مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و سوم، شماره‌ی ۳، صفحه‌های ۱۶۸ ـ ۱۶۰ (مرداد ـ شهریور ۱۴۰۰)

مقاله‌ی پژوهشی

اثر تمرین هوازی و ملاتونین بر بیان ژن COX-2 در بافت نخاع و پاسخ‌های رفتاری درد نوروپاتیک در مدل موش صحرایی دیابتی

طیبه بیگدلی ، احمد کاکی

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: اهواز، بزرگراه گلستان، فرهنگ شهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز - گروه فیزیولوژی ورزشی، کد پستی ۳۷۳۳۳۳-۶۱۳۴۹ صندوق پستی ۱۹۱۵، دکتر احمد کاکی؛ e-mail: ahvaz.kaki@yahoo.com

چکیده

مقدمه: التهاب عصبی نقش مهمی در پیدایش بسیاری از تغییرات نورولوژیک در بیماران دیابتی ایفا می‌کند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین هوازی و ملاتونین بر بیان **COX-2** در بافت نخاع و هم‌چنین پاسخ‌های رفتاری به درد ناشی از نوروپاتی دیابتی در مدل موش صحرایی می‌باشد. مواد و روش‌ها: چهل سر موش صحرایی نر ویستار ۸ هفته‌ای (محدوده وزنی ۱۱/۳±۲۰۴ گرم) به‌طور تصادفی در پنج گروه ۸ سری، شامل: نوروپاتی دیابتی (تزریق درون صفاقی ۵۰ میلی‌گرم استرپتوزوسین/کیلوگرم وزن بدن)، نوروپاتی دیابتی و مصرف ملاتونین (تزریق۱۰ میلی‌گرم ملاتونین/کیلوگرم وزن بدن، روزانه به مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابتی و تمرین (۳۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت ۱۵ متر در دقیقه، ۵ روز در هفته به مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابتی همراه با مصرف ملاتونین و تمرین، و شاهد قرار گرفتند. پس از تأیید ایجاد نوروپاتی دیابتی توسط آزمون‌های رفتاری، برنامه ی تمرین و مصرف مکمل اجرا گردید. میزان بیان ژن **COX-2** در بافت نخاع با روش **Real-time PCR** اندازه‌گیری شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید. یافته‌ها: تمرین و ملاتونین موجب کاهش حساسیت سیستم عصبی به هایپرآلژزیا حرارتی و آلودینیای مکانیکی در گروه‌های نوروپاتی دیابتی همراه با تمرین و ملاتونین گردید (P=۰/۰۲۶). تمرین هوازی به همراه ملاتونین باعث کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن **COX-2** نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی شد (P=۰/۰۰۱). نتیجه‌گیری: تمرین هوازی همراه با تزریق ملاتونین می‌تواند میزان بیان ژن **COX-2** را کاهش و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل درد زا را بهبود بخشد. پیشنهاد می‌شود از تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین به‌منظور کاهش درد نوروپاتیک استفاده شود.

واژگان کلیدی: ژن سیکلواکسیژناز ۲، درد نوروپاتیک، دیابت، تمرین هوازی، ملاتونین

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۱ـ دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۱/۲/۲۴ ـ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۲۶

مقدمه

یکی از شایع‌ترین عوارض ناشی از بیماری دیابت، اختلال در سیستم عصبی است، در بیش از ۶۰ درصد افراد مبتلابه دیابت، آسیب به نورون‌های محیطی تشخیص داده‌شده است.[1] نوروپاتی محیطی دیابت در مراحل اولیه پیدایش، اغلب با افزایش فعالیت فیبرهای عصبی حسی همراه است. به‌طوری‌که؛ حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های آسیب‌رسان (هایپرآلژزیا) و محرک‌های غیر آسیب‌رسان (آلودینیای مکانیکی) افزایش و آستانه رفتارهای درد نوروپاتی (آزمون صفحه‌ی داغ افزایش پاسخ درد و آزمون آلودینیا مکانیکی جهت تعیین آستانه درد) کاهش می‌یابد.[2] تحقیقات نشان داده‌اند که التهاب عصبی نقش مهمی در پیدایش بسیاری از این تغییرات نورولوژیک در بیماران دیابتی ایفا می‌کند.[3] بر اساس شواهد موجود به نظر می‌رسد که هایپرگلیسمی طولانی‌مدت موجب بد تنظیمی سلول‌های میکروگلیا شده که استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی را، که دو عامل مهم در ایجاد درد نوروپاتیک دیابتی هستند، به دنبال می‌آورد.[4,5] بنابراین شناسایی و مهار مسیرهای پیام رسان درگیر در درد نوروپاتیک دیابتی براثر التهاب عصبی،

