

مقاله پژوهشی

اثر دو هفته تمرین شنا بر درد نوروپاتی القا شده به روش آسیب مزمن ناشی از فشردگی عصب و بیان GAD65 در موش های صحرایی نر بالغ

بابک فرزاد^۱، حمید رجبی^{۲*}، سید بهنام الدین جامعی^۳، رضا قراخانلو^۴، پریسا حیات^۵، فریناز نصیری نژاد^۶، سیما دامنی^۶

- ۱- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۲- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ۳- گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۴- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۶- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: مکانیسم های نامشخصی در درد نوروپاتی درگیر می باشند. به نظر می رسد از بین روش های غیردارویی، فعالیت بدنی موجب بهبود درد نوروپاتی گردد، ولی دلایل احتمالی اثر فعالیت ورزشی منظم بر درد نوروپاتی مشخص نیست؛ بنابراین در پژوهش حاضر اثر ۲ هفته تمرین شنا بر بیان آنزیم GAD65 و گیرنده P2X₃ در مدل آسیب مزمن ناشی از فشردگی عصب (CCI) عصب سیاتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: چهل سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار به ۵ گروه تقسیم شدند: (۱) گروه القای نوروپاتی با مدل CCI و تمرین شنا (CCI+T2)؛ (۲) گروه القای نوروپاتی با مدل CCI بدون تمرین شنا (CCI)؛ (۳) گروه سالم با تمرین شنا (ST2)؛ (۴) گروه کنترل سالم بدون تمرین شنا (Control) و (۵) گروه شم جراحی CCI ShamCCI. گروه های CCI و CCI+T2 متحمل آسیب عصبی محیطی شدند. پروتکل تمرینی شنا شامل ۲ هفته (۵ روز در هفته به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه) بود. بیان GAD65 و P2X₃ به وسیله تکنیک وسترن بلاتینگ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: جراحی CCI موجب کاهش معنادار آنزیم GAD65 گردید که ۲ هفته تمرین شنا موجب افزایش معنادار آن به نسبت گروه CCI و Sham CCI شد ($P \leq 0.001$)، ولی میزان بیان گیرنده P2X₃ در نخاع ناحیه کمری موش های صحرایی در گروه های پژوهش تفاوت معناداری باهم نداشتند ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: مجموع یافته های پژوهش حاضر نشان داد انجام تمرینات شنا احتمالاً به واسطه ی حفظ نورون های مهاری و به دنبال آن آنزیم GAD65 که موجب تبدیل میانجی عصبی تحریکی گلوتامات به میانجی عصبی مهاری گابا می گردد موجب بهبود درد نوروپاتی می شود.

کلمات کلیدی: درد نوروپاتی، تمرین شنا، GAD65، گیرنده P2X₃

مقدمه

ایجاد استرس اکسیداتیو اشاره نمود (۲، ۳). انتقال درد توسط نورون های گانگلیون ریشه خلفی و نخاع انجام می گیرد و چندین گیرنده ی پورینرژیک (گیرنده های P2X₁₋₇) در این نواحی بیان می شوند (۴). کاربرد الیگونوکلوئوتیدهای ضد گیرنده های P2X₃، تداخل RNA، تکنولوژی حذف ژن یا آنتاگونیست های انتخابی نشان داده اند که ATP و گیرنده های P2X₃ نقش مهمی در توسعه و حفظ درد نوروپاتی بازی می کنند (۵). ATP رها شده از بافت آسیب دیده به واسطه ی فعال سازی گیرنده های P2X به ویژه گیرنده P2X₃ می تواند انتقال درد را در بیماری های با درد نوروپاتی تنظیم کند (۶). در حقیقت ATP می تواند بر غشای

بیشتر بیماران مبتلا به درد نوروپاتی به دلیل پیچیدگی و مکانیسم های نامشخص درگیر در درد نوروپاتی و همچنین محدودیت داروهای تجویزی به دلیل اثرات مضر و ناخواسته ی آنها، ناراضی بوده و خیلی از آنها نسبت به داروهای موجود فعلی مقاوم می باشند (۱). مکانیسم های متعددی برای ایجاد درد نوروپاتیک مطرح شده است که از بین آنها می توان به فعال شدن گیرنده های NMDA، افزایش سطح گلوتامات، نیتریک اکساید و افزایش بیش از حد گونه های واکنش دهنده ی اکسیژن (ROS) و

* نویسنده مسئول: حمید رجبی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
Email: hrajabi@hotmail.com

