Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 59, Volume 15, Issue 3

Check for updates

Research Article

Effect of Two Types of Aerobic Exercise Programs on NT4 Gene Expression and Motor Performance in Spinally Injured Rats

Mahdi Ziaee Bashirzad[1], Sadegh Cheragh-Birjandi[1*], Mohamad Amin Younessi Heravi[2], Reza Salarinia[3]

[1]Department of Sport Science, Islamic Azad University, Bojnourd Branch, Bojnourd, Iran
[2]Department of Medical Physics and Radiology, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3]Department of Advanced Technologies, School of Medicine, Bojnurd, Iran

*Corresponding author: Sadegh Cheragh-Birjandi, Department of Sport Science, Islamic Azad University, Bojnurd Branch, Bojnurd, Iran. E-mail: s_birjandi2001@yahoo.com.

DOI: 10.32592/nkums.15.3.11

How to Cite this Article:
Ziaee Bashirzad M, Younessi Heravi M A, Salarinia R, Cheragh-Birjandi S. Effect of Two Types of Aerobic Exercise Programs on NT4 Gene Expression and Motor Performance in Spinally Injured Rats. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(3):11-18. DOI: 10.32592/nkums.15.3.11

Received: 21 Jun 2023
Accepted: 12 Aug 2023

Keywords:
Aerobic exercise
Motor activity
Neurotrophin-4
Spinal cord injury

Abstract

Introduction: The present research aimed to investigate the effect of four weeks of selective training on motor performance and neurotrophin4 (NT4) gene expression in the hippocampus of rats with spinal cord injury (SCI).

Method: This experimental study was conducted on adult and young male Wistar rats. The animals were randomly divided into six groups (control group, healthy group with the first exercise protocol, healthy group with the second exercise protocol, SCI group, SCI group with the first exercise protocol, and SCI group with the second exercise protocol; 7 animals in each group). Firstly, animals were subjected to general anesthesia and SCI. After two weeks of recovery, two types of aerobic exercise programs were performed for four weeks. After performing the exercises, Basso Beattie Bresnahan (BBB) test and molecular tests were used to measure the expression of the NT4 gene from the hippocampus of the animals using the qRT-PCR method.

Results: The BBB score in the exercise group compared to the injury group increased significantly. The expression of NT4 in the SCI group was significantly decreased compared to the control group. While, NT4 expression was increased in the SCI + exercise 1 group and in the SCI + exercise 2 group compared to the SCI group, this increased expression was not significantly different between the two groups of SCI + exercise.

Conclusion: The exercise protocols of this study are effective on NT4 gene expression, as well as improving movement in animals with SCI, and could be a factor for axonal growth and neuronal survival in spinal cord injury recovery.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

Copyright © 2023 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر دو نوع برنامه تمرین هوازی بر بیان ژن نروتروفین۴ و عملکرد حرکتی رت‌های دچار ضایعه نخاعی

مهدی ضیایی بشیرزاد[۱]، صادق چراغ بیرجندی[۲*]، محمد امین یونسی هروی[۳]، رضا سالاری‌نیا[۴]،

[۱]گروه علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بجنورد، بجنورد، ایران
[۲]استادیار گروه علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بجنورد، بجنورد، ایران
[۳]استادیار گروه فیزیک پزشکی و رادیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴]استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** صادق چراغ بیرجندی، استادیار گروه علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بجنورد، بجنورد، ایران. ایمیل: s_birjandi2001@yahoo.com.

DOI: 10.32592/nkums.15.3.11

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱

واژگان کلیدی:
آسیب طناب نخاعی
نروتروفین۴
پروتکل تمرین
عملکرد حرکتی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی اثر چهار هفته تمرین منتخب بر عملکرد حرکتی و بیان ژن نروتروفین۴ در هیپوکمپ رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی بود.

روش کار: این مطالعه که از نوع تجربی است، روی رت‌های نر بالغ و جوان انجام شد. حیوانات به‌صورت تصادفی به ۶ گروه (کنترل سالم، سالم با پروتکل تمرینی اول، سالم با پروتکل تمرین دوم، ضایعه نخاعی، ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی اول و ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی دوم، هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند. ابتدا، حیوانات تحت بیهوشی عمومی و آسیب نخاعی قرار گرفتند. پس از دو هفته ریکاوری، رت‌ها به‌مدت ۴ هفته، دو نوع برنامه تمرین هوازی انجام دادند. پس از انجام تمرین‌ها، تست حرکتی و تست‌های مولکولی برای سنجش تغییرات بیان ژن فاکتور نروتروفین۴ از هیپوکمپ حیوانات انجام شد. تجزیه‌وتحلیل اطلاعات توسط نرم‌افزار SPSS 20.0 انجام شد. سطح معناداری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نمرات تست حرکتی در گروه دریافت‌کننده تمرین در مقایسه با نمرات تست حرکتی گروه آسیب، افزایش معناداری داشت. بیان ژن نروتروفین۴ در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، همچنین، بیان این ژن در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۱ و در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۲ نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بیان بین دو گروه آسیب نخاعی + تمرین تفاوت معناداری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: پروتکل‌های تمرینی در این مطالعه علاوه بر ایجاد بهبود حرکتی در حیوانات دچار ضایعه نخاعی، بر بیان ژن نروتروفین۴ مؤثر هستند و می‌توانند عاملی برای رشد آکسونی و بقای نرونی در بهبودی ضایعه نخاعی باشند.

