مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۷ ، شماره ۵
آذر-دی ۱۴۰۳، صفحه ۱۳۵۷-۱۳۴۶

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol 67, No.5, P: 1346-1357
Dec-Jan 2024

**مقاله اصلی**

# مقایسه تأثیر دو نوع تمرین هوازی بر روی بیان ژن GDNF و گیرنده آن GFRα1 در رت‌های دچار ضایعه نخاعی

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۵- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷**

سینا جلیلی راستی[۱]
صادق چراغ بیرجندی[۲*]
محمد امین یونسی هروی[۳]
علی یعقوبی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری،گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد،دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران.
[۲] استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد،دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران. (نویسنده مسئول)
[۳] استادیار گروه فیزیک پزشکی و رادیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد،دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران.

Email: s_birjandi2001@yahoo.com

## خلاصه

**مقدمه:** هدف از این مطالعه بررسی چهار هفته تمرین هوازی منتخب بر بیان ژن **GDNF** و گیرنده آن **GFRα1** در هیپوکامپ رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، رت‌ها به صورت تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. حیوانات تحت بیهوشی عمومی‌و از طریق جراحی ستون فقرات **T11-T9** مورد ضایعه نخاعی قرار گرفتند و پس از گذشت دو هفته ریکاوری تمرینات هوازی در دو مدل بر روی آن‌ها اجرا شد. پس از تمرین بافت هیپوکامپ مغزی جهت بررسی بیان ژن فاکتور **GDNF** و گیرنده آن **GFRα1** برداشته شد.

**نتایج:** بیان ژن GDNF در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، همچنین بیان این ژن در گروه آسیب نخاعی تمرین اول و در گروه آسیب نخاعی تمرین دوم نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بین دو گروه آسیب نخاعی با دو تمرین هوازی تفاوت معناداری را نشان نداد. بیان ژن گیرنده GFRα1 در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت. بیان این ژن در گروه آسیب نخاعی تمرین اول و در گروه آسیب نخاعی تمرین دوم نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بین دو گروه آسیب نخاعی با دو تمرین هوازی تفاوت معناداری را نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** پروتکل‌های تمرینی این مطالعه باعث افزایش بیان ژن GDNF و گیرنده آن GFRα1 در رت‌های ضایعه نخاعی شده و میتوان آن را به عنوان عامل کمک کننده به رشد عصبی و و بقای نرونی در مدل‌های ضایعه نخاعی در نظر گرفت.

**کلمات کلیدی:** آسیب طناب نخاعی، تمرین هوازی، بیان ژن **GDNF**، بیان ژن گیرنده **GFRα1**

**مقدمه**

آسیب طناب نخاعی (SCI) با ترکیب پیچیده ای از رویدادهای پاتولوژیک که پس از آسیب اولیه ایجاد می‌شود مشخص می‌شود. آسیب مکانیکی به نورون‌ها و بافت‌های نرم اطراف و همچنین سلول‌های اندوتلیال عروقی، تأثیر اصلی آسیب است. نکروز یا مرگ سلولی در نتیجه آسیب مکانیکی یا ایسکمی‌ایجاد می‌شود (۱). آسیب ثانویه از چند دقیقه تا چند هفته پس از آسیب رخ می‌دهد و شامل مرگ سلولی به دلیل التهاب، انتشار گلوتامات، آزادسازی اسید آمینه تحریکی، توسعه زخم گلیال و در نهایت آپوپتوز سلول عصبی است. جدای از این شرایط، مواد شیمیایی و سایر مواد در محل آسیب تولید می‌شوند و از رشد آکسون جلوگیری می‌کنند (۲). در نتیجه، نیاز به تکنیک‌های درمانی نوآورانه وجود دارد که ممکن است آسیب ثانویه و آپوپتوز را محدود کند و در عین حال رشد آکسون را افزایش دهد. با توجه به شدت معلولیت ناشی از ضایعات نخاعی و افزایش تعداد افرادی که از آن رنج می‌برند، تلاش‌های زیادی برای التیام این آسیب صورت گرفته است. علیرغم تلاش‌های محققان و پیشرفت‌های قابل توجه در درمان و جراحی پس از ضایعه، و همچنین معرفی رویکردهای سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی در این جمعیت بیمار، هیچ درمان قابل قبول و نهایی برای آسیب‌های نخاعی ایجاد نشده است. در شرایط طبیعی خود، نورون‌ها ممکن است با تحریک تولید مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با ترمیم که توسط آکسون‌ها انجام می‌شود، فرآیند ترمیم غیرفعال را که پس از ایجاد ضایعه دارند، درگیر کنند (۳-۵). اثرات دقیق عوامل رشد مختلف بر روی بافت‌های محیطی مانند ماهیچه‌ها و انواع مختلف نورون‌ها ناشناخته است. می‌توان تصور کرد که یک نوروتروفین تأثیر زیادی روی یک نورون داشته باشد در حالی که تأثیری بر نورون دیگر ندارد. علاوه بر این، نوروتروفین‌های مختلف ممکن است پاسخ‌های متمایزی را در نورون‌های مختلف ایجاد کنند (۶). فاکتور نوروتروفیک مشتق از خط سلول گلیال (GDNF) توسط ماهیچه‌های اسکلتی تولید می‌شود و بر نورون‌های حرکتی محیطی تأثیر می‌گذارد. افزایش بیان GDNF در عضله اسکلتی منجر به عصب دهی بیشتر اتصالات عصبی عضلانی می‌شود، در حالی که پس از تولد GDNF باعث بازسازی سیناپسی در اتصال عصبی عضلانی می‌شود. مطالعات نشان داده اند که انجام فعالیت بدنی باعث ایجاد تغییراتی در اتصال عصبی عضلانی می‌شود.(۷) در یک مغز بالغ و سالم، فاکتور نوروتروفیک مشتق از خط سلول گلیال(GDNF) منحصراً توسط نورون‌ها بیان می‌شود، و در برخی موارد، نشان داده شده است که از یک زیرمجموعه عصبی منفرد نیز منشاء می‌گیرد. کمپلکس GDNF/GFRα1 از طریق فعل و انفعالات با گیرنده بازآرایی در حین انتقال (RET) یا از طریق مولکول چسبندگی سلول عصبی (NCAM) با میل ترکیبی کمتر سیگنال می‌دهد (۸).

