrophic factors in diabetic muscle—relation to neuropathy and muscle strength. Brain 2009; 132 (Pt 10): 2724-2733.

9. Andreassen CS, Jakobsen J, Andersen H. Muscle weakness: a progressive late complication in diabetic distal symmetric polyneuropathy. Diabetes 2006; 55(3): 806-812.
10. Andersen H, Stalberg E, Gjerstad MD, Jakobsen J. Association of muscle strength and electrophysiological measures of reinnervation in diabetic neuropathy. Muscle Nerve 1998; 21(12): 1647-1654.
11. Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. Nat Rev Neurosci 2008; 9(1): 36-45.
12. Boucek P. Advanced Diabetic Neuropathy: A Point of no Return? Rev Diabet Stud 2006; 3(3): 143-147.
13. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Prog Neurobiol 2003; 69(4): 229-285.
14. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Nakano H, Li YJ, et al. A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. Brain Res 2001; 907(1-2): 1-19.
15. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. J Cell Biol 1993; 123(2): 455-465.
16. Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, Verge VM, Moulton R, Boland P, et al. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. J Neurosci 1995; 15(2): 1044-1056.
17. Kust BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol 2002; 177(2): 419-427.
18. Fernyhough P, Diemel LT, Tomlinson DR. Target tissue production and axonal transport of neurotrophin- 3 are reduced in streptozocin-diabetic rats. Diabetologia 1998; 41(3): 300-306
19. Fernyhough P, Diemel LT, Hardy J, Brewster WJ, Mohiuddin L, Tomlinson DR. Human recombinant nerve growth factor replaces deficient neurotrophic support in the diabetic rat. Eur J Neurosci 1995; 7(5): 1107-1110.
20. Zhen YF, Zhang J, Liu XY, Fang H, Tian LB, Zhou DH, et al. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes. Psychopharmacology 2013; 227(1): 93-100.
21. Deschenes MR, Tenny KA, Wilson MH. Increased and Decreased Activity Elicits Specific Morphological Adaptations of the Neuromuscular Junction. Neuroscience 2006; 137(4): 1277-1283.
22. Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required formyelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. Eur J Neurosci 2000; 12(12): 4171-4180.
23. Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediatedmechanism that promotes neuroplasticity. J Neurophysiol 2002; 88(5): 2187-2195.
24. Calcutt NA. Modeling Diabetic Sensory Neuropathy in Rats. In: Luo ZD, editor. Pain Research. Methods in Molecular Medicine 2004; 99: 55-65.
25. Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. 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. J Physiol Biochem 2011; 67(2): 235-241.

26. 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.
27. Talbot S, Théberge-Turmel P, Liazoghli D, Sénécal J, Gaudreau P, Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent. Journal of Neuroinflammation 2009; 6: 11.
28. 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): 375-382 .
29. Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, Mandarino LJ. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Metabolism 2004; 53(9): 1233-1242.
30. Sriwijitkamol A, Coletta DK, Wajcberg E, Balbontin GB, Reyna SM, Barrientes J, et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. Diabetes 2007; 56(3): 836-848.
31. Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, Bothwell M. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. Neuron 1992; 9(6): 1081-1088.
32. Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice. Eur J Neurosci 1997; 9(12): 2581-2587.
33. Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. Neuron 1996; 16(6): 1137-1145.
34. Mendell LM, Arvanian VL. Diversity of neurotrophin action in the postnatal spinal cord. Brain Res Brain Res Rev 2002; 40(1-3): 230-239.
35. Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. Exp Neurol 1998; 154(1): 170-184.
36. Wang T, Xie K, Lu B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. J Neurosci 1995; 15(7 pt 1): 4796-4805.
37. Jovanovic JN, Benfenati F, Stow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelecch SL, et al. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(8): 3679-3683.
38. Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, et al. Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. J Cell Biol 1995; 131(6 Pt 2): 1789-1800.
39. Akagi S, Mizoguchi A, Sobue K, Nakamura H, Ide C. Localization of synapsin I in normal fibers and regenerating axonal sprouts of the rat sciatic nerve. Histochem Cell Biol 1996; 105(5): 365-373.
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): 1779-1785.

41. Jakobsen J, Brimijoin S, Skau K, Sidenius P, Wells D. Retrograde axonal transport of transmitter enzymes, fucose- labeled protein, and nerve growth factor in streptozotocindiabetic rats. Diabetes 1981; 30(10): 797-803.
42. Apfel, Arezzo JC, Brownlee M, Federoff H, Kessler JA. Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. Brain Res 1994; 634(1): 7-12.
43. Eslami R, Gharakhanlou R, Mowla SJ, Rajabi P, Mohammadkhani R. Effect of one session of resistance exercise on protein content and mRNA expression of NT4/5 in rat slow and fast muscles. J Gorgan Uni Med Sci 2014; 16(1): 35-41.
44. Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage F. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiaton in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(23): 13427-13431.
45. Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, et al. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain derived neruotropic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. J Neuroimmunol 2003; 138(1-2): 99-105.
46. Egan M F, Kojima M, Calicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al.BDNF val66 net polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 2003; 112(2): 257-269.