از بین رفتن اثر مهاري آنها شده و درنتيجه منجر به هايپرالجيذا و آلودينيا مي‌شود (۱۶). Lorenzo و همكاران (۲۰۱۴) واكنش ايمنى GAD65 را در شاخ خلفي سطحي نخاع در مدل آسيب مزمن ناشي از فشردگي عصب (CCI) سياتيك در موش‌هاي صحرابي بررسي كردند. چگالي پايانه‌هاي مهاري GAD65 در لاميناى ۱ و لاميناى ۲ نخاع در پس از CCI عصب سياتيك كاهش يافت. بيشترين كاهش پايانه‌هاي GAD65 در لاميناى ۲ و در حدود ۳ تا ۴ هفته پس از آسيب رخ داد و مقدار جزئي ريكاوري تا روز ۵۶ پس از آسيب وجود داشت. تغييرات زماني تعداد پايانه‌هاي GAD65 با تغيير آستانه-ي درد به محرک‌هاي مكانيكي و حرارتي همبستگي داشت (۱۷). از طرف ديگر اثرات مفيد فعاليت ورزشي حاكي از تغيير احساس درد است (۱۸) و نشان داده شده كه علائم درد حاد را در انسان‌ها (۱۹) و درد نوروپاتي را در جوندگان كاهش مي‌دهد (۲۰، ۲۱). هرچند كه كاهش احساس درد بيشتر به پاسخ حاد فعاليت ورزشي نسبت داده مي‌شود و معمولاً در کمتر از ۱ ساعت از بين مي‌رود (۱۸، ۲۲)، ولي اثرات ماندگار ناشي از تمرينات ورزشي کمتر مشخص است. مشاهده شده است كه دو هفته تمرين شنا موجب كاهش هايپرالجيذاي مكانيكي و حرارتي در موش‌هاي صحرابي CCI شده مي‌گردد (۲۳). مطالعه‌ي ديگري نشان مي‌دهد كه تمرين مزمن دويدن مي‌تواند موجب ناراحتي و كاهش آستانه‌ي درد گردد. Cobianchi و همكاران (۲۰۱۰) افزايش آلودينيا را با تمرينات مزمن دويدن (۵۳ روز) مشاهده كردند (۲۴). بنابراين براي بررسي دلايل احتمالي بهبود هايپرالجيذاي مكانيكي و حرارتي ناشي از تمرينات ورزشي، آنزيم سنتز كننده گابا (GAD65) و گيرنده‌ي $P2X_3$ در اين پژوهش مورد مطالعه قرار مي‌گيرند.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربى-مداخله‌اي است كه نمونه‌هاي پژوهش را ۴۰ سر موش صحرابي نر بالغ نژاد ويستار ۸ هفته‌اي با متوسط وزن 20 ± 20 گرم تشكيل مي‌دادند. موش‌ها در قفس‌هاي استاندارد تحت شرايط كنترل‌شده‌ي تاريخي و روشنابي (۱۲ ساعت تاريخي و ۱۲ ساعت روشنابي)، دما (22 ± 3 سانتي‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) با دسترسي آزاد به آب و غذا نگهداري مي‌شدند. كلييه مراحل مطالعه با مجوز كميته اخلاق معاونت پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي ايران و بر اساس

پيش‌سيناپسي به‌واسطه‌ي گيرنده‌هاي $P2X_3$ يا به‌واسطه‌ي گيرنده‌هاي $P2Y$ ، آزادسازي ميانجي تحريكي گلوتمات را رها كند. گلوتمات در غشاي پس‌سيناپسي بر روي گيرنده‌هاي AMPA و NMDA اثر مي‌كند كه ميانجي عصبي تحريكي در مسيرهاي درد مي‌باشند (۷). حذف ژنتيكي گيرنده‌هاي $P2X_3$ دريافت درد را در پاسخ به ATP به گونه‌ي معناداري كاهش مي‌دهد كه اشاره به اين موضوع دارد كه گيرنده‌هاي $P2X_3$ مي‌توانند به‌عنوان هدف‌هاي جذاب پژوهشي در درد نوروپاتي موردتوجه قرار گيرند (۸). به همين دليل مهار گيرنده‌هاي $P2X_3$ در تسكين درد نوروپاتي به‌عنوان يك روش مفيد موردتوجه است (۹).

برخي از انواع نوروپاتي با اختلال در عملکرد ميتوكوندري همراه مي‌باشند كه مشخص شده در مرگ برنامه‌ريزي شده‌ي سلولي نقش دارند (۱۰). مرگ برنامه‌ريزي شده‌ي سلولي وابسته به ميتوكوندري به‌وسيله‌ي شماري از فاكورها مانند ROS، سراميد و نيترىك اكسايد فعال مي‌شود (۱۱) و مشخص شده كه اين فاكورها در پاتوفيزيولوژي درد نوروپاتي نقش دارند. اين عوامل موجب رهايي سيتوكروم C از ميتوكوندري و به دنبال آن تشكيل مجموعه‌اي از سيتوكروم C، فاكور فعاليت پروتئاز آپاپتوزي-۱ و كاسپاز-۹ مي‌گردد كه فعال‌سازي كاسپازهاي پايين‌دست را آغاز مي‌كند (۱۲). نشان داده شده كه آسيب عصب محيطي موجب ايجاد مرگ برنامه‌ريزي شده‌ي سلولي در شاخ خلفي نخاع (لاميناى I-III) مي‌شود (۱۳). درواقع يكي از مكانيسم‌هاي مهم ايجاد درد نوروپاتي پس از آسيب عصبي، كاهش ميانجي‌هاي عصبي مهاري ناشي از مرگ برنامه‌ريزي شده‌ي سلولي در سيستم عصبي است. گابا (GABA) يكي از مهم‌ترين اين ميانجي‌هاي عصبي است كه نقش مهمي در تنظيم درد در شاخ خلفي نخاع دارد (۱۴). مطالعات انجام شده در رابطه با درد نوروپاتي نشان مي‌دهد كه پديده مرگ برنامه‌ريزي شده‌ي سلولي نقش مهمي در از بين رفتن نورون‌هاي گاباژريك پس از آسيب عصبي دارد (۱۳). مشاهده شده است كه به دنبال ايجاد آسيب عصبي، غلظت اين ميانجي عصبي در نخاع به شدت كاهش يافته و همين امر موجب ارسال پيام‌هاي تشديد شده‌اي از درد به نواحي بالاتر مي‌گردد (۱۵). همچنين ساير مطالعات انجام شده نشان مي‌دهد كه همراه با كاهش سطح گابا به دنبال آسيب عصب محيطي يا طناب نخاعي، سطح آنزيم GAD (گلوتمات دكربوكسيلاز كه آنزيم سنتز كننده گابا است) نيز تغيير مي‌كند. كاهش گابا و آنزيم سنتز كننده آن نيز موجب