GDNFیک عامل بقای قوی برای نورون‌های دوپامینرژیک و نورون‌های نورآدرنرژیک لوکوس سیرولئوس نسبت به سایر عوامل نوروتروفیک است و یک عامل بقای تقریباً ۱۰۰ برابر کارآمدتر برای نورون‌های حرکتی ستون فقرات نسبت به نوروتروفین‌ها است (۹). GDNF ارتباط دور با فاکتور رشد تبدیل کننده-بتا دارد و به طور گسترده در بسیاری از بافت‌های عصبی و غیر عصبی بیان می‌شود. GDNF از یک سیستم گیرنده چند زیر واحدی استفاده می‌کند که در آن GFRalpha-1 و Ret به ترتیب به عنوان اجزای اتصال لیگاند و سیگنال دهنده عمل می‌کنند. خاصیت قدرتمند محافظت کنندگی عصبی و ترمیم کننده عصبی GDNF که در مطالعات نشان داده شده است(۱۰). یافته‌ها نشان می‌دهد که سیگنال‌دهی GDNF/GFRα1 نقش اساسی در پلاستیسیته نرون‌ها ایفا می‌کند و ادغام نورون‌های جدید تولید شده را کنترل می‌کند (۱۱). کمپلکس مولکولی گیرنده خانواده آلفا ۱ GDNF (GFRα1) نقش مهمی‌در رشد دندریتیک و تشکیل سیناپس در نورون‌های هرمی‌هیپوکامپ در طی رشد اولیه پس از تولد دارد و نتایج نشان می‌دهد که کمپلکس GDNF-GFRα1 برای توسعه مناسب مدار هیپوکامپ ضروری است (۱۲). مطالعات اثرهای مثبت فعالیت بدنی و ورزش را بر مغز (وزن

مغز، محتوای نوروترنسمیترها، شکل پذیری سیناپسی، نوروژنز هیپوکمپ در بزرگسالی، آنژیوژنز، سیناپتوژنز، افزایش بقا و تمایز سلول‌های عصبی و همچنین افزایش نروتروفین ها) نشان داده اند. این تغییرات با عملکرد رفتاری نیز مرتبط است (۱۳). اثرات بیولوژیکی که در ترمیم نخاع وجود دارند تا حد زیادی نامشخص باقی مانده اما این احتمال وجود دارد که ترکیباتی که در فاز ثانویه آسیب تولید می‌شوند نقش مهمی‌در این ترمیم ایفا می‌کنند (۱۴). از همین رو درک و شناخت چگونگی اثرات مفید فعالیت بدنی منظم و تمرینات ورزشی در فاز ثانویه آسیب نخاعی لازم و ضروری به نظر میرسد. همچنین با توجه بر اینکه درمان‌های کارآمد در آینده باید تلفیق از چند روش برای بهبود بیماری باشند، از همین جهت باید اثر تمرینات منتخب بر عوامل نوروتروفیکی که در رشد و بقای نرون ها، باززایی آکسون ها، تنظیم رشد آکسون و دندریت، تشکیل سیناپس و بقای نورون‌های بالغ نقش مهمی‌دارند مورد بررسی قرار گیرند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر چهار هفته تمرین هوازی در دو مدل مختلف بر بیان ژن GDNF و گیرنده آن GFRα1 از بافت هیپوکامپ در رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی بود.

