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[۱،۳]، رضا قراخانلو[۴]، پریسا حیات[۵]، فریناز نصیری‌نژاد[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 دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: مکانیسم‌های نامشخصی در درد نوروپاتی درگیر می‌باشند. به نظر می‌رسد از بین روش‌های 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 $P2X_3$ در مدل آسیب مزمن ناشی از فشردگی عصب (CCI) عصب سیاتیک موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: چهل سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱) گروه القای نوروپاتی با مدل CCI و تمرین شنا (CCIST2)؛ 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). گروه‌های CCIST2 و CCI 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 $P2X_3$ به‌وسیله‌ی تکنیک وسترن بلاتینگ موردسنجش 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 ($P\leq ۰/۰۰۱$)، ولی میزان بیان گیرنده‌ی $P2X_3$ در نخاع ناحیه کمری موش‌های صحرایی در گروه‌های پژوهش تفاوت معناداری باهم نداشتند ($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مجموع یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد انجام تمرینات شنا احتمالاً به‌واسطه‌ی حفظ نورون‌های مهاری و به دنبال آن آنزیم GAD65 که موجب تبدیل میانجی عصبی تحریکی گلوتامات به میانجی عصبی مهاری گابا می‌گردد موجب بهبود درد نوروپاتی می‌شود.

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

مقدمه

بیشتر بیماران مبتلا به درد نوروپاتی به دلیل پیچیدگی و مکانیسم‌های نامشخص درگیر در درد نوروپاتی و همچنین محدودیت داروهای تجویزی به دلیل اثرات مضر و ناخواسته‌ی آن‌ها، ناراضی بوده و خیلی از آن‌ها نسبت به داروهای موجود فعلی مقاوم می‌باشند (۱). مکانیسم‌های متعددی برای ایجاد درد نوروپاتیک مطرح‌شده است که از بین آن‌ها می‌توان به فعال شدن گیرنده‌های NMDA، افزایش سطح گلوتامات، نیتریک اکساید و افزایش بیش‌ازحد گونه‌های واکنش‌دهنده‌ی اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو اشاره نمود (۲، ۳). انتقال درد توسط نورون‌های گانگلیون ریشه خلفی و نخاع انجام می‌گیرد و چندین گیرنده‌ی پورینرژیک (گیرنده‌های $P2X_{1-7}$) در این نواحی بیان می‌شوند (۴). کاربرد الیگونوکلئوتیدهای ضد گیرنده‌های $P2X_3$، تداخل RNA، تکنولوژی حذف ژن یا آنتاگونیست‌های انتخابی نشان داده‌اند که ATP و گیرنده‌های $P2X_3$ نقش مهمی در توسعه و حفظ درد نوروپاتی بازی می‌کنند (۵). ATP رهاشده از بافت آسیب‌دیده به‌واسطه‌ی فعال‌سازی گیرنده‌های P2X به‌ویژه گیرنده $P2X_3$ می‌تواند انتقال درد را در بیماری‌های با درد نوروپاتی تنظیم کند (۶). در حقیقت ATP می‌تواند بر غشای

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

پیش‌سیناپسی به‌واسطه‌ی گیرنده‌های $P2X_3$ یا به‌واسطه‌ی گیرنده‌های P2Y، آزادسازی میانجی تحریکی گلوتامات را رها کند. گلوتامات در غشای پس‌سیناپسی بر روی گیرنده‌های AMPA و NMDA اثر می‌کند که میانجی عصبی تحریکی در مسیرهای درد می‌باشند (۷). حذف ژنتیکی گیرنده‌های $P2X_3$ دریافت درد را در پاسخ به ATP به گونه‌ی معناداری کاهش می‌دهد که اشاره به این موضوع دارد که گیرنده‌های $P2X_3$ می‌توانند به‌عنوان هدف‌های جذاب پژوهشی در درد نوروپاتی موردتوجه قرار گیرند (۸). به همین دلیل مهار گیرنده‌های $P2X_3$ در تسکین درد نوروپاتی به‌عنوان یک روش مفید موردتوجه است (۹).