راهی برای دست یافتن به درمان‌های جدید برای بیماران دیابتی، می‌گشاید. گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که بیان ژن آنزیم سیکلواکسیژناز ۲[i] (**COX-2**) در اعصاب محیطی بیماران دیابتی؛ به صورت مثبت تنظیم می‌شود. **COX-2** آنزیم کاتالیز کننده مسیر تولید پروستاگلاندین‌ها[ii] از اسید آراشیدونیک است.[۶] افزایش بیان **COX-2**، منجر به اختلال در تولید و عملکرد **PGs** و متعاقب آن فعال شدن واکنش‌های التهابی پائین‌دست می‌شود. از طرفی، **COX-2** القاء پذیر بوده و در اثر فعالیت محرک‌هایی ازجمله؛ فاکتور رشدی، آسیب بافتی، استرس اکسیداتیو، فعال شدن پروتئین کیناز **C** و التهاب مزمن تنظیم مثبت می‌شود.[۷] مطالعه‌ی اثرات متقابل و آبشاری آنزیم‌های دخیل در التهاب و درد، موجد این فرضیه بود که می‌توان با مهار آنزیم **COX-2** و سرکوب این چرخه، مسیری مؤثر در کاهش عوامل التهابی و اثر محافظتی در برابر نقص‌های مختلف نوروپاتی دیابتی ایجاد کرد. نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان داده، فعالیت‌های ورزشی با اثرگذاری بر جنبه‌های گوناگونی از مسیرهای ملکولی سلول‌های عصبی ازجمله، افزایش سطوح پروتئین‌های شوک گرمایی، افزایش سطوح سایتوکین های ضدالتهابی، کاهش فعالیت میکروگلیاهای نخاع، تنظیم افزایشی نوروترفین ها و کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد توانسته است از تخریب پیش‌رونده نورون‌های حسی جلوگیری کند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل درد زا را کاهش دهد.[۸-۱۰] امروزه محرز شده که ملاتونین فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی ازجمله؛ آنالژزی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد آپوپتوز در بدن دارد.[۱۱] ملاتونین پس از عبور از غشاءهای زیستی سلول‌های عصبی، با تنظیم مثبت بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، باعث توقف پروسه التهاب عصبی می‌شود.[۱۲] از طرفی، شواهدی بر تأثیرگذاری تمرین هوازی و ملاتونین بر پاسخ‌های رفتاری درد نوروپاتیک دیابتی وجود دارد، اما تاکنون تأثیر این عوامل بر مهار مسیر التهابی **COX-2** مورد ارزیابی قرار نگرفته است؛ بنابراین فرض تحقیق بر این است که تمرین هوازی به همراه ملاتونین با اثر هم‌افزایی که در مهار این آنزیم خواهند داشت، تأثیر بسزایی در کاهش سطح التهاب و درد نوروپاتیک دیابتی ایفا خواهند کرد.

مواد و روش‌ها

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. تعداد ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفتگی با محدوده وزنی ۱۱/۳±۲۰٤ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه و در گروه‌های چهارتایی در قفس‌های استاندارد پلی کربنات در شرایط دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی – روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگه‌داری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نوار گردان و دست‌کاری، موش‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه (**n = ۸**) نوروپاتی دیابتی، نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین، نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین و شاهد تقسیم شدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز با کد (IR.IAU.AHVAZ.REC.1399.098) مورد تایید قرار گرفت.

القاء دیابت: پس از اتمام پروتکل آشناسازی و متعاقب ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القاء دیابت با تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوتوسین[iii] (شرکت سیگما، آمریکا)؛ حل‌شده در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH:٤/٥ ٥٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌منظور ایجاد دیابت نوع ۱ صورت گرفت.[۱۳،۱٤] به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH:٤/٥ به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. ٤٨ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست[iv] خون‌گیری بر روی سیاهرگ دم، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (گلوکوترند ۲، شرکت روشه، آلمان) اندازه‌گیری شد. موش‌های صحرائی که قند خون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون، در طول دوره برنامه تمرینی هر هفته و نیز در پایان دوره، قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد.[۱۵]

تزریق ملاتونین: دو هفته پس از القای دیابت با تأیید درد نوروپاتیک دیابتی، همراه با شروع برنامه تمرین هوازی، گروه‌های نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین، جهت جلوگیری از ایجاد هایپرآلژزی

i- Cyclooxygenase-2
ii- Prostaglandins
iii- Strepotozocin(STZ)
iv - Lancet

نوروپاتیک دیابتی، حلال ملاتونین (شرکت سیگما) بصورت حل شده در سالین حاوی اتانول (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت درون صفاقی، به‌طور روزانه و به مدت ٦ هفته تزریق گردید.[۱٦]

آزمون‌های رفتاری

پیش از القاء دیابت، به‌منظور سازگاری جهت آزمون‌های رفتاری، حیوانات سه روز در معرض آزمایش (دو بار برای هر آزمون) قرار گرفتند. دو هفته پس از القای دیابت، آزمون-های رفتاری درد نوروپاتیک به‌عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابتی و برای تأیید و میزان درد نوروپاتیک از تمامی گروه‌ها به عمل آمد.[۱۷-۱۹] به‌منظور بررسی اثرات طولانی‌مدت تمرین و تزریق ملاتونین هر هفته و تا پایان برنامه تمرین هوازی و تزریق ملاتونین آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک اجرا شد، برای اجتناب از عوامل مداخله‌گر؛ نظیر اثرات ضد دردی القاء شده توسط استرس، آزمایش‌های رفتاری بین ساعت ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد.[۱۹]

آزمون صفحه‌ی داغ: برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی (هایپرآلژزیای حرارتی) از آزمون صفحه‌ی داغ استفاده شد. این آزمون بر اساس روش والف[i] و مکدونالد[ii] انجام گرفت.[۲۰،۲۱] برای انجام این آزمون، از دستگاه صفحه ی داغ مدل ام اچ -۹۵۰۰ ساخت شرکت برج صنعت آزما، که دارای یک صفحه فلزی به قطر ۱۹ سانتی‌متر و محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس (۳۰×۲۵×۲۵ سانتی‌متر) بود، استفاده شد. دستگاه مجهز به زمان‌سنج و ترموستات بود. شدت درجه گرمایی صفحه دستگاه در ۲±۵۲ درجه سانتی گراد تنظیم شد. قبل از انجام آزمون، برای آشنایی موش‌ها با شرایط، حیوانات به مدت ۲ دقیقه بر روی صفحه دستگاه قرار گرفتند.؛ سپس، دستگاه روشن شد تا دمای صفحه دستگاه به دمای مورد نظر رسیده و دما ثابت شود و هم‌زمان با آن، زمان‌سنج دستگاه روشن شد. زمانی که لرزش پا رخ داد یا حیوان شروع به لیسیدن یا بالا بردن پا کرد، به‌عنوان نقطه پایانی آزمون و شاخص احساس درد تلقی شد. در این زمان فوراً زمان‌سنج متوقف و حیوان از دستگاه خارج می‌شد. مدت‌زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه[iii] و یا فاصله زمانی شروع قرار گرفتن حیوان بر روی صفحه داغ تا پیدایش پاسخ به درد توسط حیوان، در سه مرحله و به فاصله ٥ دقیقه در گروه‌های مختلف برحسب ثانیه اندازه‌گیری؛ و میانگین آن‌ها به‌عنوان زمان تأخیر ثبت گردید. زمان عدم واکنش حیوان به صفحه داغ ۳۰ ثانیه (Cut of time) در نظر گرفته شد.