پروتکل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. در پژوهش حاضر نمونه‌ها به روش تصادفی به ۵ گروه شامل گروه درمجموع ۴ آزمون رفتاری برای هر حیوان صورت گرفته است. از آزمون استون برای آلودینایی سرمایی، از فیلامنت‌های فون-

جدول ۱- برنامه تمرینات شنا

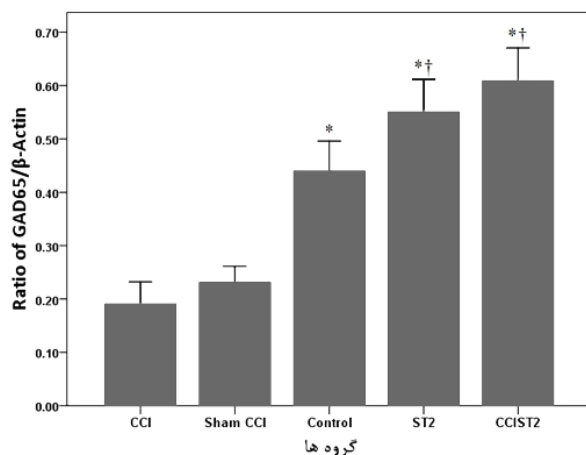
هفته‌ها	تعداد وهله‌ی شنا	زمان هر وهله (دقیقه)	زمان استراحت	کل زمان تمرین
هفته اول روز اول	۳	۱۰	۵	۳۰
هفته اول روز دوم	۲	۱۵	۵	۳۰
هفته اول روز سوم	۳	۱۵	۵	۴۵
هفته اول روز چهارم	۳	۱۵	۵	۴۵
هفته اول روز پنجم	۴	۱۵	۵	۶۰
هفته دوم روز اول	۴	۱۵	۵	۶۰
هفته دوم روز دوم	۳	۲۰	۵	۶۰
هفته دوم روز سوم	۳	۲۰	۵	۶۰
هفته دوم روز چهارم	۲	۳۰	۵	۶۰
هفته دوم روز پنجم	۲	۳۰	۵	۶۰

فری جهت سنجش آلودینای مکانیکی، از آزمون پلاتار برای هایپرآلجیای حرارتی و از آزمون رندال- سلیتو برای هایپرآلجیای مکانیکی استفاده گردید.

برای انجام جراحی CCI حیوانات با تزریق کتامین و زایلازین به نسبت ۸ به ۱ به صورت تزریق داخل صفاقی بی‌هوش شده و پس از تراشیدن موهای محل جراحی یک برش ۲ سانتی‌متری در پوست ناحیه‌ی بالای ران پای چپ ایجاد شده و عضلات این ناحیه کنار زده شد تا عصب سیاتیک پیش از محل سه‌شاخه شدن نمایان و از بافت‌های اطراف آن جدا شود. سپس بر اساس مدل ارائه‌شده توسط بنت و زای با استفاده از نخ بخیه کرومیک گات، چهار گره شل به فاصله‌ی یک میلی‌متر از یکدیگر پیش از محل سه‌شاخه شدن بر روی عصب زده شد به گونه‌ای که جریان خون رسانی به نواحی دیستال عصب مختل نگردد. پس از اتمام،

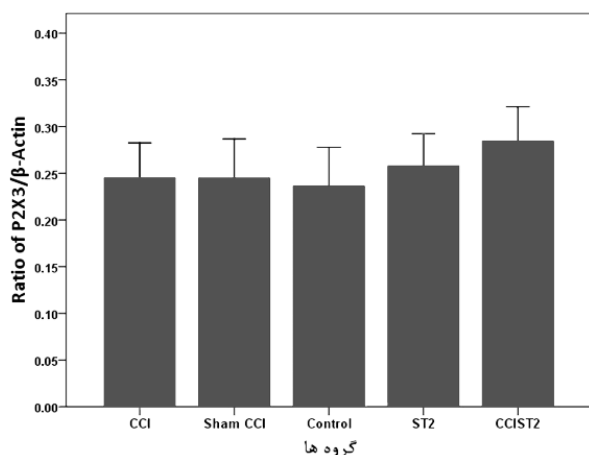
الفای نورروپاتی با مدل CCI و تمرین شنا (CCI+ST2)؛ گروه نورروپاتی با مدل CCI بدون تمرین شنا (CCI)؛ گروه سالم با تمرین شنا (ST2)؛ گروه کنترل سالم بدون تمرین شنا (Control) و گروه شش جراحی CCI (ShamCCI) تقسیم گردیدند.