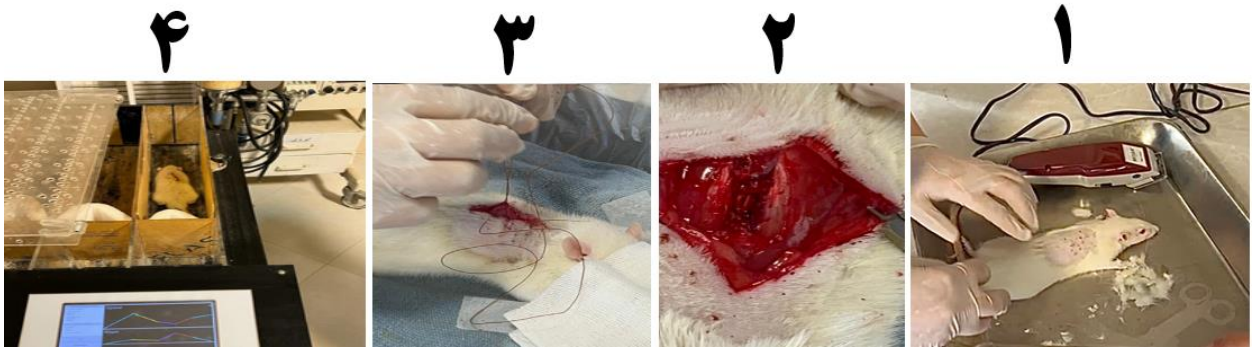
## روش کار

این مطالعه که از نوع تجربی است که بر 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 الی ۱۲ هفته وارد مطالعه شدند. حیوانات در محیطی ۳± ۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ به ۱۲ ساعت نگهداری شدند. رت‌ها در قفس‌های از جنس پلکسی گلاس با درب توری به ابعاد ۲۵ × ۲۷ × ۴۳ سانتی متری قرار گرفتند، به طوری که دسترسی به آب و غذای استاندارد برای آن‌ها محدودیتی وجود نداشت. حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه مساوی تقسیم شدند که در هر گروه ۷ سر موش قرار گرفت (۱۵). تمامی‌مراحل نگهداری و انجام آزمایش‌های لازم حیوانات با رعایت کامل اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل هلسینکی انجام شد. این مطالعه بخشی از مطالعه ای بوده است که با تصویت در کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی انجام شد. (IR.NKUMS.REC.1402.058)

### نحوه ایجاد ضایعه نخاعی

ابتدا رت‌ها توسط تزریق کتامین ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم با استفاده از سرنگ انسولین به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از بیهوش شدن حیوان موهای موضع تراشیده شد و تمام سطح پشتی حیوان با الکل ۷۰ درصد و بعد از آن با بتادین جراحی تمیز و ضدعفونی شد. برای ایجاد برش جراحی پس از مشخص کردن محل برش، پوست را به اندازه ۲/۵ سانتی متر به سمت سری و دمی‌حیوان و در امتداد ستون فقرات برش داده شد. پس از بریدن فاسیای سطحی و عمقی و کنار زدن عضلات مجاور زائده خاری مهره T9 تا T11 برای برش لامینا از یک فرز دندانپزشکی متصل به یک دریل کوچک استفاده شد. لامینوکتومی‌در مهره T11 انجام گرفت.سپس مهره‌ها توسط دستگاه استریوتکس ثابت شده و توسط وزنه ۱۰ گرمی‌یک ضربه بر روی نخاع از ارتفاع ۲۵ میلی متری یا استفاده از استوانه توخالی اعمال گردید (۱۶). سپس بلافاصله عضلات و فاسیا با استفاده از نخ جذب شماره ۴-۰ بخیه زده شد. گروه های 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 تغذیه ای مانند رت سالم بود، به طوری 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 توسط تست حرکتی BBB ( Basso Beattie Bresnahan locomotor) صورت گرفت. بر این اساس، میزان حرکت حیوان در دو مفصل تحتانی معیار ارزیابی بود. بدین صورت ۲۴ ساعت بعد از جراحی، تست BBB انجام شد و رت هایی که بر روی آنها ضایعه نخاعی ایجاد شده بود، درصورتیکه نمره آسیب

دیدگیشان از ۳ بیشتر بود، از مطالعه خارج شدند. شروع ارزیابی بهبود حرکتی بر اساس این تست نیز دو هفته پس از ایجاد ضایعه نخاعی بود. برای این تست، ابتدا هر رت به طور جداگانه در داخل محفظه باز Open Field قرار گرفت و دو مشاهده گر بی اطلاع Blind به مدت ۴ دقیقه به رت‌ها بر اساس سیستم نمره دهی BBB نمره دادند (۱۷). به منظور جلوگیری از تجمع طولانی مدت ادرار در مثانه، کشیده شدن بیش ازحد آن و در شدیدترین حالت، پارگی دیواره آن، که می تواند به مرگ حیوان منجر شود، تخلیه مثانه به صورت روزانه و دو بار در روز به مدت یک هفته انجام شد. همچنین، به منظور کاهش درد، تقویت سیستم ایمنی و همچنین کنترل عفونت های ناشی از جراحی، استامینوفن ۵ سی سی شربت حل شده در ۲۵۰ سی سی آب به مدت سه روز، ویتامین ب به صورت تزریق عضلانی یک دهم سی سی روزانه به مدت یک هفته و جنتامایسین یک دهم سی سی به صورت روزانه تا ۳ روز برای حیوانات در تمامی گروه‌ها در نظر گرفته شد. شکل ۱ مراحل ایجاد ضایعه نخاعی و انجام آزمایش‌ها را نشان می دهد.