آزمون آلودینیای مکانیکی: به‌منظور تعیین آستانه درد، حیوان روی یک شبکه‌ی سیمی و داخل یک محفظه‌ی پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه مشبک قرار گرفتند. در ادامه به‌منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Frey در محدوده ۲ تا ٦۰ گرم (٦۰، ۲٦، ۱٥، ۱۰، ۸، ٦، ٤، ۲) (ساخت شرکت استولتین کشور آمریکا) جهت 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. هم‌چنین چنانچه دو بار متوالی پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به‌عنوان آستانه پس کشیدن پنجه[iv] ثبت می‌شد و آزمون خاتمه می‌یافت. در مقابل، اگر حیوان به هیچ‌یک از تارها ازجمله تار شماره ٦۰ پاسخ نمی‌داد، عدد ٦۰ به‌عنوان آستانهٔ پاسخ در نظر گرفته می‌شد. هر آزمایش سه بار و به‌تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه منظور گردید.[۲۲]

برنامه تمرین هوازی: پس از اطمینان از حصول نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی نر، برنامه تمرین هوازی به مدت شش هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر برنامه تمرین هوازی بر اساس مطالعه چانگ هوان[v] و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت. ابتدا به‌منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوار گردان و دست‌کاری؛ حیوانات ٥ روز در هفته به مدت ۱۰-۱٥ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بروی نوار گردان راه رفتند. سپس گروه‌های ورزشی نوروپاتی دیابتی تمرین، نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین در معرض تمرین نوار گردان، ٥ جلسه در هفته و به مدت ٦ هفته قرار گرفتند.[۲۳] سرعت و مدت تمرین نوار گردان هر هفته به‌تدریج 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، ١٤ تا ١٥ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ١٤ تا

i- Woolfe
ii- Macdonald
iii -Paw Withdrawal Latency
iv -Paw Withdrawal Threshold (PWT)
v- Chang-Hun Chae

۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم و ۱۷ تا ۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم و ششم افزایش یافت. برای اینکه سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت برسند، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شد. تمام جلسات تمرینی در پایان چرخه خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶–۱۸ بعدازظهر برگزار شد.

استخراج نمونه و روش اندازه‌گیری: در پایان شش هفته برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها به‌وسیله‌ی تزریق درون صفاقی شامل ترکیبی از کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) بی‌هوش شدند. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، تحت شرایط سترون و مطابق روش گلدرد[i] و چوپین[ii] سال ۱۹۷۷[۲۴]، ابتدا قطعه نخاعی از سطح L4 تا L6 (سگمنت‌های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه مهره‌های T13-L1 ستون فقرات قرار دارد) مشخص گردید، سپس با ایجاد برش در پائین ترین بخش ممکن از ستون فقرات جدا شد. ستون فقرات با استفاده از کانال مرکزی به‌عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد. بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه را، به‌عنوان نمونه، در نیتروژن مایع منجمد و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های ملکولی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

Real Time-PCR: به منظور استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت نخاع با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر ترایزول (کیاژن، آمریکا) هموژن گردید. مراحل مختلف طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA، تا مرحله نهایی و تهیه RNA خالص انجام شد. برای تائید خلوص نمونه به دست آمده از طیف سنجی نوری و مقیاس بین ۱/۸ تا ۲ برای نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، استفاده شد. کیت RevertAsid First Strand cDNA Synthesis (ترموساینتیفیک آمریکا) و پرایمرهای شرکت سیناکلون (ایران) برای ساخت cDNA از ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده، صبق دستورالعمل کیت، استفاده شد. از تکنیک RT-qPCR جهت – بررسی بیان ژن COX-2 به‌صورت کمی استفاده شد، چهل چرخه دمایی برای هر فرایند Real Time-PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰–۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. نسبت بیان ژن‌های موردبررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه[iii] و استفاده از فرمول $R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه گردید. مشخصات پرایمرهای سنتز شده در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- مشخصات توالی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده در پژوهش

نام ژن	شماره (Accession)	توالی رفت (Forward)	توالی معکوس (Reverse)	طول قطعه محصول (product length)
سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2)	NM_017232.3	5′- GTGGTGAATGTATGAGCATAGGA-3′ دمای ذوب (Tm): ۵۸/۰۴ محتوای (GC): ۴۳,۴۸	: 5′- GAAGTGGGTCAGGATGTAGTGT-3′ دمای ذوب (Tm): ۵۹/۴۳ محتوای (GC): ۵۰/۰۰	۱۵۸
ژن کنترل (GAPDH)	NM_017008.4	: 5′-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3′ دمای ذوب (Tm): ۶۱/۶۵ محتوای (GC): ۶۰/۰۰	: 5′-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3′ دمای ذوب (Tm): ۶۰/۹۲ محتوای (GC): ۵۵/۰۰	۹۲

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنی‌داری، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌های دوگروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-22 در سطح معنی‌داری ۰/۵ (P<۰/۰۵) انجام شد.

i- Gelderd
ii- Chopin
iii- Thereshold Cycle(CT)

