

## The effect of aerobic exercise with melatonin on GDNF gene expression and some indicators of oxidative stress in male rats with diabetic neuropathic pain

Marzieh Karimi, Ahmad Kaki\*

Department of physical education, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

\* Corresponding author e-mail: [ahvaz.kaki@yahoo.com](mailto:ahvaz.kaki@yahoo.com)

**Citation:** Karimi M, Kaki A. The effect of aerobic exercise with melatonin on GDNF gene expression and some indicators of oxidative stress in male rats with diabetic neuropathic pain. *Daneshvar Medicine* 2021; 29(3):132-146 . doi: 10.22070/DANESHMED.2021.13915.1040

### Abstract

**Background and Objective:** GDNF protects nerve cells against inflammation and oxidative stress caused by hyperglycemia. The aim of this study was to evaluate the effect of aerobic exercise with melatonin on GDNF gene expression and some indicators of oxidative stress in rats with diabetic neuropathic pain.

**Materials and Methods:** Forty 8-week-old male Wistar rats (weight range  $204 \pm 11.3$  g) were randomly divided into five groups (n = 8) including: diabetic neuropathy (50 mg/ kg streptozotocin intraperitoneal injection), diabetic melatonin neuropathy (mg/kg 10 melatonin daily for 6 weeks), diabetic neuropathy exercise (30 minutes of aerobic exercise at 15 meters per minute, 5 days a week for 6 weeks), diabetes melatonin neuropathy and healthy exercise and control. After confirmation of diabetic neuropathy by behavioral tests, exercise protocol and supplementation were performed. GDNF gene expression was measured by real-time technique and oxidative stress indices in spinal cord tissue by spectrophotometer. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis.

**Results:** Exercise and melatonin reduced the sensitivity of the nervous system to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Aerobic exercise with melatonin significantly increased GDNF gene expression and SOD and CAT enzyme activity and decreased MDA concentration compared to diabetic neuropathy group (P <0.05).

**Conclusion:** Aerobic exercise with melatonin modulates the expression of GDNF gene and oxidative stress indices and improves the sensitivity of nociceptors to pain factors. It is recommended to use aerobic exercise with melatonin for diabetics to reduce neuropathic pain.

**Keywords:** Aerobic exercise, Melatonin, GDNF, Oxidative stress, Diabetic neuropathic pain

Received: 15 May 2021

Last revised: 28 July 2021

Accepted: 15 Aug 2021

# تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن GDNF و برخی شاخص های استرس اکسیداتیو در موش های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت

نویسندگان: مرضیه کریمی، احمد کاکلی \*

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

Email: ahvaz.kaki@yahoo.com

\*نویسنده مسئول: احمد کاکلی

## چکیده

**مقدمه و هدف:** GDNF سلول های عصبی را در مقابل التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از هایپرگلیسمی محافظت می کند. هدف پژوهش حاضر تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن GDNF و برخی شاخص های استرس اکسیداتیو در موش های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت می باشد.

**مواد و روش ها:** ۴۰ سر موش صحرایی نر و بیستار ۸ هفته ای (محدوده وزنی  $11/3 \pm 20.4$  گرم) به طور تصادفی در پنج گروه ( $n = 8$ ) شامل: نوروپاتی دیابت ( $50 \text{ mg/kg}$  استرپتوزوسین تزریقی درون صفاقی)، نوروپاتی دیابت ملاتونین ( $10 \text{ mg/kg}$  ملاتونین روزانه به مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابت تمرین (۳۰ دقیقه تمرین هوازی با شدت ۱۵ متر در دقیقه، ۵ روز در هفته به مدت ۶ هفته)، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین و کنترل سالم قرار گرفتند. پس از تایید ایجاد نوروپاتی دیابت توسط تست های رفتاری، پروتکل تمرین و مصرف مکمل اجرا گردید. میزان بیان ژن GDNF با تکنیک ریل تایم و شاخص های استرس اکسیداتیو در بافت نخاع با روش اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. آزمون آنالیز واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل آماری استفاده گردید.