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

## تمرینات ورزشی

پس از بررسی ضایعه نخاعی توسط تست حرکتی BBB و اطمینان از حصول ضایعه رت‌ها به مدت دو هفته نگهداری و مراقب شدند و پس از گذشت دو هفته، پروتکل های تمرین هوازی که در مطالعات قبلی استفاده شده بودند، به صورت زیر انجام گرفت (۱۸). پروتکل تمرینی اول شامل دویدن روی نوار گردان با سرعت ثابت ۹ متر در دقیقه و ۶ روز در هفته و یک نوبت در روز به مدت ۴ 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 دویدن روی نوار گردان با سرعت ثابت ۸ متر در دقیقه و ۶ روز در هفته و دو نوبت در روز (یک نوبت صبح و یک نوبت عصر با سرعت و مدت یکسان) به مدت ۴ هفته اجرا شد . 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 ۱۵دقیقه ) با ۱۰ دقیقه آغاز شد و هر روز ۱ دقیقه افزایش یافت (در هفته چهارم ۱۵ دقیقه بود). ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی ،ابتدا رت‌ها با تزریق صفاقی کتامین (۱۰۰mg/ Kg)- زایلازین(10mg/ Kg) بیهوش شدند. سپس، رت‌ها به منظور جمع آوری نمونه بافتی جراحی شدند. بدین ترتیب که ابتدا، پس از شکستن جمجمه، مغز به صورت کامل و بدون آسیب خارج شد. سپس، دو نیمکره بدون تخریب به کمک تیغ بیستوری ۲۴ از هم جدا شدند، در آخر هم جداسازی هیپوکامپ از نیمکره روی مخ انجام گرفت و به میکروتیوب1.5 ml حاوی بافرRNA-Later منتقل شد. در انتها، نمونه‌ها برای نگهداری، به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. بقایای حیوانات در چاه سپتیک معدوم شد.

**بررسی بیان ژن**

تست های مولکولی به منظور سنجش تغییرات بیان ژن GDNF و GFRα1، با استفاده از روش qRT-PCR انجام شدند. بر اساس کیت استخراج RNA RNA، Addbio Co, Korea استخراج و سنتز cDNA انجام شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای بیان ژن GDNF، بیان ژن گیرنده GFRα1 پرایمر به صورت Exon junction-Exon توسط نرم افزارهای PRIMER3 و نرم افزار آنلاین IDT طراحی‌شده و جهت سنتز به شرکت ژن فناوران مستقر در شهر اصفهان سفارش داده شد. توالی و مشخصات این پرایمرها در جدول ۱ بیان شده است. مقادیر مورد نیاز Real time qPCR برای ژن هدف GDNF و GFRα1 مطابق با جدول ۲ انجام شد. برنامه دمایی شامل چهار 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 $\beta$ *Actin* نرمالیزه شدند.

**جدول ۱**. مشخصات پرایمرهای ژن

| Target | PCR Product | TM (oC) | Primer |
|---|---|---|---|
| GFRα1 | ۱۴۶ | ۵۷,۲ | F : GCGTATCTACTGGAGCATG |
| | | ۵۶,۸۲ | R : AAATGTGTTCCACTTGCTGG |
| GDNF | ۲۰۷ | ۵۷,۵۸ | F :AGACCGGATCCGAGGTG |
| | | ۵۷,۰۹ | R: TCTTCGGGCATATTGGAGTC |
| Actin β | ۲۰۰ | ۵۹/۵۶ | F: CGCGAGTACAACCTTCTTGC |
| | | ۵۹/۰۸ | R: ATACCCACCATCACACCCTG |

**جدول ۲.** مقادیر مورد نیاز مواد لازم جهت انجام واکنش Rael-time PCR

| مواد لازم | حجم مورداستفاده (میکرو لیتر) |
|---|---|
| مسترمیکس سایبرگرین | ۱۰ |
| مخلوط جفت پرایمر | ۲ |
| DNase free H2O | ۶ |
| cDNA | ۲ |

**جدول ۳.** برنامه‌ی دمایی برای انجام واکنش Real-time PCR

| مرحله | دما | زمان | سیکل |
|---|---|---|---|
| Hold | ۹۵ درجه | ۳ دقیقه | ۱ بار |
| دناتوراسیون | ۹۵ درجه | ۳۰ ثانیه | ۴۵ بار تکرار |
| اتصال پرایمر | ۵۸ درجه | ۲۰ ثانیه | |
| طویل سازی | ۷۲ درجه | ۳۰ ثانیه | |

## تجزیه وتحلیل داده‌ها

پس از استخراج نتایج، از آمار توصیفی برای تعیین شاخص های میانگین و انحراف معیار و همچنین، ترسیم جدول‌ها و نمودارها استفاده شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون شاپیروویلک، برای پی بردن به صحت پیش فرض‌های تحقیق و تجزیه وتحلیل اطلاعات و بررسی معنی داربودن تفاوت میانگین ها، از آمار استنباطی آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA برای مقایسه تغییرات واریانس بین گروهی استفاده شد .همچنین، به منظور مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه وتحلیل اطلاعات توسط نرم افزار (SPSS۲۰,۰) و ترسیم نمودارها توسط نرم افزار Graphpad prism انجام شد. همچنین، ملاک تصمیم گیری برای پذیرفتن یا نپذیرفتن فرضیه‌ها سطح $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