یافته‌ها

نتایج نشان داد که وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت (P=۰/۳۲۸)، اما در هفته‌های پایانی پژوهش، میانگین تغییرات وزن موش‌های گروه‌های نوروپاتی دیابتی نسبت به گروه شاهد به‌صورت معناداری کمتر بود (P=۰/۰۰۱). هم‌چنین، میانگین تغییرات وزن گروه‌های نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین و

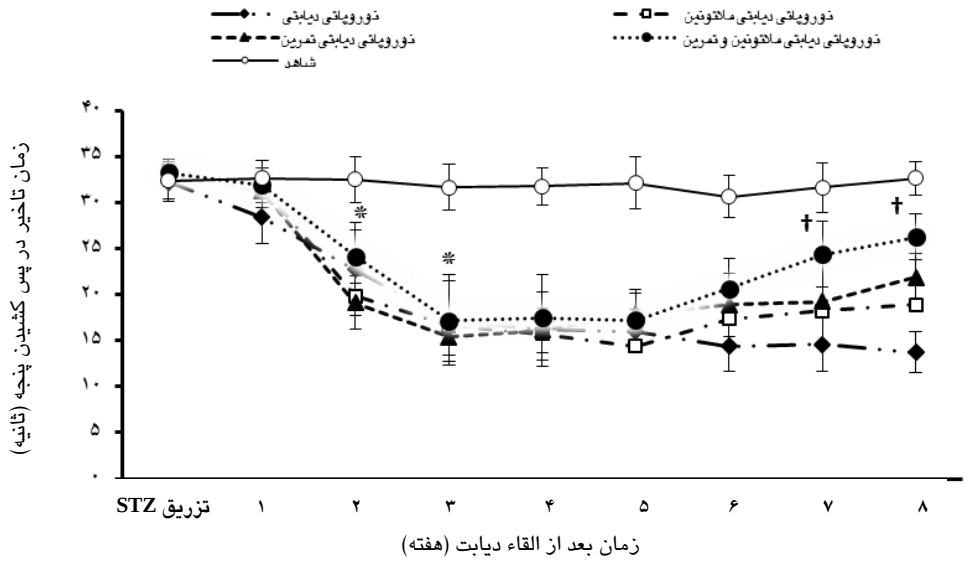
نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی اگرچه پس از شش هفته تمرین افزایش یافت، اما این افزایش معنادار نبود (P=۰/۰۶۳) (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار وزن بدن و سطح گلوکز خون در موش‌های گروه‌های مختلف

متغیر		گروه‌ها				
		نوروپاتی دیابتی (n = ۸)	نوروپاتی دیابتی ملاتونین (n = ۸)	نوروپاتی دیابتی تمرین (n =۸)	نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین (n = ۸)	شاهد (n =۸)
وزن (گرم)	القا دیابت	۲۰۵/٤±۱۳/۱	۲۰٤/٦±۱۱/٥	۲۱۰/٦±۹/٦	۱۹۸/۸±۹/۱	۲۰٦/۸±۱۱/٤
	هفته دوم	۱۹۸/۰±۱۰/۲	۱۹٦/۱±۱۲/۲	۲۰۳/۳±۸/۷	۱۹٤/٥±۱۳/٥	۲۱٤/٦±۱۱/۱
	هفته چهارم	۱۸٥/٥±۱۰/٤	۱۸٥/٦±۱۲/۱	۱۸۷/٤±٦/۹	۱۸٤/٤±۷/۳	۲۲۹/۳±۹/۱
	هفته ششم	۱٦۰/۱±۸/۱*	۱۸۸/٥±۱۱/۳*	۱۸٦/۰±٦/٤*	۱٦۸/۰±۷/۹*	۲٤۲/۸±۸/۱
	هفته هشتم	۱٤۱/۰±۷/٤*	۲۰٦/٤±۱۰/۷*	۲۱۰/٤±۹/۸*	۲۰۱/۸±۱۰/۹*	۲٥۸/٥±۹/۸
گلوکز خون (میلی‌گرم/دسی لیتر)	القا دیابت	٤۲۱/۹±۱۱۳/۱*	٤٦۳/۹±۹٤/۲*	٤۹٥/۱±۷۱/٦*	٤٥٤/٥±۱۱۰/۸*	۱۰٦/۸±۱۳/۸
	هفته دوم	٤٦٥/٤±۸۱/۱	٥۲۳/٦±۷٥/۱	٥۲۲/٤±٥۷/۹	٥۲۹/۳±۸۳/۱	۱۰۸/۱±۱۳/۸
	هفته چهارم	٥۱٥/۹±٦۱/۳	٥۱۹/٥±٦۷/۳	٥۲۲/٤±۳٤/۸	٤۹٥/٥±۹٤/۹	۱۰۲/۱±۱٤/۱
	هفته ششم	٥٦۳/٤±٤۱/۰	٤٦۹/٤±٦۱/۳	٤۳٤/٥±٥٥/۱	٤۰۳/٦±٥٦/٥	۱۰۱/٦±۱۳/۳
	هفته هشتم	٦۰۱/۹±۲٤/۱†	٤۳۰/۹±۸۹/۲†	۳٥٥/۳±٦۰/۸†	۳٦۷/۹±۷۳/۹†	۱۰٤/۳±۱۷/۷

پس از القاء دیابت، سطوح گلوکز خون به‌صورت معناداری در گروه‌های نوروپاتی دیابتی افزایش یافت (P=۰/۰۰۱) و این اختلاف تا پایان دوره پژوهش در مقایسه با گروه شاهد هم‌چنان معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۱)، هم‌چنین، در پایان برنامه تمرینی و مکمل‌دهی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین و نوروپاتی دیابتی ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی به‌صورت معناداری پایین‌تر بود (P=۰/۰۰۱) (جدول ۲).