مقدمه

آسیب طناب نخاعی (SCI) شامل مجموعه پیچیده‌ای از اتفاقات پاتولوژیک است و بعد از آسیب اولیه رخ می‌دهد. اثر اولیه این آسیب صدمه مکانیکی به نورون‌ها و بافت‌های نرم اطراف و سلول‌های اندوتلیال عروق است؛ بنابراین، نکروز یا مرگ سلول ناشی از آسیب مکانیکی یا ایسکمی است [۱]. آسیب ثانویه در محدوده زمانی چند دقیقه تا هفته‌ها بعد از آسیب رخ می‌دهد و شامل مرگ سلولی در اثر التهاب، رهایش گلوتامات، اسیدآمینه‌های تحریکی، تشکیل زخم گلیال و در نهایت، آپوپتوز سلول‌های نورونی است. علاوه بر این موارد، در محل ضایعه مولکول‌ها و فاکتورهای دیگری نیز ترشح می‌شوند که باعث مهار رشد آکسون در محل می‌شوند [۲]. از این رو، به روش‌های درمانی جدیدی نیاز است که بتوانند مکانیسم‌های آسیب ثانویه و آپوپتوز را مهار کنند و رشد آکسون را افزایش دهند. با توجه به وسعت معلولیت ناشی از آسیب‌های نخاعی و افزایش روزافزون مبتلایان به آن، تلاش‌های زیادی برای ترمیم این ضایعه انجام شده است. علی‌رغم تلاش‌های محققان و پیشرفت‌های درخور توجه در درمان و جراحی‌های بعد از ضایعه و ظهور روش‌های سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی در این دسته از بیماران، تا کنون هیچ درمان نهایی و مؤثری برای ضایعات نخاعی ارائه نشده است. در حالت طبیعی، فرایند ترمیم‌پذیری غیرفعال نورون‌ها به‌وسیله بیان یک‌سری از ژن‌های وابسته به ترمیم توسط آکسون‌ها پس از ایجاد ضایعه فعال می‌شوند [۳-۵]. فرایند تحریک فعال‌سازی ترمیم توسط فاکتورهای رشد صورت می‌پذیرد. هنوز اثرهای اختصاصی فاکتورهای رشد متفاوت بر بافت‌های محیطی، مانند عضلات و انواع مختلف نورون‌ها، کاملاً مشخص نشده است. این احتمال وجود دارد که یک نروتروفین اثر زیادی روی نورونی خاص داشته باشد، درصورتی‌که تأثیری روی نورون دیگر نداشته باشد. همچنین، ممکن است

Copyright © 2023 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

نورونی خاص پاسخ‌های متفاوتی به نوروتروفین‌های متفاوت بدهد [۶]. نوروتروفین‌ها برای تکوین و حفظ سیستم عصبی محیطی و مرکزی حیاتی هستند و بقا، تمایز، توقف رشد و آپوپتوز نورون‌های حسی را کنترل می‌کنند [۷]. از خانواده نوروتروفین‌ها می‌توان به نوروتروفین۴ اشاره کرد. در رت‌ها، بیان ژن نوروتروفین۴ روی کروموزوم ۱ و در انسان‌ها، روی کروموزوم ۹ است [۸]. نوروتروفین۴ از نظر ترادفی با فاکتور رشد عصب، ۴۸ درصد شباهت دارد و دارای دو زیرواحد ۱۳۰ اسیدآمینه‌ای است. از نظر تکاملی، مشخصه غیرمتعارفی در مقایسه با سایر نوروتروفین‌ها دارد. در ناحیه گره سیستئین یک محل برای تحمل تغییرات بدون تأثیر بر ساختار نوروتروفین و برهم‌کنش آن با گیرنده است [۹]. نوروتروفین۴ در هیپوکمپ، هیپوتالاموس، نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی و سیتوپلاسم نورون‌های گره پشتی و شاخه پشتی L3 و L6 گلیاها بیان می‌شود [۱۰]. به‌واسطه آسیب‌های واردشده به سیستم عصبی مرکزی، همچون آسیب ضایعه نخاعی، میزان بیان ژن نوروتروفین‌های متفاوت تغییر می‌کند. نوروتروفین‌ها رشد آکسونی و بقای نورونی برای بهبود آسیب‌های دستگاه عصبی مانند ضایعه نخاعی را تعدیل می‌کنند [۱۱]. درصورتی‌که نوروتروفین‌ها به بخش طناب نخاعی انتقال یابند، می‌توانند عملکرد حسی و حرکتی را بهبود بخشند و همچنین، از تخریب نورون‌ها جلوگیری به عمل آورند. ورزش می‌تواند برخی از انتقال‌دهنده‌های عصبی و بیان نوروتروفین‌ها را تغییر دهد [۱۲]. مطالعات اثرهای مثبت فعالیت بدنی و ورزشی را بر مغز (وزن مغز، محتوای نوروترنسمیترها، شکل‌پذیری سیناپسی، نوروژنز هیپوکمپ در بزرگ‌سالی، آنژیوژنز، سیناپتوژنز، افزایش بقا و تمایز سلول‌های عصبی و همچنین، افزایش نوروتروفین‌ها) نشان داده‌اند، این تغییرات با عملکرد رفتاری نیز مرتبط است [۱۳].