**نتایج:** تمرین و ملاتونین موجب کاهش حساسیت سیستم عصبی به هایپرآلژزیا حرارتی و آلودینای مکانیکی گردید. تمرین هوازی به همراه ملاتونین باعث افزایش معنی دار میزان بیان ژن GDNF و فعالیت آنزیم های SOD و CAT و کاهش غلظت MDA نسبت به گروه نوروپاتی دیابت شد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** تمرین هوازی همراه با ملاتونین میزان بیان ژن GDNF را افزایش و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را بهبود بخشید. پیشنهاد می شود از تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین برای بیماران دیابتی به منظور کاهش درد نوروپاتی استفاده شود.

**واژه های کلیدی:** تمرین هوازی، ملاتونین، GDNF، استرس اکسیداتیو، درد نوروپاتی دیابت

## مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴

## مقدمه

از گیرنده تیروزین کیناز RET را تشکیل می دهد که مسیر های سیگنالینگ درون سلولی PI3K, MAPK و PLC- $\gamma$  را فعال و اعمال مختلفی شامل بقای سلولی، تمایز، تکثیر، مهاجرت، کموتاکسی، فرا رشد نوریت ها و شکل پذیری سیناپسی را تنظیم می کند (۶). بافتهای مختلفی GDNF را سنتز و ترشح می کنند. اعتقاد بر این است که سلول های شوان منبع اصلی سنتز GDNF در PNS هستند. ناکاتا و همکاران گزارش دادند که در حیواناتی که درد نوروپاتیک ناشی از دیابت دارند، طی ۲ هفته بیان GDNF و گیرنده RET تا ۴۰ درصد در عصب سیاتیک و DRG آنها کاهش می یابد همچنین نشان دادند که اختلال عملکرد سیگنالینگ GDNF در فیبرهای عصبی آوران می تواند در توسعه و حفظ شرایط درد به ویژه درد نوروپاتیک شرکت کند (۷). محققین بر این باورند که استرس اکسیداتیو ناشی از تولید گونه های فعال اکسیژن و یا نقص در دفاع آنتی اکسیدانی در نتیجه اختلال متابولیسم گلوکز در نوروها منجر به کاهش سطح نوروتروفین ها و اختلال در عملکرد اعصاب حسی می شود (۸)، لذا راهبردی که بتواند این نقص فیزیولوژیکی را مهار کند، به عنوان ابزار درمانی مطرح می شود. ملاتونین یا (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) یک آیدل آمین است که در غده پینه آل ترشح می شود. مهمترین فعالیت های بیولوژیکی این هورمون، القاء کننده خواب، آنالژزی، آنتی اکسیدان قوی، حذف کننده طیف وسیعی از رادیکال های آزاد، دارای اثرات ضد التهابی، پیشگیری از آسیب میتوکندری و آپوپتوز در بدن می باشد. تحقیقات نشان داده اند که ملاتونین با تنظیم مثبت بیان ژن آنتی اکسیدانی از جمله؛ SOD، کاتالاز و GSH-Px و همچنین از طریق مهار مسیر های التهابی بر درد نوروپاتیک دیابت اثر گذار است (۹). از طرفی ورزش بعنوان یک راهبرد غیردارویی به عنوان یک عامل ضد التهابی و آنتی اکسیدانی جهت کاهش عوارض ناشی از دیابت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۱۰). نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان می دهد که تمرین هوازی با افزایش سطوح پروتئین های شوک گرمایی، کاهش سطوح گونه های فعال اکسیژن (ROS)، آزاد شدن مواد آپیوئید درون زا و افزایش بیان نوروتروفین ها توانسته