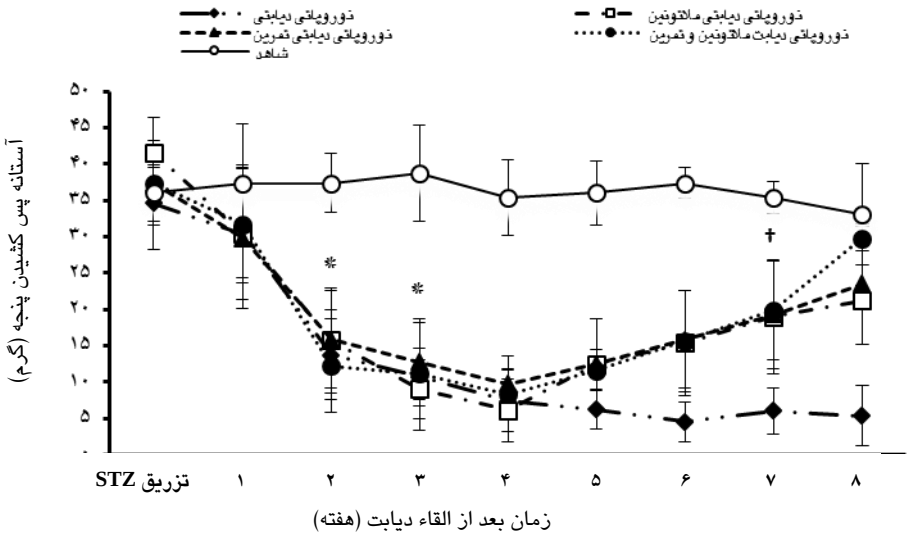
میانگین مدت‌زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون صفحه‌ی داغ دو هفته پس از القاء دیابت در گروه‌های نوروپاتی دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P=۰/۰۰۱). هم‌چنین در هفته‌های پایانی اجرای برنامه تمرین هوازی و مکمل ملاتونین، میانگین مدت‌زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی در گروه نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین و نوروپاتی ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P=۰/۰۰۱) (نمودار ۱).



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

* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد (P<۰/۰۵). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<۰/۰۵).

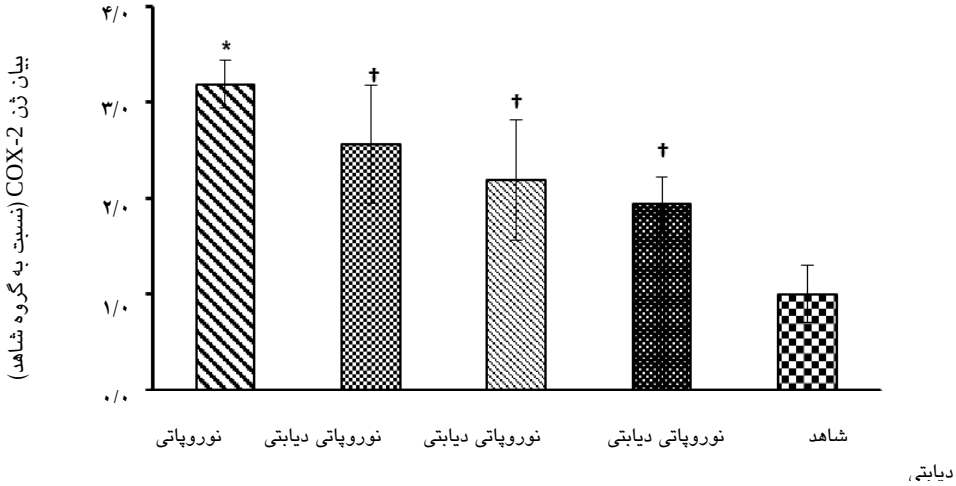
دو هفته بعد از القاء دیابت، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینیای مکانیکی، در گروه‌های نوروپاتی دیابتی نسبت به گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P=۰/۰۰۵). از طرفی، در هفته‌های پایانی اجرای برنامه، میانگین تغییرات آزمون آلودینیای مکانیکی در گروه‌های نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین و نوروپاتی دیابتی ملاتونین به همراه تمرین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی داشتند (P=۰/۰۲۶) (نمودار ۲).



نمودار ۲- تغییرات استانه پس کشیدن پنجه در ازمون الودینیای مکانیکی گروه‌های مختلف.

* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد (P<۰/۰۵). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<۰/۰۵).

تغییرات در بیان ژن COX-2 در بافت نخاع در گروه‌های مختلف پژوهشی در نمودار ۳ بیان شده است. با توجه به میانگین گروه‌ها، مشخص شد که القاء دیابت موجب افزایش معنادار در میزان بیان ژن COX-2 در گروه نوروپاتی دیابتی در مقایسه با گروه شاهد شده است (P=۰/۰۰۱). هم‌چنین نتایج نشان داد که گروه نوروپاتی دیابتی ملاتونین، نوروپاتی دیابتی تمرین و نوروپاتی دیابتی ملاتونین به همراه تمرین کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن COX-2 بافت نخاع نسبت به گروه نوروپاتی دیابتی وجود داشت (P=۰/۰۱۷). این در حالی است که اگرچه در گروه نوروپاتی دیابتی تمرین به همراه ملاتونین کاهش بیشتری در میزان بیان ژن COX-2 نسبت به گروه‌های نوروپاتی دیابتی تمرین و نوروپاتی دیابتی ملاتونین مشاهده شد ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها وجود نداشت (P=۰/۵۶).



نمودار ۳- میزان بیان ژن COX-2 در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد (P<۰/۰۵). † اختلاف معنی‌دار با گروه نوروپاتی دیابتی (P<۰/۰۵).