مکانیسم بیولوژیکی اختصاصی که در ترمیم نخاع وجود دارد، هنوز تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است؛ ولی این احتمال وجود دارد که ترکیباتی که در فاز ثانویه جراحت تولید می‌شوند، نقش مهمی در این ترمیم ایفا کنند [۱۴]؛ بنابراین، درک و شناخت چگونگی اثرهای مثبت فعالیت بدنی منظم و تمرینات ورزشی در فاز ثانویه ضایعه نخاعی، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، با توجه به اینکه درمان‌های مؤثر در آینده باید ترکیبی از چند روش برای بهبود بیماری باشند، بدین منظور باید اثر تمرینات منتخب بر فاکتورهای نوروتروفیک که در بقا و رشد نورون‌ها، باززایی آکسون‌ها، تنظیم رشد آکسون و دندریت‌ها، تشکیل سیناپس و بقای نورن‌های بالغ نقش مهمی دارند، بررسی شود.

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر چهار هفته تمرین منتخب بر بیان ژن نوروتروفین۴ در هیپوکمپ رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی بود.

روش کار

این مطالعه که از نوع تجربی است، روی رت‌های نژاد ویستار در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی انجام شد. رت‌های نر بالغ و جوان با وزن ۲۲۵ الی ۲۷۵ گرم و سن ۱۰ تا ۱۲ هفته وارد مطالعه شدند. حیوانات در دمای محیطی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ به ۱۲ ساعت نگهداری شدند. رت‌ها در قفس‌هایی از جنس پلکسی‌گلاس با درب توری به ابعاد ۲۵ × ۲۷ × ۴۳ سانتی‌متر قرار گرفتند، به‌طوری که در دسترسی به آب و غذای استاندارد برای آن‌ها محدودیتی وجود نداشت. حیوانات به‌صورت تصادفی به ۶ گروه مساوی تقسیم شدند (گروه کنترل سالم، گروه سالم با پروتکل تمرینی اول، گروه سالم با پروتکل تمرینی دوم، گروه ضایعه نخاعی، گروه ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی اول و گروه ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی دوم). بر اساس متون مرتبط، در هر گروه ۷ رت قرار گرفت [۱۵]. تمامی مراحل نگهداری و انجام آزمایش‌های لازم حیوانات با رعایت کامل اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل هلسینکی انجام شد. این مطالعه با تصویب در کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی انجام شد (IR.NKUMS.REC.1400.036).

نحوه ایجاد ضایعه نخاعی

ابتدا، رت‌ها به‌کمک تزریق صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/ Kg; Bremer Pharma GMBH, Bremerhaven, Germany) – زایلازین (۱۰ mg/ Kg; Alfasan Chemical Co., Woerden, Holland) بیهوش شدند. پس از بیهوش‌شدن حیوان، موهای موضعی تراشیده شد و تمام سطح پشتی حیوان با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضدعفونی شد. پس از مشخص‌کردن محل برش (مهره T9 تا T11)، پوست به‌اندازه ۲/۵ سانتی‌متر به‌سمت سری و دمی حیوان و در امتداد ستون فقرات برش داده شد. پس از بریدن فاسیای سطحی و عمقی و کنارزدن عضلات مجاور زائده خاری مهره‌ها، برای برش لامینا از میکروفرز دندان‌پزشکی (MX-70 Micromax Co) استفاده شد. پس از لامینوکتومی، مهره‌ها توسط دستگاه استریوتکس (SR-6R, Narishige group product) ثابت شدند و توسط وزنه ۱۰گرمی یک ضربه بر نخاع از ارتفاع ۲۵ میلی‌متری با استفاده از استوانه توخالی اعمال شد [۱۶]. سپس، بلافاصله عضلات و فاسیا با استفاده از نخ جذب شماره ۴-۰ بخیه زده شدند. گروه‌های سالم فقط جراحی لامینکتومی شدند و آسیب نخاعی بر آن‌ها وارد نشد. پس از جراحی، هر حیوان جداگانه در یک قفس در دمای محیطی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ به ۱۲ ساعت نگهداری شد. شایان ذکر است که شرایط تغذیه‌ای مانند رت سالم بود، به‌طوری که حیوانات دچار ضایعه نخاعی در دسترسی به آب و غذای استاندارد محدودیتی نداشتند. برای هر حیوان بعد از ایجاد ضایعه نخاعی، اطمینان از حصول این ضایعه صورت گرفت. بر این اساس، میزان حرکت حیوان معیار ارزیابی بود. به‌منظور جلوگیری از تجمع طولانی‌مدت ادرار در مثانه، کشیده‌شدن بیش‌ازحد آن و در شدیدترین حالت، پارگی دیواره آن که می‌تواند به مرگ حیوان منجر شود، تخلیه مثانه به‌صورت روزانه و دو بار در روز به‌مدت یک هفته انجام شد. همچنین، به‌منظور کاهش درد، تقویت سیستم ایمنی و

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

همچنین کنترل عفونت‌های ناشی از جراحی، استامینوفن (۵ سی‌سی شربت حل‌شده در ۲۵۰ سی‌سی آب) به‌مدت سه روز، ویتامین ب به‌صورت تزریق عضلانی (یک‌دهم سی‌سی) روزانه به‌مدت یک هفته و جنتامایسین (یک‌دهم سی‌سی) به‌صورت روزانه تا ۳ روز برای حیوانات در تمامی گروه‌ها در نظر گرفته شد. شکل ۱ مراحل ایجاد ضایعه نخاعی و انجام آزمایش‌ها را نشان می‌دهد.