نوروپاتی دیابتی، یک از شناخته شده ترین امراض سیستم عصبی ناشی از دیابت است. بیش از نیمی از بیماران، مبتلا به این عارضه می شوند. نوروپاتی دیابتی، با تغییرات ساختاری در اعصاب محیطی همراه است، به طوری که آتروفی آکسونی، دمیالیناسیون، کاهش تارهای عصبی، کاهش جریان خون عروق عصبی و کندشدن فرایند ترمیم یا بازتولید در تارهای عصبی رخ می دهد، این عوارضات می توانند موجب پیامد های قابل توجهی از جمله درد و کاهش فقدان حس در بیمار شوند (۱). درد نوروپاتیک یکی از شایع ترین علائم نوروپاتی دیابتی است که حدود ۳۰ درصد بیماران از آن رنج می برند، در حالی که بقیه یک پدیده منفی مانند بی حسی را تجربه می کنند. درد نوروپاتیک با خصوصیتی نظیر پردردی حرارتی و آلودینیای مکانیکی مشخص می شود. در شرایط غیر نوروپاتیک، حفظ و نگهداری فیبرهای عصبی محیطی، تحت تعادل بین تخریب و ترمیم بافت عصبی است (۲). پژوهش های اخیر نشان داده اند که در پاسخ به عوامل استرس زا ناشی از هایپرگلیسمی، افزایش ۴ برابری در سطح گلوکز سلول های عصبی رخ می دهد. این عامل منجر به آسیب عصبی موسوم به نوروتوکسی گلوکز می گردد. تحت این شرایط تخریب بیش از نوسازی عصبی رخ می دهد. تحقیقات نشان داده اند که فیبرهای عصبی محیطی گروه C که حس های درد، درجه حرارت، لمس و خارش را انتقال می دهند چون فاقد محافظت میلین بوده، مستعد آسیب ناشی از سمیت گلوکز هستند و اختلال عملکرد این الیاف منجر به درد نوروپاتی می شود (۳). نظریه های متعددی برای مکانیسم های درگیر در پاتوژنز درد نوروپاتی دیابت مطرح شده است؛ از جمله: تغییر در عروق خونی تامین کننده اعصاب محیطی، تشکیل مازاد گونه های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش گلیکوزیلاسیون پروتئین ها و چربی ها، تغییر در بیان کانال های سدیم و کلسیم و اخیراً کاهش حمایت نوروتروفیک را پیشنهاد داده اند (۴،۵). یکی از مهم ترین نوروتروفین ها، عامل نوروتروفیک مشتق از سلول های گلیال (GDNF) است که اثر ترمیمی بر دژنراتیو نوروها عصبی ناشی از دیابت دارد. GDNF به گیرنده  $\alpha 1$  GFR متصل و یک کمپلکس

است، سطوح نشانگرهای استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و از تخریب پیشرونده نوروں های حسی جلوگیری کند و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهد (۱۱). با این حال بررسی مکانیسم اثر تعاملی تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین به عنوان یک مداخله درمانی غیر دارویی و غیر تهاجمی بر درد نوروپاتی ناشی از دیابت در سطح سلولی کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن GDNF و برخی شاخص های استرس اکسیداتیو در موش های صحرایی دارای درد نوروپاتی دیابت می باشد.

### مواد و روش ها

در پژوهش حاضر راهبرد تحقیق از نوع تجربی بود. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفتهگی با محدوده وزنی  $20.4 \pm 11/3$  گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه و در گروه های چهار تایی در قفس های استاندارد پلی کربنات در شرایط دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، آشناسازی با نورگردان و دستکاری، موش ها به طور تصادفی به پنج گروه ( $n = 8$ ) نوروپاتی دیابت، نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین و سالم کنترل تقسیم شدند. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز با کد (IR.IAU.AHVAVZ.REC.1399.098) مورد تایید قرار گرفت.

### القاء دیابت

پس از اتمام پروتکل آشناسازی و متعاقب ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القاء دیابت با تزریق درون صفاقی محلول استروپتوزوتوسین (Sigma, St. Louis, MO)؛ حل شده در بافر سیترات M 05/0 با pH: 5.04/5 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به منظور ایجاد دیابت نوع ۱ صورت گرفت (۱۲، ۱۳). به موش های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات M 05/0 با

### تزریق ملاتونین

دو هفته پس از القای دیابت با تایید درد نوروپاتیک دیابتی، همراه با شروع پروتکل تمرین هوازی، گروه های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین، جهت جلوگیری از ایجاد هایپرآلژی نوروپاتیک دیابتی، ماده ملاتونین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر نوبت) به صورت درون صفاقی، حل شده در سالین حاوی اتانول، به طور روزانه و به مدت ۶ هفته تزریق گردید (۱۵).