پس از سه روز تطبیق با شرایط محیطی از کلیه نمونه‌ها آزمون‌های رفتاری اولیه گرفته شد و به منظور یادگیری و آشنایی با تمرین شنا به مدت ۳ روز در یک هفته همه‌ی گروه‌ها تمرین شنا را انجام دادند و پس از آن یک روز استراحت کردند تا جراحی به روش CCI برای القای درد صورت گیرد. پس از جراحی موش - ها به مدت ۳ روز استراحت کردند. سپس آزمون‌های رفتاری پس از جراحی انجام گرفت و پس از آن به مدت ۲ هفته تمرینات اصلی شنا انجام شد و هر هفته آزمون‌های رفتاری تکرار گردید که



نمودار ۱- نسبت بیان GAD65 به بتا اکتین در گروه های مختلف. * اختلاف معنادار نسبت به گروه CCI; † اختلاف معنادار با گروه Sham CCI.

همان گونه که در نمودار ۲ مشاهده می شود بیان گیرنده ی $P2X_3$ در نخاع ناحیه کمری موش های صحرایی در گروه های پژوهش تفاوت معناداری باهم ندارند ($P>0.05$).



نمودار ۲- نسبت بیان گیرنده $P2X_3$ به بتا اکتین در گروه های مختلف. * اختلاف معنادار نسبت به گروه CCI; † اختلاف معنادار با گروه Sham CCI.

بحث و نتیجه گیری

مطالعه ای نشان داده است که دو هفته تمرین شنا می تواند تا حدودی هاپیرآلجیزیای مکانیکی و حرارتی ناشی شده از CCI عصب سیاتیک را به گونه ی معناداری بهبود بخشد (۲۳). هر چند در مورد اثر تمرینات ورزشی بر درد نورپاتی همه مطالعات همراستا نمی باشند. مطالعات متناقضی نیز در این ارتباط وجود دارد که نشان می دهد تمرینات مزمن دودیدن درد نورپاتی را افزایش می دهد (۲۴). Cobianchi و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که ۲۴ روز پس از CCI، تحمل نامتعادل وزن بدن در بین دو پا و پارامترهای رد پای ناهنجار به گونه ی فزاینده ای به مقادیر

عضلات و پوست محل جراحی به تفکیک بخیه زده شد (۲۵). موش های گروه های CCIST2 و ST2 به مدت ۲ هفته، ۵ روز در هفته در ساعات مشابهی از روز تمرین شنا می کردند (جدول ۱). پروتکل تمرینی بر مبنای مطالعه ی مقدماتی محققین پژوهش حاضر و بر اساس مطالعات پیشین تهیه و انجام گردید، به طوری که مدت زمان شنا به گونه تدریجی در طول دو هفته افزایش یافت. تمرینات با زمان های تناوبی کوتاه شروع شد و به گونه تدریجی افزایش پیدا کرد تا حیوان با محرک تمرینی جدید سازگار گردد و استرس ناشی از تمرینات به گونه تدریجی افزایش یابد (۲۰، ۲۶). پروتکل تمرینی از نوع هوازی و با شدت متوسط بود زیرا که مطالعات پیشین، تمرین به مدت ۹۰ دقیقه شنا کردن پیوسته و یا تناوبی بدون اعمال وزنه بر روی حیوان (۲۷) و تا ۶ درصد وزن بدن اعمال وزنه (۲۸) را متوسط و هوازی گزارش کرده اند. همچنین به منظور مطالعه تغییرات میزان بیان پروتئین GAD65 و $P2X_3$ ، نمونه های سگمنت نخاعی L4 تا L6 از همه ی گروه ها توسط تکنیک وسترن بلاتینگ مورد آزمایش قرار گرفت. ایمونوبلاتینگ یا وسترن بلاتینگ روشی دومرحله ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جدا شده به وسیله ی الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالباً از جنس نیتروسولوز است انتقال می یابند و در مرحله دوم توسط آنتی بادی اختصاصی، پروتئین مورد نظر شناسایی می شود.

تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. تمام یافته ها با میانگین $\pm$ انحراف استاندارد گزارش شده است. آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده استفاده گردید که در صورت طبیعی بودن از آزمون های پارامتریک استفاده شد. تفاوت بین گروه ها با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه بررسی شدند و از آزمون تعقیبی شفه و بنفرونی برای مقایسه ی گروه ها استفاده گردید. سطح آلفا برای معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می شود بیان GAD65 در موش های گروه CCIST2 ($P<0.001$)، ST2 ($P=0.002$) و موش های گروه کنترل ($P=0.028$) به نسبت موش های CCI بیشتر بود. همچنین میزان بیان GAD65 در موش های گروه CCIST2 ($P=0.001$) و ST2 ($P=0.004$) به نسبت گروه ShamCCI بیشتر بود.