تمرینات ورزشی

پس از اطمینان‌یافتن از حصول ضایعه نخاعی و دو هفته پس از ایجاد ضایعه در رت‌ها، پروتکل‌های تمرین هوازی که در مطالعات قبلی استفاده شده بودند، به‌صورت زیر انجام گرفت [۱۷].

پروتکل تمرینی اول شامل دویدن روی نوار گردان با سرعت ثابت ۹ متر در دقیقه در ۴ هفته و ۶ جلسه در هر هفته، صبح‌ها انجام شد. زمان تمرین در هفته اول ۱۰ دقیقه، هفته دوم ۱۵ دقیقه، هفته سوم ۲۰ دقیقه و در هفته چهارم ۳۰ دقیقه بود.

پروتکل تمرینی دوم ۱۲ جلسه در هفته (۶ جلسه صبح و ۶ جلسه عصر) به‌مدت چهار هفته انجام شد. تمامی جلسات تمرینی با سرعت ۸ متر بر دقیقه بود. زمان تمرین در هفته اول ۵ دقیقه، در هفته دوم ۵ تا ۱۰ دقیقه (با ۵ دقیقه آغاز شد و هر روز ۱ دقیقه افزایش یافت)، در هفته سوم ۱۰ تا ۱۵ دقیقه (با ۱۰ دقیقه آغاز شد و هر روز ۱ دقیقه افزایش یافت) و در هفته چهارم ۱۵ دقیقه بود. شایان ذکر است که در این گروه تمرینی، به‌هنگام صبح و عصر تمرینات با سرعت و مدت کاملاً یکسان انجام گرفت.

روش انجام تست حرکتی

به‌منظور ارزیابی بهبود حرکتی اندام تحتانی مدل‌های آسیب نخاعی رت، تست حرکتی BBB Score اجرا شد. ۲۴ ساعت بعد از جراحی، تست BBB انجام شد و حیواناتی که آسیب دیده بودند، درصورتی‌که نمره آسیب‌دیدگی‌شان از صفر کمتر بود، از مطالعه خارج شدند. شروع ارزیابی بهبود حرکتی بر اساس این تست نیز دو هفته پس از ایجاد ضایعه نخاعی بود. برای انجام این تست، ابتدا هر رت به‌طور جداگانه در داخل محفظه باز (Open Field) قرار گرفت و دو مشاهده‌گر بی‌اطلاع (Blind) به‌مدت ۴ دقیقه به رت‌ها بر اساس سیستم نمره‌دهی BBB نمره دادند [۱۸]. در این تست، میزان حرکت سه مفصل اندام تحتانی و دم مدنظر است. این تست در ۴ هفته تمرین انجام شد.

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی، ابتدا رت‌ها با تزریق صفاقی کتامین (۱۰۰mg/ Kg) – زایلازین (mg/ ۱۰Kg) بیهوش شدند. سپس، رت‌ها به‌منظور جمع‌آوری نمونه بافتی جراحی شدند. بدین ترتیب که ابتدا، پس از شکستن جمجمه، مغز به‌صورت کامل و بدون آسیب خارج شد. سپس، دو نیم‌کره بدون تخریب به‌کمک تیغ بیستوری ۲۴ از هم جدا شدند، در آخر هم جداسازی هیپوکامپ از نیم‌کره روی مخ انجام گرفت و به میکروتیوب ml ۱,۵ حاوی بافر RNA-Later منتقل شد. در انتها، نمونه‌ها برای نگهداری، به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بقایای حیوانات در چاه سپتیک معدوم شد.

بررسی بیان ژن

تست‌های مولکولی به‌منظور سنجش تغییرات بیان ژن نروتروفین۴، با استفاده از روش qRT-PCR انجام شدند. بر اساس کیت استخراج RNA (Addbio Co, Korea)، RNA استخراج و سنتز cDNA انجام شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای ژن نروتروفین۴، پرایمر به‌صورت Exon-Exon junction توسط نرم‌افزارهای PRIMER3 و نرم-افزار آنلاین IDT DNA طراحی شد و برای سنتز به شرکت ژن فناوران مستقر در شهر اصفهان سفارش داده شد. توالی و مشخصات این پرایمرها در جدول ۱ بیان شده است. واکنش Real time qPCR برای ژن هدف نروتروفین۴ مطابق با جدول ۲ انجام شد. برنامه دمایی شامل ۴ مرحله ذکرشده در جدول ۳ تنظیم شد. در انتها، داده‌های حاصل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه و میزان بیان ژن‌های هدف با نتیجه حاصل از ژن رفرنس *Actin β* نرمالیزه شدند.

شکل ۱. مراحل ایجاد ضایعه نخاعی و انجام آزمایش‌ها، (۱) تراشیدن موهای پشت حیوان، (۲) انجام لامینکتومی، (۳) بخیه‌زدن پشت حیوان و ریکاوری پس از جراحی، (۴) انجام تمرینات ورزشی در حیوان دارای ضایعه نخاعی.