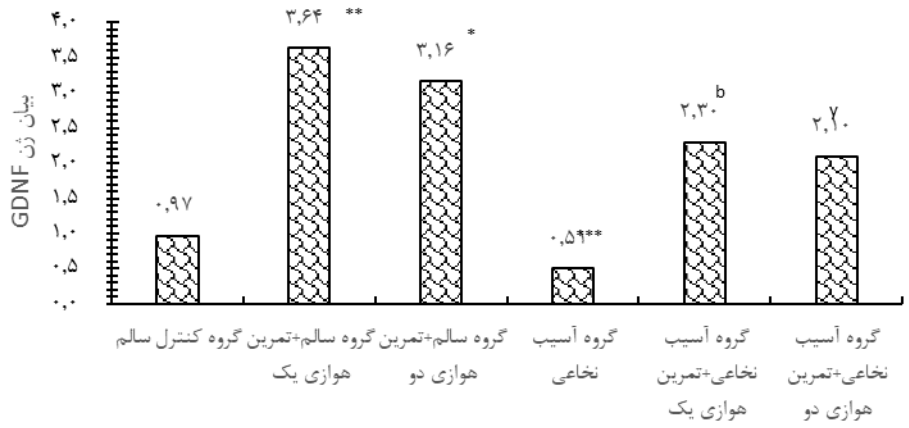
## نتایج

از ۴۲ رت به کارگرفته شده 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، زیر ۳ بودن نمره را برای حیوانات نشان داد. مطابق دستورالعمل ذکرشده در بخش قبل، استخراج RNA صورت گرفت و پس از بررسی غلظت و خلوص آن، یک نمونه RNA استخراج شده به ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شد. مشاهده باندهای مربوط به Kb 18srRNA 1/9 و 28srRNA 5 Kb صحت استخراج RNA را تأیید می کند. با توجه به نتایج به دست آمده شکل ۲ نتایج بیان ژن GDNF و شکل ۳ بیان ژن GFRα1 را در گروه های مختلف نشان می دهد. نتایج بدست آمده در بیان ژن گیرنده GDNF نشان داد که بین گروه کنترل با گروه سالم + تمرین هوازی یک ($p=۰/۰۰۱$)، گروه سالم + تمرین هوازی دو ($p=۰/۰۰۱$)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک ($p=۰/۰۰۱$) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو ($p=۰/۰۰۱$) اختلاف معنادار بود. همچنین گروه سالم+تمرین هوازی یک با گروه آسیب نخاعی ($p=۰/۰۰۱$)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک ($p=۰/۰۰۱$) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو ($p=۰/۰۰۱$) اختلاف معنادار داشت. از سویی دیگر همچنین گروه سالم+تمرین هوازی دو با گروه آسیب نخاعی ($p=۰/۰۰۱$)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک ($p=۰/۰۰۱$) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو ($p=۰/۰۰۱$) اختلاف معنادار مشاهده شد و اینکه بین گروه آسیب نخاعی با گروه‌های آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک ($p=۰/۰۰۰۱$) و آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو ($p=۰/۰۰۱$) اختلاف معنادار بود. (مطابق جدول ۴ و شکل ۱).

**جدول ٤.** نتایج آزمون آنوای یک طرفه مربوط به بیان ژن GDNF بین گروه ها

| متغیر | گروه ها | آمار توصیفی | | آمار استنباطی | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | میانگین | انحراف استاندارد | آماره | سطح معناداری |
| بیان ژن GDNF | کنترل | ۰/۹۷ | ۰/۰۳ | ۱۳۳/۲۵ | *۰/۰۰۱ |
| | سالم + تمرین هوازی یک | ۳/۶۴ | ۰/۱۰ | | |
| | سالم + تمرین هوازی دو | ۳/۱۶ | ۰/۱۲ | | |
| | آسیب نخاعی | ۰/۵۱ | ۰/۰۴ | | |
| | آسیب نخاعی + تمرین هوازی یک | ۲/۳۰ | ۰/۴۰ | | |
| | آسیب نخاعی + تمرین هوازی دو | ۲/۱۰ | ۰/۱۰ | | |

* سطح معنا داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.




**شکل۲.** نمودار تغییرات بیان ژن GDNF بین گروه‌ها

*اختلاف بین گروه کنترل با گروه سالم+تمرین هوازی یک
**اختلاف بین گروه کنترل با گروه سالم+تمرین هوازی دو
***اختلاف بین گروه کنترل با گروه آسیب نخاعی
**** اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با نوع دو
y اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با آسیب نخاعی+تمرین هوازی نوع دو
b اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با آسیب نخاعی+تمرین هوازی نوع یک

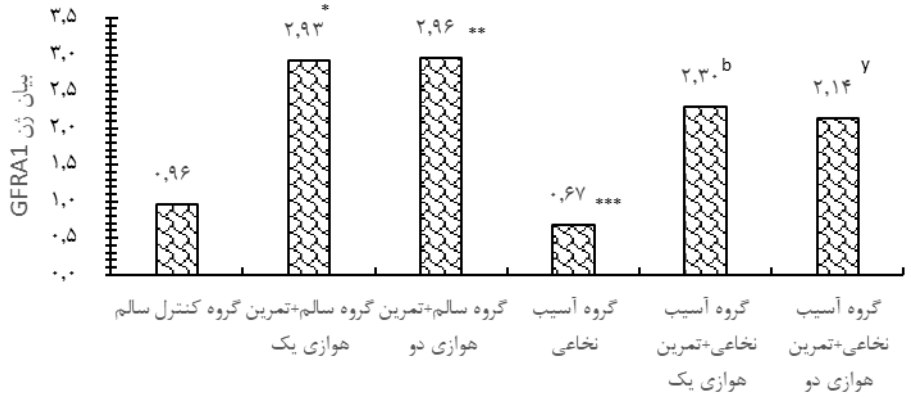
و همچنین نتایج بدست آمده برای بیان ژن GFRα1 نشان داد که بین گروه کنترل با گروه سالم + تمرین هوازی یک (P=۰/۰۰۱)، گروه سالم + تمرین هوازی دو (P=۰/۰۰۱)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک (P=۰/۰۰۱) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو (P=۰/۰۰۱) اختلاف معنادار بود. همچنین گروه سالم+تمرین هوازی یک با گروه آسیب نخاعی (P=۰/۰۰۱)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک (P=۰/۰۰۱) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو (P=۰/۰۰۱) اختلاف معنادار داشت. از سویی دیگر همچنین گروه سالم+تمرین هوازی دو با گروه آسیب نخاعی (P=۰/۰۰۱)، گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک (P=۰/۰۰۱) و گروه آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو (P=۰/۰۰۱) اختلاف معنادار مشاهده شد و اینکه بین گروه آسیب نخاعی با گروه‌های آسیب نخاعی+تمرین هوازی یک (P=۰/۰۰۰۱) و آسیب نخاعی+تمرین هوازی دو (P=۰/۰۰۱) اختلاف معنادار بود.(مطابق جدول ۵ و شکل ۳).