### آزمون های رفتاری

پیش از القاء دیابت، به منظور سازگاری جهت آزمون های رفتاری، حیوانات سه روز در معرض آزمایش (دو بار برای هر آزمون) قرار گرفتند. دو هفته پس از القای دیابت، آزمون های رفتاری درد نوروپاتیک به عنوان شاخص وقوع شرایط پاتولوژیکی نوروپاتی دیابت و برای تایید و میزان درد نوروپاتیک از تمامی گروه ها به عمل آمد (۱۸-۱۶). به منظور بررسی اثرات طولانی مدت تمرین و تزریق ملاتونین هر هفته و تا پایان پروتکل تمرین هوازی و تزریق ملاتونین آزمون های رفتاری درد نوروپاتیک اجرا شد، برای اجتناب از عوامل مداخله گر نظیر اثرات ضد دردی القاء شده توسط استرس آزمایش های رفتاری میان ساعت ۷ تا ۱۰ صبح انجام شد (۱۸).

### آزمون هات پلیت

برای اندازه گیری تغییر آستانه درد حرارتی (هایپرآلژیای حرارتی) از آزمون هات پلیت استفاده شد. این آزمون بر اساس روش والف و مکدونالد انجام گرفت (۱۹). برای انجام این آزمون، از دستگاه هات پلیت مدل ام اچ - ۹۵۰۰ ساخت شرکت برج صنعت آزما، که دارای یک صفحه

پاسخ در نظر گرفته می شد. هر آزمایش سه بار و به تناوب حداقل سه دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید (۲۰).

#### پروتکل تمرین هوازی

پس از اطمینان از حصول نوروپاتی دیابت در موش‌های صحرایی نر، پروتکل تمرین هوازی به مدت شش هفته اجرا شد. در پژوهش حاضر پروتکل تمرین هوازی بر اساس مطالعه چانگ هوان و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت؛ ابتدا به منظور خوگیری به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دستکاری حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بروی نوار گردان راه رفتند. سپس گروه‌های ورزشی نوروپاتی دیابت تمرین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین در معرض تمرین نوارگردان، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند (۲۱). سرعت و مدت تمرین نوارگردان هر هفته به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۴ تا ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم و ۱۷ تا ۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم و ششم افزایش یافت. جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شد. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶-۱۸ عصر برگزار شد.

#### استخراج نمونه و روش اندازه گیری

در پایان شش هفته برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، تحت شرایط استریل و مطابق روش گلدرد و چوپین سال ۱۹۷۷ (۲۲) سریعاً قطعه نخاعی حاوی بخش خلفی نخاع از سطح L4 تا L6، که سگمنت‌های نخاعی مربوطه، در موش‌های نر نژاد ویستار در ناحیه مهره‌های T13-L1 ستون فقرات است، ابتدا ناحیه مورد نظر مشخص گشت و با برش در پائین‌ترین بخش ممکن از ستون فقرات جدا شد. سپس ستون فقرات با استفاده از

فلزی به قطر ۱۹ سانتی متر و محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس (۲۵×۲۵×۳۰ سانتی متر) استفاده شد. دستگاه مجهز به زمان سنج و ترموستات بود. شدت درجه گرمایی صفحه دستگاه در  $52 \pm 2$  درجه سانتی گراد تنظیم شد. قبل از انجام آزمون، برای آشنایی، موش‌ها را به مدت ۲ دقیقه بر روی صفحه دستگاه قرار داده شد؛ سپس دستگاه روشن شد تا دمای صفحه دستگاه به دمای مورد نظر ثابت شود. حیوان بر روی صفحه داغ قرار گرفت و همزمان با آن، زمان سنج دستگاه روشن شد. زمانی که حیوان شروع به لیسیدن، بالا بردن و یا لرزیدن پا کرد، به عنوان نقطه پایانی و شاخص احساس درد تلقی شد و فوراً زمان سنج متوقف و حیوان از دستگاه خارج می شد. مدت زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه (Paw withdrawal latency) و یا فاصله زمانی شروع قرار گرفتن حیوان بر روی صفحه داغ تا پیدایش پاسخ به درد توسط حیوان، در سه مرحله و به فاصله ۵ دقیقه در گروه‌های مختلف بر حسب ثانیه اندازه گیری شد. و میانگین آنها به عنوان زمان تأخیر ثبت گردید. زمان عدم واکنش حیوان به صفحه داغ ۳۰ ثانیه (Cut of time) در نظر گرفته شد.