جدول۱. مشخصات پرایمرها

Primer	Target	TM (°C)	PCR Product (nt)
F: CGCGAGTACAACCTTCTTGC R: ATACCCACCATCACACCCTG	Actin β	۵۹/۵۶ ۵۹/۰۸	۲۰۰
F : AGCTCAGTCTGTGTGGAATG R: CTCTTGCCAGGGTAAGTCAGG	NT4	۵۹/۳۰ ۶۰/۰۷	۱۸۲

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

جدول۲. مقادیر مورد نیاز از مواد لازم برای انجام واکنش Real-time PCR

مواد لازم	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)
مسترمیکس سایبرگرین	۱۰
مخلوط جفت پرایمر	۲
DNase free H2O	۶
cDNA	۲

جدول۳. برنامه دمایی برای انجام واکنش Real-time PCR

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	سیکل
Hold	۹۵	۳	۱ بار
دناتوراسیون	۹۵	۳۰	
اتصال پرایمر	۵۸	۲۰	۴۵ بار تکرار
طویل‌سازی	۷۲	۳۰	

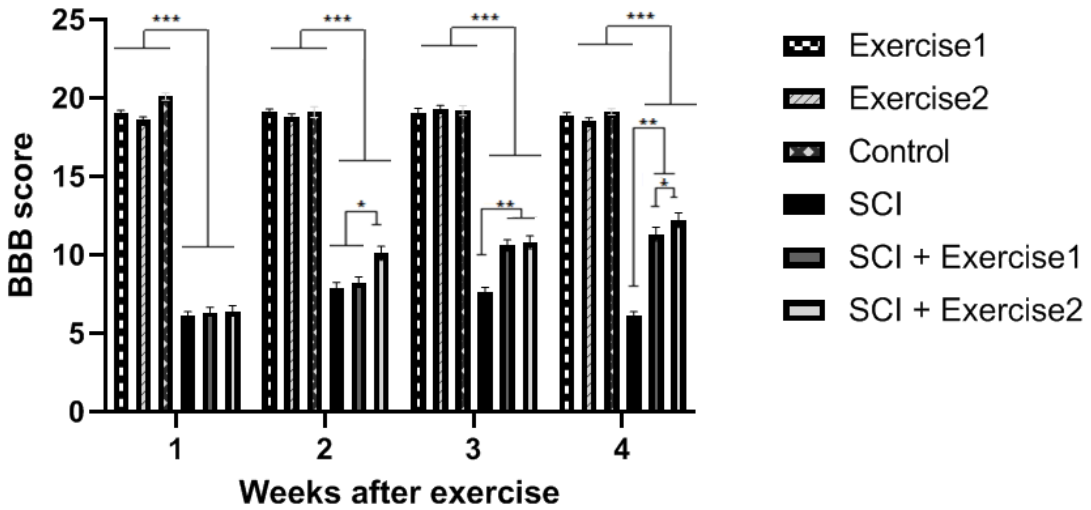
تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

پس از استخراج نتایج، از آمار توصیفی برای تعیین شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و همچنین، ترسیم جدول‌ها و نمودارها استفاده شد. با توجه به نرمال‌بودن داده‌ها از طریق آزمون شاپیروویلک، برای پی‌بردن به صحت پیش‌فرض‌های تحقیق و تجزیه‌وتحلیل اطلاعات و بررسی معنی‌داربودن تفاوت میانگین‌ها، از آمار استنباطی آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه تغییرات واریانس بین گروهی استفاده شد. همچنین، به‌منظور مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل اطلاعات توسط نرم‌افزار SPSS 20.0 و ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Graphpad prism انجام شد. همچنین، ملاک تصمیم‌گیری برای پذیرفتن یا نپذیرفتن فرضیه‌ها سطح $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۴۲ رت به‌کارگرفته‌شده در این مطالعه، ۳۳ رت تا پایان مطالعه زنده ماندند و بررسی شدند. در گروه سالم ۱ حیوان، در گروه سالم با تمرین دوم ۱ حیوان، در گروه نخاعی ۲ حیوان و در گروه ضایعه نخاعی با تمرین اول ۳ حیوان و در گروه ضایعه نخاعی با تمرین دوم ۲ حیوان تلف شدند. ارزیابی تست حرکتی ۲۴ ساعت پس از جراحی و ایجاد ضایعه نخاعی، صفربودن نمره را برای حیوانات نشان داد. میانگین نمرات تست حرکتی دوبه‌دو گروه‌ها در هفته‌های بعد از آسیب ارزیابی شد. شکل۲ نمودار مقایسه نمرات تست حرکتی را بین گروه‌ها نشان می‌دهد.