برخی از انواع نوروپاتی با اختلال در عملکرد میتوکندری همراه می‌باشند که مشخص‌شده در مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی نقش دارند (۱۰). مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی وابسته به میتوکندری به‌وسیله‌ی شماری از فاکتورها مانند ROS، سرامید و نیتریک اکساید فعال می‌شود (۱۱) و مشخص‌شده که این فاکتورها در پاتوفیزیولوژی درد نوروپاتی نقش دارند. این عوامل موجب رهایی سیتوکروم C از میتوکندری و به دنبال آن تشکیل مجموعه‌ای از سیتوکروم C، فاکتور فعالیت پروتئاز آپاپتوزی-۱ و کاسپاز-۹ می‌گردد که فعال‌سازی کاسپازهای پایین‌دست را آغاز می‌کند (۱۲). نشان داده‌شده که آسیب عصب محیطی موجب ایجاد مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی در شاخ خلفی نخاع (لامینای I–III) می‌شود (۱۳). درواقع یکی از مکانیسم‌های مهم ایجاد درد نوروپاتی پس از آسیب عصبی، کاهش میانجی‌های عصبی مهاری ناشی از مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی در سیستم عصبی است. گابا (GABA) یکی از مهم‌ترین این میانجی‌های عصبی است که نقش مهمی در تنظیم درد در شاخ خلفی نخاع دارد (۱۴). مطالعات انجام‌شده در رابطه با درد نوروپاتی نشان می‌دهد که پدیده مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی نقش مهمی در از بین رفتن نورون‌های گاباارژیک پس از آسیب عصبی دارد (۱۳). مشاهده‌شده است که به دنبال ایجاد آسیب عصبی، غلظت این میانجی عصبی در نخاع به‌شدت کاهش‌یافته و همین امر موجب ارسال پیام‌های تشدید شده‌ای از درد به نواحی بالاتر می‌گردد (۱۵). همچنین سایر مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که همراه با کاهش سطح گابا به دنبال آسیب عصب محیطی یا طناب نخاعی، سطح آنزیم GAD (گلوتامات دکربوکسیلاز که آنزیم سنتز کننده گابا است) نیز تغییر می‌کند. کاهش گابا و آنزیم سنتز کننده آن نیز موجب از بین رفتن اثر مهاری آن‌ها شده و درنتیجه منجر به هایپرآلجزیا و آلودینیا می‌شود (۱۶). Lorenzo و همکاران (۲۰۱۴) واکنش ایمنی GAD65 را در شاخ خلفی سطحی نخاع در مدل آسیب مزمن ناشی از فشردگی عصب (CCI) عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی بررسی کردند. چگالی پایانه‌های مهاری GAD65 در لامینای ۱ و لامینای ۲ نخاع در 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 (۱۷).

از طرف دیگر اثرات مفید فعالیت ورزشی حاکی از تغییر احساس درد است (۱۸) و نشان داده‌شده که علائم درد حاد را در انسان‌ها (۱۹) و درد نوروپاتی را در جوندگان کاهش می‌دهد (۲۰، ۲۱). هرچند که کاهش احساس درد بیشتر به پاسخ حاد فعالیت ورزشی نسبت داده می‌شود و معمولاً در کمتر از ۱ ساعت از بین می‌رود (۱۸، ۲۲)، ولی اثرات ماندگار ناشی از تمرینات ورزشی کمتر مشخص است. مشاهده شده است که دو هفته تمرین شنا موجب کاهش هایپرآلجزیای مکانیکی و حرارتی در موش‌های صحرایی CCI شده می‌گردد (۲۳). مطالعه‌ی دیگری نشان می‌دهد که تمرین مزمن دویدن می‌تواند موجب ناراحتی و کاهش آستانه‌ی درد گردد. Cobianchi و همکاران (۲۰۱۰) افزایش آلودینیا را با تمرینات مزمن دویدن (۵۳ روز) مشاهده کردند (۲۴). بنابراین برای بررسی دلایل احتمالی بهبود هایپرآلجزیای مکانیکی و حرارتی ناشی از تمرینات ورزشی، آنزیم سنتز کننده گابا (GAD65) و گیرنده‌ی $P2X_3$ در این پژوهش مورد مطالعه قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی– مداخله‌ای است که نمونه‌های پژوهش را ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با متوسط وزن ۲۰±۲۰۰ گرم تشکیل می‌دادند. موش‌ها در قفس‌های استاندارد تحت شرایط کنترل‌شده‌ی تاریکی و روشنایی (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی)، دما (۳±۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. کلیه مراحل مطالعه با مجوز کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران و بر اساس

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 آلودینیای 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

القای نوروپاتی با مدل CCI و تمرین شنا (CCIST2)؛ گروه نوروپاتی با مدل CCI بدون تمرین شنا (CCI)؛ گروه سالم با تمرین شنا (ST2)؛ گروه کنترل سالم بدون تمرین شنا (Control) و گروه شم جراحی CCI (ShamCCI) تقسیم گردیدند.