پژوهش حاضر بیان پروتئین GAD65 در هر دو گروه CCI و ShamCCI کاهش یافت و ۲ هفته تمرین شنا به گونه معناداری بیان GAD65 را به نسبت گروه CCI و ShamCCI افزایش داد. در مطالعه‌ای در مدل درد نوروپاتی القا شده با لیگاتوربندی اعصاب L5 و L6 نخاعی، کاهش بیان GAD65 و غلظت گابا در نخاع موش‌های صحرایی نیز گزارش شده است (۳۴). همچنین کاهش GAD65 در نخاع موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتی با مدل SNI نشان داده شده است (۳۵). نورون‌های واسطه‌های یک جز مهم مدار شاخ خلفی هستند. جایی که این نورون‌ها گیرنده‌های درد نخاعی را تنظیم می‌کنند. در حال حاضر شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهند کاهش مهار در شاخ خلفی نخاع در درد نوروپاتی نقش دارد. کاهش این نورون‌های مهار پس از آسیب عصبی یکی از سازوکارهایی است که برای توجیح کاهش مهار پیشنهاد می‌شود. نشان داده شده است که تنها ۳ روز پس از CCI عصب سیاتیک تعداد سلول‌های دارای واکنش ایمنی گابا و گلوتامات دکربوکسیلاز در هر دو سمت کاهش می‌یابد. یک هفته پس از CCI تعداد سلول‌های دارای واکنش ایمنی گابا در هر دو سمت به کاهش خود ادامه می‌دهند. سپس تعداد سلول‌های دارای واکنش ایمنی گلوتامات دکربوکسیلاز در هر دو سمت آسیب افزایش می‌یابد و تا هفته هشتم این افزایش ادامه دارد (۳۶). همچنین Lorenzo و همکاران (۲۰۱۴) واکنش ایمنی GAD65 را در شاخ خلفی سطحی نخاع در مدل CCI عصب سیاتیک را در موش‌های صحرایی بررسی کردند. چگالی پایانه‌های مهار GAD65 در لامینای ۱ و لامینای ۲ نخاع پس از CCI عصب سیاتیک کاهش یافت. بیشترین کاهش پایانه‌های GAD65 در لامینای ۲ و در حدود ۳ تا ۴ هفته پس از آسیب رخ داد و مقدار جزئی ریکاوری تا روز ۵۶ پس از آسیب وجود داشت. تغییرات زمانی تعداد پایانه‌های GAD65 با تغییر آستانه‌ی درد به محرک‌های مکانیکی و حرارتی همبستگی داشت. بنابراین آسیب عصبی احتمالاً موجب کاهش موقتی پایانه‌هایی می‌شود که دارای واکنش ایمنی GAD65 می‌باشند (۱۷). هرچند یک آنالیز کمی استرنولوژیک از نسبت نورون‌ها در لامینا ۱، ۲ و ۳ شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرایی نشان داد که واکنش ایمنی گابا و یا گلیاسین دو هفته پس از CCI هیچ‌گونه کاهش نورون‌های واسطه‌های مهار را نشان نمی‌دهد که پیشنهاد می‌کند سنتر گابا تحت این شرایط تنظیم کاهشی شده است و این که کاهش نورون‌های گاباژیک مسئول

طبیعی نزدیک شد. در موش‌های خانگی با ۴ روز تمرین بر روی نوارگردان افزایش بیان ویژگی‌های بازسازی عصب مشاهده شد. درحالی که تمرینات طولانی مدت (۵۳ روز) آلودینیا، تحمل وزن و پارامترهای ردپا را بدتر کرد (۲۴). همچنین گزارش شده است که تمرین ورزشی موجب بهبود آلودینیای ناشی از آسیب نخاعی و به حالت برگرداندن حس طبیعی پس از له‌شدگی نخاعی در هفته‌ی هفتم تمرینات در موش‌های صحرایی می‌شود (۲۹). در پژوهش حاضر از تمرینات شنای هوازی استفاده گردید که شدت آن در حد متوسط بود و مدت شنا به گونه‌ی تدریجی در طول ۲ هفته افزایش یافت (۳۰ تا ۶۰ دقیقه در هر جلسه) و همچنین با تناوب‌های استراحت (۵ دقیقه بین و هله‌ها) همراه بود که مشاهدات عینی از خو گرفتن حیوان‌ها به مدت تمرین را نشان دادند.