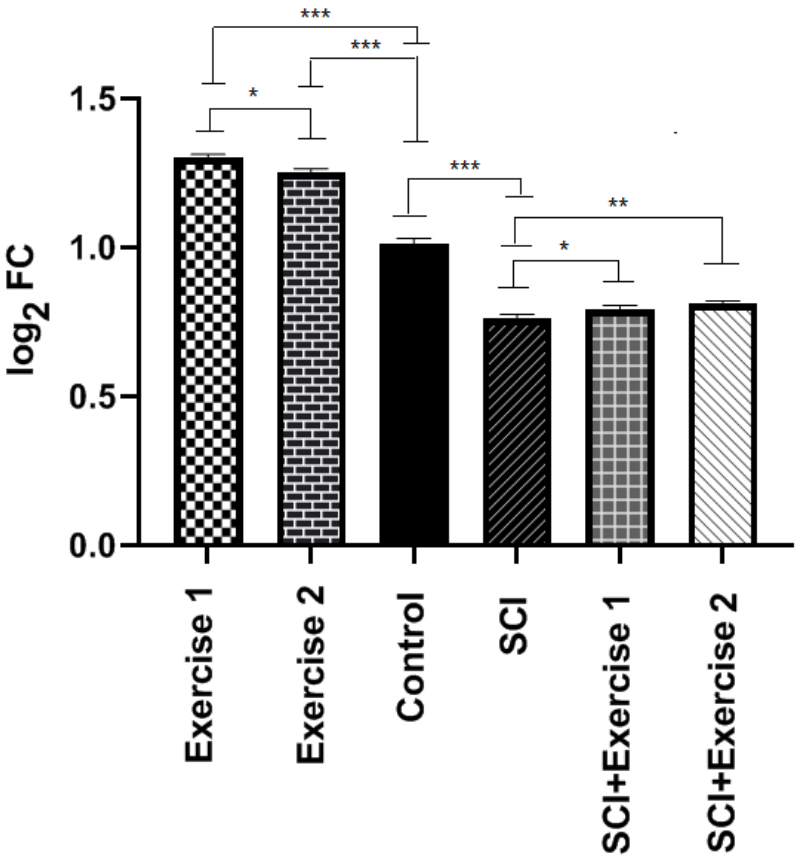
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، میانگین نمرات تست حرکتی در گروه دریافت‌کننده تمرین دوم در هفته دوم بعد از آسیب و گروه تمرین اول در هفته سوم بعد از آسیب نخاعی، در مقایسه با نمرات تست حرکتی گروه آسیب، افزایش معناداری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین، نمرات گروه سالم در همه هفته‌ها در مقایسه با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۰۱$). میانگین نمره حرکتی در هفته چهارم بعد از آسیب به‌ترتیب ۲۰،۲۰/۵، ۲۱، ۸/۲، ۱۱/۵ و ۱۲/۲ در گروه‌های کنترل سالم، سالم با پروتکل تمرینی اول، سالم با پروتکل دوم، ضایعه نخاعی، ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی اول و ضایعه نخاعی با پروتکل تمرینی دوم بود.



شکل ۲. نمودار مقایسه نمرات تست حرکتی در بین گروه ها، $P<۰/۰۵$*، $P<۰/۰۱$**، $P<۰/۰۰۱$***، داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. تعداد رت‌ها در گروه سالم ۶ سر، در گروه سالم با تمرین اول ۷ سر، در گروه سالم با تمرین دوم ۶ سر، در گروه نخاعی ۵ سر، در گروه ضایعه نخاعی با تمرین اول ۴ سر و در گروه ضایعه نخاعی با تمرین دوم ۵ سر بودند.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

مطابق دستورالعمل ذکرشده در بخش قبل، استخراج RNA صورت گرفت و پس از بررسی غلظت و خلوص آن، یک نمونه RNA استخراج‌شده به ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شد. مشاهده باندهای مربوط به ۱۸srRNA (۱/۹ Kb) و ۲۸srRNA (۵ Kb) صحت استخراج RNA را تأیید می‌کند. شکل ۳ نتایج بیان ژن نروتروفین۴ را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. بیان ژن نروتروفین۴ در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۰۱)، بیان نروتروفین۴ در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۱ با (P<۰/۰۵) و در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۲ با (P<۰/۰۱) نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بیان بین دو گروه آسیب نخاعی + تمرین تفاوت معناداری نداشت. از طرف دیگر، گروه تمرین ۱ (تمرین ۱ بدون آسیب نخاعی) نسبت به گروه سالم با (P<۰/۰۰۱) افزایش بیان ژن نروتروفین۴ را نشان داد و در گروه تمرین ۲ هم به‌صورت مشابهی نسبت به گروه کنترل، افزایش بیان ژن نروتروفین۴ را مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). شایان ذکر است که نروتروفین۴ در گروه تمرین ۱ نسبت به گروه تمرین ۲ افزایش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۵).



شکل ۳. نتایج بیان ژن نروتروفین ۴ در گروه‌های مورد مطالعه از بافت هیپوکمپ حیوانات. p<۰/۰۵ *، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۰۱ ***، داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. تعداد رت‌ها در گروه سالم ۶ سر، در گروه سالم با تمرین اول ۷ سر، در گروه سالم با تمرین دوم ۶ سر، در گروه نخاعی ۵ سر و در گروه ضایعه نخاعی با تمرین اول ۴ سر و در گروه ضایعه نخاعی با تمرین دوم ۵ سر بودند.

بحث

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر دو نوع برنامه تمرینی بر بیان ژن نروتروفین۴ و عملکرد حرکتی در مدل آسیب نخاعی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن نروتروفین۴ بافت هیپوکمپ در هر دو گروه تمرین ۱ و تمرین ۲ بر روی تردمیل در مقایسه با گروه کنترل و گروه آسیب نخاعی افزایش معناداری داشت. البته در گروه آسیب نخاعی، تفاوت بین دو نوع تمرین معنادار نبود. نروتروفین۴ متعلق به خانواده فاکتورهای نوروتروفیک است و با گیرنده تیروزین‌کیناز B (trkB) تعامل دارد. NT-4 دارای اثرهای محافظت‌کننده عصبی است. نقش NT-4 ممکن است شبیه به فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) باشد؛ زیرا هر دو با trkB تعامل دارند. Chung و همکاران، طی مطالعات خود نشان دادند که در مدل رت انسداد شریان میانی مغزی، ایسکمی باعث کاهش بیان *NT-4* و *trkB* می‌شود. ورزش تردمیل بیان *NT-4* را در نیم کره طرف مقابل در رت‌های مبتلا به آسیب ایسکمیک افزایش داده است. TrkB همچنین، الگوهای مشابه نوروتروفین‌های خود را نشان داد [۱۹]. Fathi و همکاران، طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که هشت هفته تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن پروتئین NT4/5 در عضلات رت‌های نر نژاد ویستار می‌شود[۲۰]. Yazdanian و همکاران،