#### آزمون آلودینیای مکانیکی

به منظور اندازه گیری، حیوان روی یک شبکه سیمی و داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و روی صفحه مشبک قرار گرفتند. در ادامه به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Frey در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۶، ۶۰) ساخت شرکت Stoelting Inc جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع می شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده می گردید. همچنین چنانچه دو بار متوالی پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می گردید. همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه<sup>۱</sup> (PWT) ثبت می شد و آزمون خاتمه می یافت. در مقابل، اگر حیوان به هیچ یک از تارها از جمله تار شماره ۶۰ پاسخ نمی داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه

<sup>۱</sup> - Paw withdrawal threshold

ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول  $R = 2^{-\Delta\Delta CT}$  میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمر های مورد استفاده در پژوهش حاضر

Gens	Primer sequence
GDNF	For: 5'-GCC ACC ATC AAA AGA CTG AAA AG-3' Rev: 5'-GCT TGC CTG TTC CTC TCT CT-3'
GAPDH	For: 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3' Rev: 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

همچنین برای ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو، بافت مربوطه، به وسیله ترازو دیجیتال سارتریوس مدل CPA224S با دقت هزارم میلی گرم، وزن کشتی و میزان mg ۵۰ جدا و پس از اضافه نمودن بافر فسفات سالین (PBS) حاوی آنتی پروتئاز سیگما به نسبت ۱:۱۰ با استفاده از هموژنایزر، هموژنه شده و پس از آن نمونه ها در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش شاخص های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو؛ غلظت مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز توسط کیت های مخصوص شرکت زلیبو، ساخت کشور آلمان و به روش اسپکتروفوتومتری<sup>۳</sup> و رنگ سنجی استفاده شد.

### روش آماری

جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف<sup>۴</sup> استفاده شد. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت معنی داری، جهت تعیین تفاوت بین میانگین‌های دو گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-22 در سطح معنی داری ۰/۵ (P<0.05) انجام شد.

کانال مرکزی به عنوان شاخص، به بخش قدامی و خلفی تفکیک شد و بخش خلفی نخاع در ناحیه مربوطه را به عنوان نمونه، در نیتروژن ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد و نمونه ها تا زمان انجام آزمایش های ملکولی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### ریل تایم<sup>۱</sup>

حدود ۵۰ میلی گرم از بافت نخاع جهت استخراج RNA کل به نسبت ۱ به ۱۰ با استفاده از کیت QIAzol Lysis Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول در دمای ۴ سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با محلول کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت یک به نیم با محلول ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ده دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در محلول اتانول شستشو و در ۲۰ μL آب RNase-free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد طبق شرکت (Eppendorf - Germany) و به نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تلخیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligo dt MWG-Biotech, (Germany) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن GDNF به صورت کمی استفاده شد، هر واکنش PCR با استفاده از دستگاه (PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند.

<sup>2</sup> - Threshold Cycle

<sup>3</sup> - Spectrophotometry

<sup>4</sup> - Kolmogorov-Smirnov test

<sup>1</sup> - Real Time-PCR

## نتایج

( $P < 0.05$ ). همچنین، میانگین تغییرات وزن گروه‌های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت، در هفته هشتم افزایش معنادار داشتند ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲).

نتایج نشان داد که وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت، اما در هفته‌های پایانی پژوهش، میانگین تغییرات وزن موش‌های گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه کنترل سالم به صورت معناداری کمتر بود