پس از سه روز تطبیق با شرایط محیطی از کلیه نمونه‌ها آزمون‌های رفتاری اولیه گرفته شد و به‌منظور یادگیری و آشنایی با تمرین شنا به مدت ۳ روز در یک هفته همه‌ی گروه‌ها تمرین شنا را انجام دادند و پس‌ازآن 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 پس‌ازآن به مدت ۲ هفته تمرینات اصلی شنا انجام شد و هر هفته آزمون های رفتاری تکرار گردید که

فری جهت سنجش آلودینیای مکانیکی، از آزمون پلانتار برای هایپرآلجیزیای حرارتی و از آزمون رندال- سلیتو برای هایپرآلجیزیای مکانیکی استفاده گردید.

برای انجام جراحی CCI حیوانات با تزریق کتامین و زایلازین به نسبت ۸ به ۱ به‌صورت تزریق داخل صفاقی بی‌هوش شده و پس از تراشیدن موهای محل جراحی یک برش ۲ سانتی‌متری در پوست ناحیه‌ی بالای ران پای چپ ایجادشده 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 به‌گونه‌ای که جریان خون‌رسانی به نواحی دیستال عصب مختل نگردد. پس از اتمام،

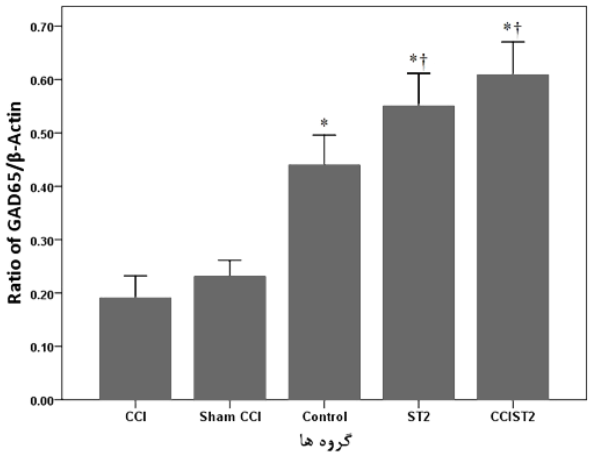
عضلات و پوست محل جراحی به تفکیک بخیه زده شد (۲۵).

موش‌های گروه‌های CCIST2 و ST2 به مدت ۲ هفته، ۵ روز در هفته در ساعات مشابهی از روز تمرین شنا می‌کردند (جدول ۱). پروتکل تمرینی بر مبنای مطالعه‌ی مقدماتی محققین پژوهش حاضر و بر اساس مطالعات پیشین تهیه و انجام گردید، به‌طوری‌که مدت‌زمان شنا به گونه تدریجی در طول دو هفته افزایش یافت. تمرینات با زمان‌های 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 کرده‌اند. همچنین به‌منظور مطالعه تغییرات میزان بیان پروتئین GAD65 و $P2X_3$، نمونه‌های سگمنت نخاعی L4 تا L6 از همه‌ی گروه‌ها توسط تکنیک وسترن بلاتینگ مورد آزمایش قرار گرفت. ایمونوبلاتینگ یا وسترن بلاتینگ روشی دومرحله‌ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جداشده به‌وسیله‌ی الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالباً از جنس نیتروسلولز است انتقال می‌یابند و در مرحله دوم توسط آنتی‌بادی اختصاصی، پروتئین موردنظر شناسایی می‌شود.