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پس از القاء و اثبات درد نوروپاتیک دیابت، ناشی از تزریق استرپتوزوسین، تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین برون‌زا، میزان بیان ژن سیکلواکسیژناز ۲ را در بخش خلفی نخاع به‌طور معنی‌داری کاهش داده و آستانه پاسخ به آزمون‌های رفتاری درد نوروپاتیک را افزایش می‌دهند. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که اتو اکسیداسیون گلوکز به دنبال هیپرگلیسمی؛ باعث تولید بی‌رویه رادیکال‌های آزاد و سطوح عوامل التهابی در سلول‌ها، ازجمله نورون‌ها می‌شود. گمان می‌رود که این تغییرات بیوشیمیایی در سلول‌های گلیال و نورون‌های محیطی باعث اختلال در حساسیت طبیعی نوسیسپتورها به محرک‌های درد زا و غیر درد زا می‌شود.[۲۵] به‌طورکلی پذیرفته شده است که تولید بیش‌ازحد واسطه‌های التهابی در رشته‌های عصبی، به دنبال ابتلا به دیابت، نقش مهمی در شروع و تداوم درد نوروپاتیک دیابتی دارد.[۲۶] در شرایط فیزیولوژی طبیعی، میکروگلیاها واسطه‌های ضدالتهابی را آزاد و بقایای سلول‌های سمی را فاگوسیتوز کرده تا هموستاز را در سیستم عصبی حفظ کنند. مشخص‌شده است که میکروگلیاها توسط عوامل متعددی؛ ازجمله هایپرگلیسمی، فعال می‌شوند. فعال‌سازی طولانی‌مدت میکروگلیاها باعث تولید بیش‌ازحد سیتوکین‌های التهابی شده که این عامل منجر به التهاب عصبی می‌شود.[۲۷] در میان واسطه‌های التهابی متعدد، سیکلواکسیژناز ۲ و محصولات نهایی آن پروستاگلاندین ها (PGE2) به‌طور مداوم در ماکروفاژهای نفوذی و سلول‌های شوان در اعصاب محیطی بیماران دیابتی تنظیم مثبت می‌شوند.[۶] نتایج پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اگر COX-2 در سیستم عصبی بیش‌ازحد تولید شود می‌تواند به‌طور مستقیم گیرنده‌های درد را تحرک کند و هم‌چنین به‌طور مزمن سنتز واسطه‌های درد متعددی در نورون‌ها ازجمله نورو پپتیدها و گیرنده‌های آن‌ها، کانال‌های یونی، سیتوکین‌ها، کموکائین‌ها و نوروتروفین‌ها را تحریک کرده و از این طریق نقش مهمی در تنظیم درد نوروپاتیک در سطح مرکزی و محیطی ایفا کند.[۶،۲۸،۲۹] اگرچه درد نوروپاتیک دیابتی تهدیدکننده زندگی نیست، به‌شدت بر کیفیت زندگی تأثیرگذار است و بار مالی سنگینی را بر سیستم مراقبت‌های بهداشتی تحمیل می‌کند. به‌واسطه تحقیق حاضر نه‌تنها بینش جدیدی در مورد سازوکار درد نوروپاتیک دیابتی ارائه شده، بلکه مسیر پیام‌رسان مهمی برای مقابله با این بیماری ناتوان‌کننده نیز معرفی شده است. محققین مختلف نشان داده‌اند که سیگنال دهی COX-2/PGE2/EP نقش تسهیل‌کننده‌ای برای ترشح واسطه‌های التهابی در نورون‌های حسی اولیه، به دنبال بروز دیابت دارند.[۶،۲۸،۳۰] مطالعه حاضر این موضوع را مورد تأیید قرارداده و نشان داد که میزان بیان ژن COX-2 در نورون‌های حسی بخش خلفی نخاع در موش‌های دیابتی القاء شده با STZ بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردناک (هایپرآلژزیا حرارتی) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش‌یافته بود. بنابراین هدف قرار دادن مهار اثر آنزیم COX-2 در سنتز واسطه‌های التهابی در نورون‌های حسی، ممکن است دژنراسیون عصبی را کاهش داده و به‌عنوان یک رویکرد مهم درمانی برای درد نوروپاتیک دیابت استفاده شود. مطالعات پیشین نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی، جنبه‌های گوناگونی از فعالیت‌های سلول‌های عصبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال؛ فعالیت‌های جسمانی می‌تواند شکل‌پذیری مغز، سیستم ضد اکسایشی، تنظیم افزایشی نروتروفین‌ها را ارتقاء بخشد.[۳۱،۳۲] تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت‌های هوازی منظم با کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور مثبت هموستاز اکسیداتیو سلول‌ها و بافت را با کاهش سطح پایه آسیب اکسیداتیو و افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو تغییر می‌دهد.[۳۳] با توجه به این که مطالعات نشان داده‌اند که القاء ژن COX-2 با تشدید استرس اکسیداتیو در گسترش آسیب‌های بافتی ناشی از التهاب نقش مهمی دارد،[۳۴،۳۵] بنابراین این احتمال دارد که فعالیت هوازی، به‌واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی خود، باعث کاهش حجم استرس اکسیداتیو شوند. هم‌چنین؛ با تأثیر و دخالت بر سازوکارهای التهابی و اعمال ضدالتهابی توانسته باشند منجر به مهار آنزیم‌های درگیر در این مسیر؛ مانند سیکلواکسیژناز ۲ شده و از این طریق باعث کاهش عوارض نوروپاتیک در موش‌های صحرایی مورد آزمون شده باشند. در این مطالعه هم‌چنین نشان داده شد که ملاتونین به‌طور معنی‌داری میزان بیان ژن COX-2 را در سلول‌های عصبی موش‌های صحرایی گروه نوروپاتیک دیابت کاهش می‌دهد. محققان مختلف نشان داده‌اند که ملاتونین اثرات ضدالتهابی از خود نشان می‌دهد. این اثر محافظتی ملاتونینبر التهاب از طریق مسدود کردن فاکتور رونویسی NF-κB و افزایش