جراحی CCI موجب کاهش معنادار آنزیم GAD65 گردید در صورتی که ۲ هفته تمرین شنا موجب افزایش معنادار آن شد. در مدل CCI عصب سیاتیک در موش صحرایی، مقادیر گلوتامات و آسپاراتات در طرف موافق آسیب عصب در شاخ خلفی نخاع در روز ۴، ۷ و ۱۴ پس از آسیب عصبی افزایش می‌یابد (۳۰). به‌علاوه در شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرایی دارای هایپرآلجییا (با لیگاتوربندی عصب سیاتیک)، سطوح خارج سلولی گلوتامات و آسپاراتات بیشتر از دو برابر بود که به‌وسیله‌ی میکرودیالیز اندازه‌گیری شد (۳۱). آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) در پایانه‌های عصبی قرار دارد و گابا (میانجی عصبی مهار) را برای انتقال عصبی از گلوتامات (میانجی عصبی تحریکی) سنتز می‌کند و بنابراین تنها در پایانه‌های عصبی و سیناپس‌ها ضروری است. GAD65 هنگامی نیاز می‌باشد که مهار سیناپسی بیشتر است (۳۲). گابا انتقال پیام‌های درد را از فیبرهای آوران اولیه به سیستم عصبی مرکزی مهار می‌کند. در مطالعه‌ای بر روی مدل‌های ناک داون GAD65، کاهش معناداری در تأخیر در برداشتن پا در تست صفحه‌ی داغ مشاهده شد. تزریق درون صفاقی مهارکننده انتقال‌دهنده-۱ گابا (این آنزیم گابا را از شکاف سیناپسی حذف می‌کند) به شیوه‌ی وابسته به دوز تأخیر در تست صفحه داغ را افزایش می‌دهد که نشان می‌دهد گابا در درد حرارتی حاد نقش دارد (۳۳). آسیب عصب سیاتیک موجب کاهش زودگذر واکنش ایمنی GAD65 در پایانه‌ها در شاخ خلفی نخاع می‌شود و این کاهش GAD65 گسترش و بدتر شدن رفتارهای درد را به همراه دارد (۱۷). در

(Celecoxib) به گونه‌ای معناداری مهار می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تنظیم افزایشی COX/PGE2 پس از آسیب عصبی نقش مهمی در درد نوروپاتی دارد و در بیان گیرنده‌های P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی موش‌های صحرایی CCI شده درگیر است (۵). همچنین Li و همکاران (۲۰۱۳) پیشنهاد کرده‌اند که لپتین برون‌زا می‌تواند درد نوروپاتی مزمن ناشی از CCI را کم کند و این اثر لپتین به واسطه‌ی کاهش بیان IL-6 و TNF- α و گیرنده‌های P2X₂ و P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی موش‌های صحرایی CCI شده میانجی‌گیری می‌شود (۴۱) که حاکی از کاهش هم‌زمان فاکتورهای التهابی و گیرنده‌های P2X₃ دارد. بنابراین فرض دیگری که می‌شود بیان کرد این است که تمرینات شنای بکار گرفته‌شده در پژوهش حاضر نتوانسته است از التهاب بافتی بکاهد که در نهایت موجب کاهش گیرنده‌های P2X₃ شود. هرچند این احتمال هم ضعیف است زیرا که بیان پروتئین P2X₃ گروه متحمل CCI بیشتر از گروه کنترل نبوده که تمرینات شنا بتواند آن را کاهش دهد. بنابراین شاید زمان‌بندی تغییرات ناشی از CCI عصب سیاتیک در اثرگذاری تمرینات شنا در این موارد مهم باشد. در پژوهشی، ۱۴ روز پس از لیگاتور بندی عصب نخاعی، کاهش کلی در واکنش ایمنی P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی وجود داشت. در این پژوهش مشاهده شد که کاهش در بیان گیرنده‌های P2X₃ در نورون‌های با قطر کوچک وجود دارد، ولی تغییری در بیان این گیرنده‌ها در نورون‌های بزرگ‌تر گانگلیون‌های ریشه خلفی L5 و L6 به وجود نمی‌آید (۴۰).

سازوکار عصبی درگیر به هر گونه‌ای که باشد، یافته‌های پژوهش اخیر ما آشکارا نشان داد که ۲ هفته تمرین شنا با شدت متوسط موجب کاهش هایپرالژیای القای شده به وسیله‌ی CCI عصب سیاتیک می‌گردد و این بهبود احتمالاً به دلیل کاهش مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی نورون‌های مهارتی و به دنبال آن افزایش آنزیم سنتز کننده گابا یعنی GAD65 است. درمجموع انجام فعالیت ورزشی مناسب بر نشانه‌های درد اثر می‌گذارد و باید به‌عنوان درمان مهم توان‌بخشی در تقویت اثرات داروهای ضد درد موردتوجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع را اعلام نکرده‌اند.

کاهش واکنش ایمنی گابا نمی‌باشند (۳۷). نتایج پژوهش حاضر هم این موضوع را تأیید می‌کند که CCI عصب سیاتیک آنزیم GAD65 را کاهش می‌دهد و کاهش GAD65 احتمالاً مسئول کاهش گابا است. هرچند که بیان گابا در پژوهش حاضر بررسی نگردید، ولی انتظار می‌رود که با کاهش GAD65، گابا نیز کاهش یابد. تا پیش‌ازین، مطالعه‌ای اثر تمرینات ورزشی را بر بیان پروتئین GAD65 در مدل‌های درد نوروپاتی بررسی نکرده بود. ازاین‌رو پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوازی شنا می‌تواند موجب افزایش بیان پروتئین GAD65 در موش‌های صحرایی CCI شده گردد.