**جدول ۵.** نتایج آزمون آنوای یک طرفه مربوط به بیان ژن GFRα1 بین گروه‌ها

| متغیر | گروه ها | آمار توصیفی | | آمار استنباطی | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | میانگین | انحراف استاندارد | آماره | سطح معناداری |
| بیان ژن GFRα1 | کنترل | ۰/۹۶ | ۰/۰۵ | ۲۱۸/۹۰ | *۰/۰۰۱ |
| | سالم + تمرین هوازی یک | ۲/۹۳ | ۰/۰۷ | | |
| | سالم + تمرین هوازی دو | ۲/۹۶ | ۰/۱۶ | | |

| | | |
|---|---|---|
| آسیب نخاعی | ۰/۶۷ | ۲/۳۰ |
| آسیب نخاعی + تمرین هوازی یک | ۲/۳۰ | ۰/۱۳ |
| آسیب نخاعی + تمرین هوازی دو | ۲/۱۴ | ۰/۱۵ |

* سطح معنا داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.




**شکل ۳.** تغییرات بیان ژن GFRα1 پس آزمون بین گروه ها

*اختلاف بین گروه کنترل با گروه سالم+تمرین هوازی یک

**اختلاف بین گروه کنترل با گروه سالم+تمرین هوازی دو

***اختلاف بین گروه کنترل با گروه آسیب نخاعی

**** اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با نوع دو

y اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با آسیب نخاعی+تمرین هوازی نوع دو

b اختلاف بین گروه تمرین هوازی نوع یک با آسیب نخاعی+تمرین هوازی نوع یک

## بحث

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر دو نوع برنامه تمرینی بر بیان ژن GDNF و بیان ژن GFRα1 در مدل آسیب نخاعی بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ژن GDNF در گروه‌های سالم و آسیب نخاعی که تمرین هوازی نوع اول و دوم را انجام داده بودند نسبت به گروه کنترل و گروه آسیب نخاعی بطرز معناداری افزایش یافته است. با این حال در تمرین هوازی اول و دوم اختلاف معنادار نبود. بنابراین؛ تمرین هوازی صرف نظر دستکاری متغیرهای تمرینی سبب بیان ژن در گروه‌های سالم و آسیب نخاعی شد. این یافته همسو با مطالعات گذشته انجام شده بوده است که بر روی رت‌های پارکینسونی (۱۹) و همچنین مبتلا به ام اس (۲۰) انجام شده است. مکانیسم این افزایش بیان را می‌توان بر اساس فعالیت مسیر سیگنالینگ GDNF دانست که منجر به افزایش نسخه برداری از ژن هایی می‌شود که در فرایند ترمیم یا بازتولید یا جایگزینی بافت‌های از دست رفته یا آسیب دیده عصبی از طریق نوسازی طبیعی آکسون نورون‌های عصبی نقش دارند.

همچنین یافته دیگر این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ژن گیرنده GFRα1 در گروه‌های رت‌های سالم که تمرین هوازی نوع اول و دوم را انجام داده اند، بطرز معناداری نسبت به گروه کنترل و گروه آسیب نخاعی افزایش یافته است. این در حالی بود که بیان ژن گیرنده GFRα1 در گروه‌های آسیب