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که ایسکمی مغزی با مرگ نورونی درخور توجهی در ناحیه CA1 هیپوکامپ همراه است؛ اما ورزش به‌طور معنی‌داری مرگ سلولی ناشی از ایسکمی را کاهش می‌دهد. بیان *NT-4* در گروه کنترل + ایسکمی و در گروه ورزش + ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل + سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بوده است؛ اما از نظر بیان *NT-4*، بین گروه کنترل + ایسکمی و گروه ورزش + ایسکمی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است [۲۱]. در این مطالعه، با به‌کارگیری پروتکل‌های ورزشی، افزایش کارایی حرکتی در رت‌های دارای آسیب نخاعی مشاهده شد. نتایج ارزیابی‌های حرکتی نیز بهبود حرکتی حیوان دچار ضایعه نخاعی را نسبت به گروه آسیب نخاعی و گروه‌های سالم نشان می‌دهد. فعالیت بدنی برنامه‌ریزی‌شده، ساختاریافته و تکراری طراحی‌شده موجب تشکیل شبکه‌های نخاعی و ماهیچه‌های اسکلتی می‌شود که اثرهای مفید درخور توجهی بر مجموعه‌ای از سیستم‌های عملکردی می‌گذارد [۲۲]. ورزش به‌سرعت و به‌طور برجسته بر جوانه‌زدن دندریتیک، اتصالات سیناپسی، تولید و تنظیم انتقال‌دهنده‌های عصبی و هموستاز یونی تأثیر می‌گذارد. طبق مطالعات اخیر، افزایش نوروتروفین‌های ناشی از ورزش به‌عنوان سنگ بنای پیونددهنده بسیاری از این اثرها به هم مرتبط است [۲۳]. ورزش تردمیل به‌طور گسترده‌ای، راهبردی مؤثر برای بازیابی عملکرد حرکتی پس از آسیب نخاعی در نظر گرفته می‌شود. بااین‌حال، شدت تمرینی خاص که ریکاوری را بهینه می‌کند، مبنای مکانیکی زیربنایی‌اش نامشخص است؛ از این‌رو، در این مطالعه به بررسی تأثیر دو نوع تمرین با شدت‌های مختلف روی تردمیل در رت‌های دچار ضایعه نخاعی از طریق ارزیابی مولکولی بافت هیپوکمپ پرداخته شد. همراهی پروتکل ورزش با تردمیل با دریافت داروهای رایج در درمان آسیب نخاعی، سنجش میزان نوروژنز نخاعی در گروه‌های مورد مطالعه و سنجش RNAهای غیرکننده و miRNAهای مسیر PI3K/AKT نیز می‌توانند در تحقیقات بعدی بررسی شوند.

مدل آسیب طناب نخاعی استفاده‌شده در این مطالعه از نوع له‌شدگی است که با توجه به مطالعات قبلی، بعد از ایجاد آسیب برای تأیید صحت ایجاد مدل، ۲۴ ساعت بعد تست حرکتی انجام شد و نمره رت‌های آسیب‌دیده صفر بود. نحوه ایجاد مدل آسیب طناب نخاعی از نوع رهاکردن وزنه بود که در مطالعات قبلی برای ایجاد آسیب از نوع له‌شدگی از این روش استفاده شده و تأیید شده بود [۱۵]. به ارزیابی سایر مدل‌های آسیب نخاعی نیز می‌تواند در تحقیقات بعدی توجه شود. از جمله نقاط قوت این مطالعه ارزیابی مدل آسیب نخاعی بر اساس تست عملکرد حرکتی در کنار بررسی بیان ژن نوروتروفین۴ بود. ازآنجایی‌که پروتکل‌های اصلی درمانی امروزه به‌سمت پروتکل‌های ترکیبی می‌روند، استفاده هم‌زمان از پروتکل‌های ورزشی همراه با پروتکل‌های دارویی و همچنین، پروتکل‌های تحریکی همچون استفاده از تحریک الکتریکی عملکردی می‌توانند ارزیابی‌ها را تکمیل کنند و راهکارهای مناسب‌تری را برای درمان آسیب نخاعی پیش روی محققان قرار دهند. همچنین، ارزیابی سایر مدل‌های نخاعی و بررسی سایر فاکتورهای مرتبط نیز می‌تواند به این مهم کمک کند.

انجام این تحقیق همراه با مشکلات زیادی از جمله تلف‌شدن رت‌ها در مراحل متعدد لامینکتومی، ضایعه نخاعی و نگهداری پس از آن بود. به‌طوری که از مجموع ۴۲ سر رت مورد آزمایش، ۳۳ سر زنده ماندند. مهم‌ترین مشکل نگهداری رت‌های دارای ضایعه نخاعی به‌مدت ۶ هفته بود. بیشترین تلفات به گروه‌های ضایعه نخاعی، به‌خصوص در دو هفته اول بعد از عمل جراحی مربوط بود که علت آن زخم‌شدن و خوردن پنجه‌های پا بر اثر بی‌حسی و در نتیجه، عفونت شدید یا پاره‌شدن مثانه به‌طور خودبه‌خود بر اثر احتباس ادراری یا پاره‌شدن آن در حین تخلیه بر اثر فشار بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میانگین نمرات تست حرکتی در گروه دریافت‌کننده تمرین دوم در هفته دوم بعد از آسیب و گروه تمرین اول در هفته سوم بعد از آسیب نخاعی، در مقایسه با نمرات تست حرکتی گروه آسیب، افزایش معناداری داشت ($P<۰/۰۵$). بیان ژن نوروتروفین۴ در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، همچنین، نوروتروفین۴ در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۱ و در گروه آسیب نخاعی + تمرین ۲ نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بیان بین دو گروه آسیب نخاعی + تمرین، تفاوت معناداری نداشت؛ بنابراین، پروتکل‌های تمرینی در این مطالعه، علاوه بر ایجاد بهبود حرکتی در حیوانات دچار ضایعه نخاعی، بر بیان ژن نوروتروفین۴ مؤثر بودند و می‌توانند عاملی برای رشد آکسونی و بقای نورونی در بهبودی ضایعه نخاعی باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارکنان محترم آزمایشگاه حیوانات و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