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از طریق NRF2 به انجام می‌رسد.[۱۱،۳۶] در تحقیقی نشان داده شد که ملاتونین درد ناشی از تزریق STZ در مدل حیوانی را از طریق سرکوب سیتوکین های التهابی IL-1β و TNF-α کاهش می‌دهد.[۳۷] هم‌چنین گزارش‌شده است که ملاتونین از طریق فعالیت گیرنده خود، MT2، می‌تواند درد نوروپاتیک را با مهار فعال‌سازی گلیاسل ها و تنظیم پروتئین‌های دخیل در التهاب، مانند نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) و کاسپازها، تسکین دهد.[۳۸] بنابراین با توجه به عملکردهای فیزیولوژیک مهم ملاتونین، ازجمله نقش آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تنظیم ریتم غدد درون‌ریز،[۳۹] این احتمال وجود دارد که ملاتونین توانسته باشد آنزیم COX-2 را؛ به‌عنوان یک واسطهٔ التهابی، مهار کرده و منجر به کاهش روند پیشرفت آسیب‌های نورونی در مدل موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتیک دیابت شده است. با این حال اندازه‌گیری بیان ژن به جای سطوح پروتئین در پژوهش حاضر به عنوان محدودیت، از بحث دقیق در این زمینه جلوگیری می کند. لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، همراه با اندازه‌گیری سطوح پروتئینی آنزیم COX-2، برای دستیابی به شرایط قطعی‌تر، فاکتور رونویسی NF-κB و سایتوکین‌های پیش التهابی که در مسیر پیام‌رسانی این آنزیم قرار دارند و هم‌چنین عوامل مهارکننده این آنزیم همانند، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سطوح سایتوکین‌های ضدالتهابی را موردبررسی قرار دهند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ در نوروپاتی محیطی دیابتی دچار افزایش بیان‌شده و شرایط التهابی را به وجود می‌آورد. تصور بر این است که از عوامل احتمالی درگیر در درد نوروپاتیک دیابتی، افزایش در شاخص‌های التهابی باشد. از سوی دیگر تمرین هوازی به‌تنهایی و به همراه مصرف مکمل ملاتونین میزان بیان ژن COX-2 را در بخش خلفی نخاع کاهش دادند و هم‌چنین حساسیت نوسیسپتورها به عوامل درد زا ، که درنتیجه تخریب پیش‌رونده نورون‌های حسی رخ می‌دهد را ، بهبود بخشیدند. لذا به نظر می‌رسد، کاهش میزان بیان ژن COX-2 می‌تواند یک پاسخ جبرانی برای کاهش سطح سایتوکین‌های پیش التهابی باشد و تمرین هوازی با مصرف مکمل ملاتونین به‌عنوان راهبردی مؤثر برای تعدیل این تغییرات و درد نوروپاتیک دیابتی ناشی از این عوامل باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که اثر تمرین استقامتی به شکل هوازی با شدت متوسط به همراه مصرف مکمل ملاتونین بر بیماران دیابتی به‌منظور کاهش درد نوروپاتیک مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دورهٔ کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش تغذیه ورزشی می‌باشد؛ از کلیه کارشناسان محترم آزمایشگاه و اساتید گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تشکر و قدردانی می‌شود. ضمناً کلیه هزینه‌های این طرح شخصی تأمین‌شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Dewanjee S, Das S, Das AK, Bhattacharjee N, Dihingia A, Dua TK, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. Eur J Pharmacol 2018; 833: 472-523.
2. Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. World J Diabetes 2015; 6: 432.
3. Zhou J, Zhou S. Inflammation: therapeutic targets for diabetic neuropathy. Mol Neurobiol 2014; 49: 536-46.
4. Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. Int J Endocrinol 2014; 2014: 674987.
5. Dastgerdi O, KAKI A. The Effect Of Aerobic Exercise With Melatonin On Rage Gene Expression And Some Indicators Of Oxidative Stress In Male Rats With Diabetic Neuropathic Pain. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2021; 20: 93-104. [Farsi]
6. Ma W, St-Jacques B, Cruz Duarte P. Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. Expert Opin Ther Targets 2012; 16: 527-40.
7. Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, Okubo M, Noguchi K. Microglial TNFα induces COX2 and PGI2 synthase expression in spinal endothelial cells during neuropathic pain. eNeuro 2017; 4: ENEURO.0064-17.2017.
8. 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: 424-9.
9. Batvandi A, Kaki A. The Effect of Aerobic Exercise on Nrg1/Erbb2 Signaling Pathway In Male Rats with Dia-