نخاعی+تمرین هوازی نوع اول و دوم نسبت به گروه کنترل و گروه آسیب نخاعی افزایش معنادار داشت. از این رو؛ تمرین هوازی نقش مثبت روی بیان ژن گیرنده GFRα1 دارد، اما تغییرات بین گروهی معنادار نبود و اثرات تمرینی برابری داشت. اثرات پایین دست سیگنال دهی GDNF از طریق بیان خود لیگاند و همچنین توسط تعاملات GDNF با اهداف آن تنظیم می‌شود. گیرنده اصلی اش GFRα1 است که به شکل محلول و همچنین به شکل نامحلول وجود دارد. در نتیجه، فعال شدن GFRα1 متصل به شکل نامحلولش باعث ایجاد سیگنال در سلول می‌شود، در حالی که GFRα1 محلولی در فضای خارج سلولی ممکن است بر روی سلول‌های مجاور اثر بگذارد و همان طور که در بخش قبل بیان گردید نتیجه این تعاملات بین لیگانده و گیرنده فعالسازی مسیرهای پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) و فعالیت Akt است که القا می‌کند، این گیرنده‌ها واسطه فرآیندهای سلولی مختلف هستند و اثرات متمایز بر انعطاف پذیری ساختاری در جمعیت‌های مختلف سلولی دارند (ماهئو و همکاران، ۲۰۱۵). در این میان نقش فعالیت ورزشی می‌تواند، بالقوه مسئول تعدیل گیرنده‌های GDNF مانند GFRα1 باشد که نقش مهمی‌در فعالیت فیزیولوژیکی ایفا می‌کند. در واقع رهایش GDNF به واسطه فعالیت ورزشی، آثارش را طریق گیرنده اش GFRα1 می‌گذارد که در رشد دندریتی اثر دارد (۲۱). با توجه به یافته‌های بدست آمده، تا کنون مطالعه ای بررسی اثرات تمرین هوازی بر روی بیان ژن گیرنده GFRα1 نپرداخته است و مطالعات بیشتر برای شناخت مکانیزم تمرین بر گیرنده نیاز است. بنابراین به دلیل محدودیت مطالعات درباره گیرنده GFRα1 نیاز است که مطالعات بیشتری مسیر سیگنالینگ GDNF/ GFRα1 را مورد بررسی قرار دهد تا اثرات محافظتی آن بر سیستم عصبی آشکار گردد. 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 برنامه‌ریزی شده، ساختاریافته و تکراری طراحی‌شده موجب تشکیل شبکه‌های نخاعی و ماهیچه‌های اسکلتی می‌شود که اثرات مفید قابل‌توجهی بر مجموعه‌ای از سیستم‌های عملکردی دارد (۲۲). ورزش به سرعت و به‌طور برجسته بر جوانه‌زدن دندریتیک، اتصالات سیناپسی، تولید و تنظیم انتقال دهنده‌های عصبی، و هموستاز یونی تأثیر می‌گذارد، طبق مطالعات اخیر، افزایش نوروتروفین‌ها ناشی از ورزش به‌عنوان سنگ بنای پیونددهنده بسیاری از این اثرات به‌هم مرتبط است (۲۳). ورزش تردمیل به‌طور گسترده‌ای یک راهبرد مؤثر برای بازیابی عملکرد حرکتی پس از آسیب نخاعی در نظر گرفته می‌شود. با این‌حال، شدت تمرینی خاص که ریکاوری را بهینه می‌کند و مبنای مکانیکی زیربنایی این ریکاوری 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 سنجشRNAهای غیرکننده وmiRNAهای مسیر PI3K/AKT نیز می‌تواند در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.از جمله نقاط قوت این مطالعه ارزیابی مدل آسیب نخاعی براساس تست عملکرد حرکتی در کنار بررسی بیان ژن نوروتروفین ۴ بود. از آن‌جایی که، پروتکل‌های اصلی درمانی امروزه به‌سمت پروتکل‌های ترکیبی است، استفاده هم‌زمان پروتکل‌های ورزشی همراه با پروتکل‌های دارویی و همچنین پروتکل‌های تحریکی همچون استفاده از تحریک الکتریکی عملکردی می‌تواند ارزیابی‌ها را تکمیل کرده و راهکارهای مناسب‌تری را برای درمان آسیب نخاعی پیش روی محققین قرار دهد. همچنین، ارزیابی سایر مدل‌های نخاعی و بررسی سایر فاکتورهای مرتبط نیز می‌تواند به این مهم کمک نماید. انجام این تحقیق همراه با مشکلات زیادی از جمله تلف شدن 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.

بیشـترین تلفـات مربـوط بـه گـروه‌های ضایعه نخاعی به‌خصـوص در دو هفتـه اول بعـد از عمـــل جراحی بود که علت آن زخم شدن و خوردن پنجه‌های پا بر اثـر بی‌حسـی و در نتیجـه عفونـت شـدید یـا پـاره‌شـدن مثانـــه به‌طـور خود به خود بر اثر احتباس ادراری و یا پاره‌شدن آن در حین تخلیـه بر اثر فشار بوده اســت.

## نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان میدهد که بیان ژن GDNF و بیان ژن GFRα1 در مدل آسیب نخاعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، همچنین، GDNF در گروه آسیب نخاعی + تمرین 1 و در گروه آسیب نخاعی + تمرین 2 نسبت به گروه آسیب نخاعی افزایش داشت؛ اما این افزایش بیان بین دو گروه آسیب نخاعی + تمرین، تفاوت معناداری نداشت؛ بنابراین ،پروتکل های تمرینی در این مطالعه، بر بیان GDNF و بیان ژن GFRα1 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.

## مشارکت نویسندگان

مفهوم پردازی وطراحی مطالعه، یاجمع آوری داده ها، یا تجزیه وتحلیل وتفسیرداده ها: همه نویسندگان

تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه:همه نویسندگان

تایید نهایی دستنوشته پیش ازارسال به مجله: همه نویسندگان

## References

1. Maier IC, Schwab ME. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006;361(1473):1611-34.

2. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. Annals-Academy of Medicine Singapore. 2007;36(1):49.

3. SCHIRÒ, Giuseppe, et al. A brief overview on BDNF-Trk pathway in the nervous system: a potential biomarker or possible target in treatment of multiple sclerosis?. Frontiers in Neurology, 2022, 13: 917527.

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):845-58.

5. Harada, C., Harada, T., Quah, H. M. A., Namekata, K., Yoshida, K., Ohno, S. Role of neurotrophin-4/5 in neural cell death during retinal development and ischemic retinal injury in vivo. Investigative ophthalmology & visual science, 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):1070-8.

7. Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM. GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. Muscle Nerve. 2002 Aug;26(2):206-11. doi: 10.1002/mus.10179. PMID: 12210384.

8. Duarte Azevedo M, Sander S, Tenenbaum L. GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease. J Clin Med. 2020 Feb 7;9(2):456. doi: 10.3390/jcm9020456. PMID: 32046031; PMCID: PMC7073520.

9. Saarma M, Sariola H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Microsc Res Tech. 1999 May 15-Jun 1;45(4-5):292-302. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<292::AID-JEMT13>3.0.CO;2-8. PMID: 10383122.

10. Grondin R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. J Neurol. 1998 Nov;245(11 Suppl 3):P35-42. doi: 10.1007/pl00007744. PMID: 9808338

11. Bonafina A, Trinchero MF, Ríos AS, Bekinschtein P, Schinder AF, Paratcha G, Ledda F. GDNF and GFRα1 Are Required for Proper Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons. Cell Rep. 2019 Dec 24;29(13):4308-4319.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.100. PMID: 31875542

12. Irala D, Bonafina A, Fontanet PA, Alsina FC, Paratcha G, Ledda F. The GDNF-GFRα1 complex promotes the development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. Development. 2016 Nov 15;143(22):4224-4235. doi: 10.1242/dev.140350. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27707798

13. Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. Trends Cogn Sci. 2013 Oct;17(10):525-44. doi: 10.1016/j.tics.2013.08.001. Epub 2013 Sep 9. PMID: 24029446; PMCID: PMC4565723.

14. Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. Prog Neurobiol. 2014 Mar;114:25-57. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20. 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 May;51(3):254-257. doi: 10.1016/j.aott.2017.02.009. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28462801; PMCID: PMC6197298.

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. 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/s18075932200800010018 PMID: 18305873

18. 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

19. Mohamadi R, Falah Z, Aghajani KH, Taghavi A. The pre-treatment effect of voluntary exercise by BDNFon lesion injected by 6 hydroxydopamine in brain stem of male rat. Journal of Sport and Exercise Physiology 2014; 6(1):1029-1035.

20.Jafari, M., Askari, R., Kakhk, A. H., & Etemadifar, M. Effect of 8 weeks aquatic exercise with two different intensities on serum levels of GDNF and NGF in women with multiple sclerosis. Razi Journal of Medical Sciences, 2020; 27(2), 80-90.

21. Bonafina, A., Trinchero, M. F., Ríos, A. S., Bekinschtein, P., Schinder, A. F., Paratcha, G., & Ledda, F. GDNF and GFRα1 are required for proper integration of adult-born hippocampal neurons. Cell *Reports*, 2019; *29*(13), 4308-4319.

22. Legg Ditterline BE, Aslan SC, Randall DC, Harkema SJ, Castillo C, Ovechkin AV. Effects of Respiratory respiratory Training training on Heart heart Rate rate Variability variability and Baroreflex baroreflex Sensitivity sensitivity in Individuals individuals With with Chronic chronic Spinal spinal Cord cord Injuryinjury. Arch Phys Med Rehabil. 2018; 99(3): 423-432.

23. Bilchak JN, Caron G, Côté MP. Exercise-Induced induced Plasticity plasticity in Signaling signaling Pathways pathways Involved involved in Motor motor Recovery recovery after Spinal spinal Cord cord Injuryinjury. Int J Mol Sci. 2021; 22(9).

*Original Article*

# Comparison of the effect of two types of aerobic exercise on the expression of GDNF gene and its receptor GFRα1 in Spinally Injured Rats

Received: 24/02/2024 - Accepted: 16/06/2024

Sina Jalili Rasti[1]
Sadegh Cheragh-Birjandi[2*]
Mohamad Amin Younesi Heravi[3]
Ali Yaghoubi[4]

*[1] Ph.D Candidate, Department of Physical Education and Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.*
*[2] Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran*
*[3] Assistant Professor, Department of medical physics and radiology, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.*
*[4] Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.*

Email:
s_birjandi2001@yahoo.com

**Abstract**

**Introduction:** This study aimed to investigate 4-weeks of selected aerobic training on the expression of GDNF gene and its receptor GFRα1 in hippocampal rats with spinal cord injury (SCI).

**Methods:** In this experimental study, rats were randomly divided into 6 groups. Animals were subjected to spinal cord injury under general anesthesia and T11-T9 spine surgery, and after 2 weeks of recovery, aerobic exercises were performed on them. After training, hippocampal tissue was removed to examine the gene expression.

**Results:** The expression of GDNF in the SCI model was significantly decreased compared to the control group, and the expression of this gene was increased in the SCI group of the first exercise and in the SCI group of the second exercise compared to the SCI group; However, this increase did not show a significant difference between the two SCI groups. The expression of the GFRα1 receptor in the SCI model had a significant decrease compared to the control group. This expression was increased in the SCI group of the first exercise and in the SCI group of the second exercise compared to the SCI group; However, this increase did not show a significant difference between the two SCI groups.

**Conclusion:** The training protocols of this study increased the expression of the GDNF gene and its receptor GFRα1 in SCI rats, and it can be considered as a contributing factor to neural growth and neuronal survival in SCI models.

**Keywords:** Aerobic Exercise, Spinal Cord Injury, GDNF, GFRα1