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. تمام یافته‌ها با میانگین ± انحراف استاندارد گزارش‌شده است. آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده استفاده گردید که در صورت طبیعی بودن از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. تفاوت بین گروه‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه بررسی شدند و از آزمون تعقیبی شفه و بنفرونی برای مقایسه‌ی گروه‌ها استفاده گردید. سطح آلفا برای معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

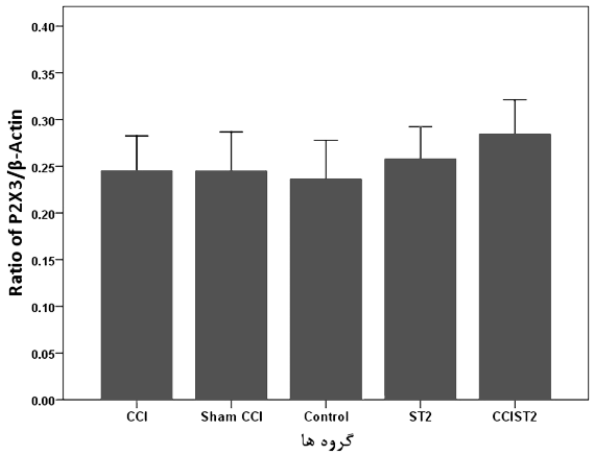
نتایج

همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود بیان GAD65 در موش‌های گروه CCST2 (P<۰/۰۰۱)، ST2 (P=۰/۰۰۲) و موش‌های گروه کنترل (P=۰/۰۲۸) به نسبت موش‌های CCI بیشتر بود. همچنین میزان بیان GAD65 در موش‌های گروه CCIST2 (P=۰/۰۰۱) و ST2 (P=۰/۰۰۴) به نسبت گروه ShamCCI بیشتر بود.



نمودار۱- نسبت بیان GAD65 به بتا اکتین در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنادار نسبت به گروه CCI؛† اختلاف معنادار با گروه Sham CCI.

همان‌گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود بیان گیرنده‌ی $P2X_3$ در نخاع ناحیه کمری موش‌های صحرایی در گروه‌های پژوهش تفاوت معناداری باهم ندارند (P>۰/۰۵).



نمودار ۲- نسبت بیان گیرنده P2X3 به بتا اکتین در گروه های مختلف.* اختلاف معنادار نسبت به گروه CCI؛† اختلاف معنادار با گروه Sham CCI.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه‌ای نشان داده است که دو هفته تمرین شنا می‌تواند تا حدودی هایپرآلجیزیای مکانیکی و حرارتی ناشی شده از CCI عصب سیاتیک را به گونه‌ی معناداری بهبود بخشد (۲۳). هرچند در مورد اثر تمرینات ورزشی بر درد نوروپاتی همه مطالعات هم‌راستا نمی‌باشند. مطالعات متناقضی نیز دراین‌ارتباط وجود دارد که نشان می‌دهد تمرینات مزمن دویدن درد نوروپاتی را افزایش می‌دهد (۲۴). Cobianchi و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که ۲۴ روز پس از CCI، تحمل نامتعادل وزن بدن در بین دو پا و پارامترهای ردپای ناهنجار به گونه‌ی فزاینده‌ای به مقادیر

طبیعی نزدیک شد. در موش‌های خانگی با ۴ روز تمرین بر روی نوارگردان افزایش بیان ویژگی‌های بازسازی عصب مشاهده شد. درحالی‌که تمرینات طولانی‌مدت (۵۳ روز) آلودینیا، تحمل وزن و پارامترهای ردپا را بدتر کرد (۲۴). همچنین گزارش‌شده 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 وهله‌ها) همراه بود که مشاهدات عینی از خو گرفتن حیوان‌ها به مدت تمرین را نشان دادند.