در رابطه با انتشار مقاله تسلیمی تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Maier IC, Schwab ME. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;**361**:1611-1634. **DOI:** 10.1098/rstb.2006.1890 **PMID:** 16939978
2. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singap.* 2007;**36**(1):49-57. **PMID:** 17285186
3. Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CRA. A brief overview on BDNF-Trk pathway in the nervous system: a potential biomarker or possible target in treatment of multiple sclerosis?. *Front Neurol.* 2022;**13**:1-14. **DOI:** 10.3389/fneur.2022.917527 **PMID:** 35911894

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]

4. Hallbook F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron*. 1991;**6**(5):845-858. **DOI:** 10.1016/0896-6273(91)90180-8 **PMID:** 2025430
5. Harada C, Harada T, Quah HM, Namekata K, Yoshida K, Ohno S. Role of neurotrophin-4/5 in neural cell death during retinal development and ischemic retinal injury in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;**46**(2):669-673.
6. Ying Z, Roy RR, Zhong H, Zdunowski S, Edgerton VR, Gomez-Pinilla F. BDNF–exercise interactions in the recovery of symmetrical stepping after a cervical hemisection in rats. *Neuroscience*. 2008;**155**(4):1070-1078. **DOI:** 10.1016/j.neuroscience.2008.06.057 **PMID:** 18672032
7. Barker PA, Mantyh P, Arendt-Nielsen L, Viktrup L, Tive L. Nerve growth factor signaling and its contribution to pain. *J Pain Res*. 2020;**13**:1223-1241. **DOI:** 10.2147/JPR.S247472 **PMID:** 32547184
8. Hibbert AP, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 2003;**278**(48):48129-48136. **DOI:** 10.1074/jbc.M300961200 **PMID:** 12970359
9. Jung SY, Seo TB, Kim DY. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. *J Exerc Rehabil*. 2016;**12**(4):284-292. **DOI:** 10.12965/jer.1632698.349 **PMID:** 27656624
10. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2003;69(5):341-374. **DOI:** 10.1016/s0301-0082(03)00019-4 **PMID:** 12787574
11. Chao T, Askari S, De Leon R, Won D. A system to integrate electrical stimulation with robotically controlled treadmill training to rehabilitate stepping after spinal cord injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2012;**20**(5):730-737. **DOI:** 10.1109/TNSRE.2012.2202292 **PMID:** 22692941
12. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;**1**(5):549-553. **DOI:** 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x **PMID:** 7188352
13. Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn Sci*. 2013;**17**(10):525-544. **DOI:** 10.1016/j.tics.2013.08.001 **PMID:** 24029446
14. Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol*. 2014;**114**:25-57. **DOI:** 10.1016/j.pneurobio.2013.11.002 **PMID:** 24269804
15. Salarinia R, Sadeghnia HR, Alamdari DH, Hoseini SJ, Mafinezhad A, Hosseini M. Platelet rich plasma: Effective treatment for repairing of spinal cord injury in rat. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2017;**51**(3):254-257. **DOI:** 10.1016/j.aott.2017.02.009 **PMID:** 28462801
16. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TE. Standardization of spinal cord injury in Wistar rats. *Acta Ortop Bras*. 2010;**18**(4):182-186.
17. 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. **DOI:** 10.1007/s13105-010-0068-9 **PMID:** 21207218
18. Barros Filho TE, Molina AE. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats. *Clinics*. 2008;**63**(1):103-108. **DOI:** 10.1590/s1807-59322008000100018 **PMID:** 18305873
19. Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *PLoS One*. 2013;**8**(3):e52461. **DOI:** 10.1371/journal.pone.0052461 **PMID:** 23526925
20. Fathi M, Ahmadabadi S. The effect of endurance training on increase of myoD gene expression in rat slow and fast-twitch muscles. *Armaghane Danesh*. 2021;**26**(4):634-645.
21. Yazdanian M, Moazami M, Shabani M, Cheragh Birjandi S. Effects of exercise preconditioning on neurotrophin-4 and tropomyosin receptor kinase B expression in the hippocampal CA1 region following transient global cerebral ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Med Lab J*. 2019;**13**(6):23-28. **DOI:** 10.29252/mlj.13.6.23
22. Legg Ditterline BE, Aslan SC, Randall DC, Harkema SJ, Castillo C, Ovechkin AV. Effects of respiratory training on heart rate variability and baroreflex sensitivity in individuals with chronic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2018;**99**(3):423-432. **DOI:** 10.1016/j.apmr.2017.06.033 **PMID:** 28802811
23. Bilchak JN, Caron G, Côté MP. Exercise-induced plasticity in signaling pathways involved in motor recovery after spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. 2021;**22**(9):48-58. **DOI:** 10.3390/ijms22094858 **PMID:** 34064332

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-21]