betic Neuropathic Pain. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2021; 21: 229-39. [Farsi]
10. Kaki A, Karimi M. The effect of aerobic exercise with melatonin on GDNF gene expression and some indicators of oxidative stress in male rats with diabetic neuropathic pain. Daneshvar Medicine 2021; 29: 132-46. [Farsi]
11. Mok JX, Ooi JH, Ng KY, Koh RY, Chye SM. A new prospective on the role of melatonin in diabetes and its complications. Horm Mol Biol Clin Investing 2019; 40(1).
12. Yilmaz S, Yilmaz E. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative–antioxidative status in rats exposed to irradiation. Toxicology 2006; 222: 1-7.
13. Yan J-e, Yuan W, Lou X, Zhu T. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. Neurosci Lett 2012; 526: 54-8.
14. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. Curr Protoc Neurosci 2004; 29: 9-18.
15. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung Circ 2003; 12: 44-50.
16. Zangiabadi N, Sheibani V, Asadi-Shekaari M, Shabani M, Jafari M, Asadi AR, et al. Effects of melatonin in prevention of neuropathy in STZ-induced diabetic rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology 2011; 6: 59-67.
17. Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. Curr Protoc Neurosci 2007; Chapter 8: Unit 8.9.
18. Chen Y-W, Hsieh P-L, Chen Y-C, Hung C-H, Cheng J-T. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. Anesth Analg 2013; 116: 482-90.
19. Yoon H, Thakur V, Isham D, Fayad M, Chattopadhyay M. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. Exp Neurol 2015; 267: 107-14.
20. Rossi DM, Valenti VE, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. Clinics 2011; 66: 1615-9.
21. WOOLFE G. The evaluation of the analgesic actions of pethidine hydrochlodide (Demerol). J Pharmacol Exp Ther 1944; 80: 300-7.
22. Gong Y-H, Yu X-R, Liu H-L, Yang N, Zuo P-P, Huang Y-G. Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Anaesthesiol Taiwan 2011; 49: 16-20.
23. Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. 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: 235-41.
24. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. The Anat Rec 1977; 188: 45-7.
25. Keri KC, Samji NS, Blumenthal S. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives. J Community Hosp Intern Med Perspect 2018; 8: 200-7.
26. Thakur V, Sadanandan J, Chattopadhyay M. High-mobility group box 1 protein signaling in painful diabetic neuropathy. Int J Mol Sci 2020; 21: 881.
27. Ismail CAN, Suppian R, Ab Aziz CB, Long I. Expressions of spinal microglia activation, BDNF, and DREAM proteins correlated with formalin-induced nociceptive responses in painful and painless diabetic neuropathy rats. Neuropeptides 2020; 7: 102003.
28. St-Jacques B, Ma W. Role of prostaglandin E2 in the synthesis of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in primary sensory neurons: an in vivo and in vitro study. J Neurochem 2011; 118: 841-4.
29. Lee JY, Choi HY, Park CS, Jang C, Lee KT, Lee JY, et al. Inhibition of COX-2 alleviates lumbar spinal stenosis-induced chronic mechanical allodynia in rats. Int Immunopharmacol 2019; 75: 105738.
30. Pop-Busui R, Kellogg AP, Cheng HT. Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy. Curr Drug Targets 2008; 9: 68-76.
31. Orlando G, Balducci S, Boulton AJ, Degens H, Reeves ND. Neuromuscular dysfunction and exercise training in people with diabetic peripheral neuropathy: A Narrative Review. Diabetes Res Clin Pract 2021: 109183.
32. Teixeira de Lemos E, Oliveira J, Páscoa Pinheiro J, Reis F. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. Oxid Med Cell Longev 2012; 2012: 741545.
33. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. Exp Diabet Res 2011; 2012: 941868.
34. Madonna R, Giovannelli G, Confalone P, Renna FV, Geng Y-J, De Caterina R. High glucose-induced hyperosmolarity contributes to COX-2 expression and angiogenesis: implications for diabetic retinopathy. Cardiovasc Diabetol 2016; 15: 1-14.
35. Matsunaga A, Kawamoto M, Shiraishi S, Yasuda T, Kajiyama S, Kurita S, et al. Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats. Eur J Pharmacol 2007; 554: 12-7.
36. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative–antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease 2003; 21: 121-5. Available from: URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbf.1006
37. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-κB and Nrf2 cascades. J Pineal Res 2011; 50: 124-31.
38. Yao C, Liu X, Zhou Z, Xiang Y, Yuan S, Xie W, et al. Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS). J Toxicol Environ Health A 2019; 82: 437-46.
39. Madhu LN, Kodali M, Attaluri S, Shuai B, Melissari L, Rao X, et al. Melatonin improves brain function in a model of chronic Gulf War Illness with modulation of oxidative stress, NLRP3 inflammasomes, and BDNF-ERK-CREB pathway in the hippocampus. Redox Biol 2021; 43: 101973.

Original Article

The Effect of Aerobic Exercise and Melatonin on COX-2 Gene Expression in Spinal Cord Tissue and Neuropathic Pain Behavioral Responses in a Diabetic Rat Model

Bigdeli T, Kaki A

Department of Sports Physiology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, I.R. Iran
e-mail: ahvaz.kaki@yahoo.com

Received: 20/02/2022 **Accepted**: 16/05/2022

Abstract

Introduction: Neuroinflammation plays an important role in developing many neurological changes in diabetic patients. This study aimed to investigate the effect of aerobic exercise and melatonin on COX-2 expression in spinal cord tissue and behavioral responses to pain caused by diabetic neuropathy in a rat model. Materials and Methods: Forty eight-week-old male Wistar rats (weight range 204 ± 11.3 g) were randomly divided into five groups of eight, including diabetic neuropathy (50 mg/kg streptozotocin intraperitoneal injection), diabetic neuropathy with melatonin administration (10 mg/kg melatonin daily for six weeks), diabetic neuropathy with exercise (30 minutes of aerobic exercise at 15 meters per minute, five days a week for six weeks), diabetic neuropathy with melatonin administration and exercise, and controls. After confirmation of diabetic neuropathy with behavioral tests, the exercising and melatonin administration protocol was performed. The COX-2 gene expression level in spinal cord tissue was measured using the real-time technique. Also, one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis. Results: Exercise and melatonin decreased the sensitivity of the nervous system to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in the diabetic neuropathy with melatonin administration and exercise group (P =0.026). Also, the COX-2 gene expression level was significantly reduced in this group compared to the diabetic neuropathy group (P=0.001). Conclusion: Aerobic exercise with melatonin injection modulates the COX-2 gene expression level and improves the sensitivity of nociceptors to pathogens. Aerobic exercise and melatonin administration are recommended for neuropathic pain in people with diabetes.

Keywords: **Cyclooxygenase 2 gene, Neuropathic pain, Diabetes, Aerobic exercise, Melatonin**