جراحی CCI موجب کاهش معنادار آنزیم GAD65 گردید درصورتی‌که ۲ هفته تمرین شنا موجب افزایش معنادار آن شد. در مدل CCI عصب سیاتیک در موش صحرایی، مقادیر گلوتامات و آسپارتات 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 هایپرآلجیزیا (با لیگاتوربندی عصب سیاتیک)، سطوح خارج سلولی گلوتامات و آسپارتات بیشتر از دو برابر بود که به‌وسیله‌ی میکرودیالیز اندازه‌گیری شد (۳۱). آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) در پایانه‌های عصبی قرار دارد و گابا (میانجی عصبی مهاری) 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 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 القاشده با لیگاتوربندی اعصاب L5 و L6 نخاعی، کاهش بیان GAD65 و غلظت گابا در نخاع موش‌های صحرایی نیز گزارش‌شده است (۳۴). همچنین کاهش GAD65 در نخاع موش‌های صحرایی دارای درد نوروپاتی با مدل SNI نشان داده‌شده است (۳۵). نورون‌های واسط مهاری یک جز مهم مدار شاخ خلفی هستند. جایی که این نورون‌ها گیرنده‌های درد نخاعی را تنظیم می‌کنند. در حال حاضر شواهد قابل‌توجهی وجود دارد که نشان می‌دهند کاهش مهار در شاخ خلفی نخاع در درد نوروپاتی نقش دارد. کاهش این نورون‌های مهاری پس از آسیب عصبی یکی از سازوکارهایی است که برای توجیح کاهش مهار پیشنهاد می‌شود. نشان داده‌شده 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 مهاری 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 پایانه-های 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 استرئولوژیک از نسبت نورون‌ها در لامینا ۱، ۲ و ۳ شاخ خلفی نخاع موش‌های صحرایی نشان داد که واکنش ایمنی گابا و یا گلایسین دو هفته پس از CCI هیچ‌گونه کاهش نورون‌های واسط مهاری را نشان نمی‌دهد که پیشنهاد می‌کند سنتز گابا تحت این شرایط تنظیم کاهشی شده است و این‌که کاهش نورون‌های گاباارژیک مسئول

کاهش واکنش ایمنی گابا نمی‌باشند (۳۷). نتایج پژوهش حاضر هم این موضوع را تائید 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 پیش‌ازاین، 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 پیام-رسانی P2X با برخی میانجی‌های درد ازجمله گلوتامات (۷)، گابا (۳۸) و ماده P (۳۹) در سطوح نخاع و گانگلیون ریشه خلفی مرتبط است. حذف ژنتیکی گیرنده‌های $P2X_3$ دریافت درد را در پاسخ به ATP به گونه‌ی معناداری کاهش می‌دهد (۸). در پژوهش حاضر بیان پروتئین $P2X_3$ 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 $P2X_3$ به سطح نرمال می‌رسد (۵). افزایش بیان گیرنده‌های $P2X_3$ 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 $P2X_3$ در گانگلیون ریشه خلفی وجود داشت (۴۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که از روز ۱۴ تا ۱۷، کاهش در بیان گیرنده‌های $P2X_3$ وجود داشته باشد. ضمن این‌که تمرینات شنا نیز نتوانستند موجب کاهش بیان گیرنده‌های $P2X_3$ 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 جریان-های ATP را افزایش دهد و با هایپرآلجزیا و آلودینیای میانجی‌گیری شده با گیرنده‌های $P2X_3$ مرتبط باشد (۵)؛ بنابراین احتمالاً یکی از دلایل افزایش گیرنده‌های $P2X_3$ التهاب است؛ زیرا مشاهده شد که افزایش گیرنده‌های $P2X_3$ در گانگلیون ریشه خلفی موش‌های صحرایی CCI شده، با تزریق مهارکننده غیرانتخابی COX (Ibuprofen) و مهارکننده انتخابی COX-2 (Celecoxib) به گونه‌ی 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 $P2X_3$ 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 به‌واسطه‌ی کاهش بیان IL-6 و TNF-α و گیرنده‌های $P2X_2$ و $P2X_3$ در گانگلیون ریشه خلفی موش‌های صحرایی CCI شده میانجی‌گیری می‌شود (۴۱) که حاکی از کاهش هم‌زمان فاکتورهای التهابی و گیرنده‌های $P2X_3$ 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 درنهایت موجب کاهش گیرنده‌های $P2X_3$ شود. هرچند این احتمال هم ضعیف است زیرا که بیان پروتئین $P2X_3$ 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 $P2X_3$ در گانگلیون ریشه خلفی وجود داشت. در این پژوهش مشاهده شد که کاهش در بیان گیرنده‌های $P2X_3$ 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 هایپرآلجزیای القای شده به‌وسیله‌ی CCI عصب سیاتیک می‌گردد و این بهبود احتمالاً به دلیل کاهش مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی نورون‌های مهاری 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 انجام‌گرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

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. Cobianchi 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 Ca2+ 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, Linderoth 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 P2X (3) 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 P2X2/3 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 B[1], Rajabi H[2]*, Jameie SB[1,3], Gharakhanlou R[4], Hayat P[5], Nasirinezhad F[6], Dameni S[6]

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 $P2X_3$ 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 $P2X_3$ 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

Journal of Fasa University of Medical Sciences (2016) 6: 246-254