به‌علاوه پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که سیستم پیام‌رسانی P2X با برخی میانجی‌های درد از جمله گلوتامات (۷)، گابا (۳۸) و ماده P (۳۹) در سطوح نخاع و گانگلیون ریشه خلفی مرتبط است. حذف ژنتیکی گیرنده‌های P2X₃ دریافت درد را در پاسخ به ATP به گونه‌ای معناداری کاهش می‌دهد (۸). در پژوهش حاضر بیان پروتئین P2X₃ در روز ۱۷ پس از CCI عصب سیاتیک با مقادیر گروه کنترل تفاوت معناداری نمی‌کرد که شاید نشانگر این باشد که ۱۷ روز پس از CCI تنظیم افزایش‌یافته‌ی گیرنده‌ی P2X₃ به سطح نرمال می‌رسد (۵). افزایش بیان گیرنده‌های P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی در روز ۱۴ پس از CCI مشاهده‌شده است. ولی ۱۵ روز پس از لیگاتور بندی عصب نخاعی، کاهش کلی در واکنش ایمنی P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی وجود داشت (۴۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که از روز ۱۴ تا ۱۷، کاهش در بیان گیرنده‌های P2X₃ وجود داشته باشد. ضمن این‌که تمرینات شنا نیز نتوانستند موجب کاهش بیان گیرنده‌های P2X₃ شوند و در روز ۱۷ پس از CCI عصب سیاتیک اختلاف معناداری بین هیچ‌یک از گروه‌ها مشاهده نشد. بنابراین شاید یکی از نقطه ضعف‌های پژوهش حاضر این است که اگر در روز ۱۴ پس از CCI عصب سیاتیک موش‌ها قربانی می‌شدند، تغییرات معنادار می‌بود. Wang و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که پروستاگلاندین E2 (PGE2) می‌تواند جریان‌های ATP را افزایش دهد و با هایپرالژیای و آلودینیای میانجی‌گیری شده با گیرنده‌های P2X₃ مرتبط باشد (۵)؛ بنابراین احتمالاً یکی از دلایل افزایش گیرنده‌های P2X₃ التهاب است؛ زیرا مشاهده شد که افزایش گیرنده‌های P2X₃ در گانگلیون ریشه خلفی موش‌های صحرایی CCI شده، با تزریق مهارکننده غیرانتخابی COX (Ibuprofen) و مهارکننده انتخابی COX-2

References

1. Amin B, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L. and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia*. 2012;83(5):888-95.
2. Hansen KB, Furukawa H, Traynelis SF. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol Pharmacol*. 2010;78(4):535-49.
3. Siniscalco D, Fuccio C, Giordano C, Ferraraccio F, Palazzo E, Luongo L, et al. Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. *Pharmacol Res*. 2007;55(2):158-66.
4. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(12):1471-83.
5. Wang Y, Zhang X, Guo QL, Zou WY, Huang CS, Yan JQ. Cyclooxygenase inhibitors suppress the expression of P2X (3) receptors in the DRG and attenuate hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett*. 2010;478(2):77-81.
6. Wirkner K, Sperlagh B, Illes P. P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol*. 2007;36(2):165-83.
7. Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev*. 2014;94(1):81-140.
8. Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, et al. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol*. 2005;567(Pt 2):621-39.
9. North RA. The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4(7):833-40.
10. Lorenzo HK, Susin SA. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett*. 2004;557(1-3):14-20.
11. Kirkland RA, Windelborn JA, Kasprzak JM, Franklin JL. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J Neurosci*. 2002;22(15):6480-90.
12. Nomura Y. Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7):961-3.
13. Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, et al. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2005;25(32):7317-23.
14. Kataoka K, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Sata T. The antinociceptive effect of SNAP5114, a gamma-aminobutyric acid transporter-3 inhibitor, in rat experimental pain models. *Anesth Analg*. 2013;116(5):1162-9.
15. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*. 2002; 213:1-47.
16. Vaysse L, Sol JC, Lazorthes Y, Courtade-Saidi M, Eaton MJ, Jozan S. GABAergic pathway in a rat model of chronic neuropathic pain: modulation after intrathecal transplantation of a human neuronal cell line. *Neurosci Res*. 2011;69(2):111-20.
17. Lorenzo LE, Magnussen C, Bailey AL, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A. Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2014; 10:57.
18. Koltyn KF. Analgesia following exercise: a review. *Sports Med*. 2000;29(2):85-98.
19. Hoffman MD, Shepanski MA, Mackenzie SP, Clifford PS. Experimentally induced pain perception is acutely reduced by aerobic exercise in people with chronic lowback pain. *J Rehabil Res Dev*. 2005;42(2):183-90.
20. Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg*. 2012;114(6):1330-7.
21. Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain*. 2007;8(12):989-97.
22. Koltyn KF, Garvin AW, Gardiner RL, Nelson TF. Perception of pain following aerobic exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1996;28(11):1418-21.
23. Farzad B, Rajabi H, Gharakhanlou R, Nasirinezhad F, Janzadeh A, Jameie SB. Effect of swimming training on neuropathic pain induced by CCI in male adult rats: behavioral study. *Sport Physiology*. Spring 2016; 8 (30): 15-30.
24. Cobiauchi S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F, Luvisetto S. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 2010;168(1):273-87.
25. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
26. Shen J, Fox LE, Cheng J. Swim therapy reduces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by chronic constriction nerve injury in rats. *Pain Med*. 2013;14(4):516-25.
27. Sene-Fiorese M, Duarte FO, Scarmagnani FR, Cheik NC, Manzoni MS, Nonaka KO, et al. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats

- fed with high-fat diet. *Obesity* (Silver Spring). 2008;16(10):2217-22.
28. Goes AT, Souza LC, Filho CB, Del Fabbro L, De Gomes MG, Boeira SP, et al. Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 2014; 256:61-71.
29. Hutchinson KJ, Gómez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain*. 2004;127(Pt 6):1403-14.
30. Kawamata M, Omote K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca^{2+} concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain*. 1996;68(1):85-96.
31. Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderöth B, Meyerson BA. Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain*. 1997;73(1):87-95.
32. Pinal CS, Tobin AJ. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*. 1998;5(2-3):109-18.
33. Kubo K, Nishikawa K, Ishizeki J, Hardy-Yamada M, Yanagawa Y, Saito S. Thermal hyperalgesia via supraspinal mechanisms in mice lacking glutamate decarboxylase 65. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(1):162-9.
34. Lin H, Heo BH, Kim WM, Kim YC, Yoon MH. Antiallodynic effect of tianeptine via modulation of the 5-HT₇ receptor of GABAergic interneurons in the spinal cord of neuropathic rats. *Neurosci Lett*. 2015; 598:91-5.
35. Cirillo G, Colangelo AM, Bianco MR, Cavaliere C, Zaccaro L, Sarmientos P, et al. BB14, a Nerve Growth Factor (NGF)-like peptide shown to be effective in reducing reactive astrogliosis and restoring synaptic homeostasis in a rat model of peripheral nerve injury. *Biotechnol Adv*. 2012;30(1):223-32.
36. Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K. Changes in GAD- and GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat*. 1998;16(1):57-72.
37. Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*. 2003;104(1-2):229-39.
38. Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R. The ATP-mediated fast current of rat dorsal root ganglion neurons is a novel effector for GABA(B) receptor activation. *Neurosci Lett*. 2003;338(3):181-4.
39. Paukert M, Osteroth R, Geisler HS, Brandle U, Glowatzki E, Ruppersberg JP, et al. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X₃ subunit. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21077-82.
40. Kage K, Niforatos W, Zhu CZ, Lynch KJ, Honore P, Jarvis MF. Alteration of dorsal root ganglion P2X₃ receptor expression and function following spinal nerve ligation in the rat. *Exp Brain Res*. 2002;147(4):511-9.
41. Li X, Kang L, Li G, Zeng H, Zhang L, Ling X, et al. Intrathecal leptin inhibits expression of the P2X_{2/3} receptors and alleviates neuropathic pain induced by chronic constriction sciatic nerve injury. *Mol Pain*. 2013;9:65.



Original Article

The Effects of Two-Week Swimming Training on Neuropathic Pain Induced by Chronic Constriction Injury and the Expression of GAD65 in Adult Male Rats

Farzad B¹, Rajabi H^{2*}, Jameie SB^{1,3}, Gharakhanlou R⁴, Hayat P⁵, Nasirinezhad F⁶, Dameni S⁶

1. Neuroscience Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Faculty of Physical Education & Sports Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

3. Department of Basic Sciences, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences

4. Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5. Cellular & Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 02 Dec 2014

Accepted: 10 May 2016

Abstract

Background & Objective: Unknown mechanisms are involved in neuropathic pain. Among the non-pharmacological treatments, it seems that physical activity improves neuropathic pain. However, the possible reasons for the effectiveness of regular physical activity on neuropathic pain are unknown. Therefore, the present study was performed to determine the effects of two-week swimming training on the expression of GAD65 enzyme and P2X₃ receptor in Chronic Constriction Injury (CCI) of the sciatic nerve.

Materials & Methods: 40Wistar adult rats were divided into five groups randomly: 1) CCI neuropathic pain with swimming training (CCIST2); 2) CCI neuropathic pain without swimming training (CCI); 3) No CCI neuropathic pain with swimming training (ST2); No CCI neuropathic pain without swimming training (control group); 5) CCI sham surgery (Sham CCI). CCI and CCIST2 groups underwent peripheral nerve injury by four loose ligatures around sciatic nerve. Swimming program included two weeks with five sessions per week, and 30-60 min per session. The protein expressions of GAD65 enzyme and P2X₃ receptor were evaluated by western blotting technique.

Results: CCI surgery decreased the expression of GAD65, but two weeks swimming training increased expression of GAD65 comparing to CCI and Sham CCI groups ($P \leq 0.001$), but P2X₃ receptor expression were not significantly different among groups in lumbar segment of rats ($P > 0.05$).

Conclusion: Totally, our findings showed that two-week swimming training improves neuropathic pain possibly through maintenance of inhibitory neurons and subsequently increased GAD65, which converts glutamate excitatory neurotransmitter to GABA inhibitory neurotransmitter.

Keywords: Neuropathic Pain, Swimming Training, GAD65, P2X₃ Receptor

* **Corresponding author: Hamid Rajabi**, Faculty of Physical Education & Sports Science, Kharazmi University, Tehran, Iran.
Email: hrajabi@hotmail.com