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

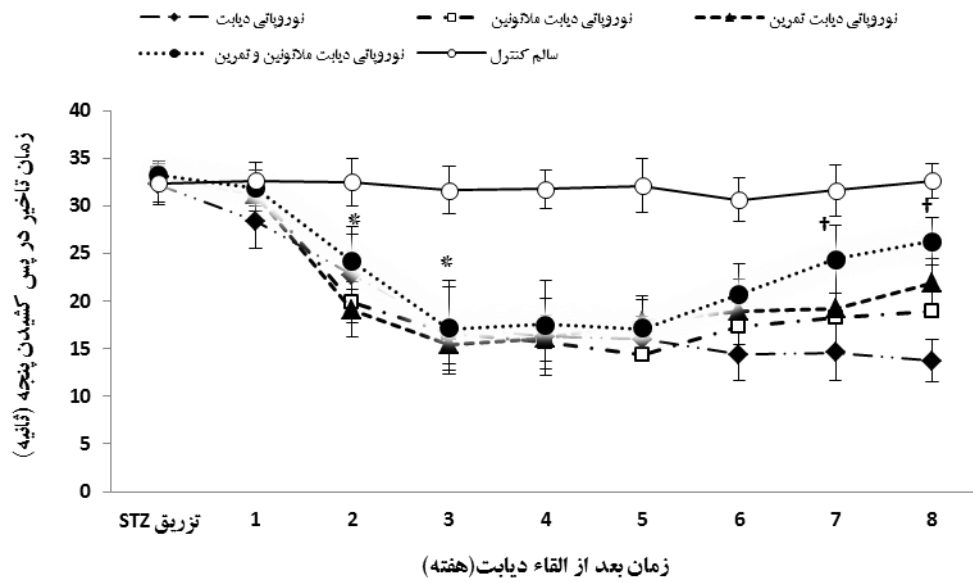
گروه‌ها						متغیر
کنترل سالم (n=8)	نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین (n=8)	نوروپاتی دیابت تمرین (n=8)	نوروپاتی دیابت ملاتونین (n=8)	نوروپاتی دیابت (n=8)	نوروپاتی دیابت (n=8)	
۲۰۶/۸±۱۱/۴	۱۹۸/۸±۹/۱	۲۱۰/۶±۹/۶	۲۰۴/۶±۱۱/۵	۲۰۵/۴±۱۳/۱	القا دیابت	وزن (گرم)
۲۱۴/۶±۱۱/۱	۱۹۴/۵±۱۳/۵	۲۰۳/۳±۸/۷	۱۹۶/۱±۱۲/۲	۱۹۸/۰±۱۰/۲	هفته دوم	
۲۲۹/۳±۹/۱	۱۸۴/۴±۷/۳	۱۸۷/۴±۶/۹	۱۸۵/۶±۱۲/۱	۱۸۵/۵±۱۰/۴	هفته چهارم	
۲۴۲/۸±۸/۱	۱۶۸/۰±۷/۹*	۱۸۶/۰±۶/۴*	۱۸۸/۵±۱۱/۳*	۱۶۰/۱±۸/۱*	هفته ششم	
۲۵۸/۵±۹/۸	۲۰۱/۸±۱۰/۹†	۲۱۰/۴±۹/۸†	۲۰۶/۴±۱۰/۷†	۱۴۱/۰±۷/۴*	هفته هشتم	
۱۰۶/۸±۱۳/۸	۴۵۴/۵±۱۱۰/۸*	۴۹۵/۱±۷۱/۶*	۴۶۳/۹±۹۴/۳*	۴۲۱/۹±۱۱۳/۱*	القا دیابت	گلوکز خون (میلی مول لیتر)
۱۰۸/۱±۱۳/۸	۵۲۹/۳±۸۳/۱	۵۲۲/۴±۵۷/۹	۵۲۳/۶±۷۵/۱	۴۶۵/۴±۸۱/۱	هفته دوم	
۱۰۲/۱±۱۴/۱	۴۹۵/۵±۹۴/۹	۵۲۲/۴±۳۴/۸	۵۱۹/۵±۶۷/۳	۵۱۵/۹±۶۱/۳	هفته چهارم	
۱۰۱/۶±۱۳/۳	۴۰۳/۶±۵۶/۵	۴۳۴/۵±۵۵/۱	۴۶۹/۴±۶۱/۳	۵۶۳/۴±۴۱/۰	هفته ششم	
۱۰۴/۳±۱۷/۷	۳۶۷/۹±۷۳/۹†	۳۵۵/۳±۶۰/۸†	۴۳۰/۹±۸۹/۲†	۶۰۱/۹±۲۴/۱†	هفته هشتم	

کلیه مقادیر جدول به صورت انحراف استاندارد  $\pm$  میانگین می باشند. \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ( $P < 0.05$ ). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ( $P < 0.05$ ).

**withdrawal latency** در آزمون هات پلیت دو هفته پس از القاء دیابت در گروه‌های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین در هفته‌های پایانی اجرای پروتکل تمرین هوازی و مکمل ملاتونین، میانگین مدت زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی در گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به طور معنی داری بیشتر بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱).

پس از القاء دیابت، سطوح گلوکز خون به صورت معناداری در گروه‌های نوروپاتی دیابت افزایش یافت ( $P < 0.05$ )، و این اختلاف تا پایان دوره پژوهش در مقایسه با گروه کنترل سالم همچنان معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). همچنین، در پایان برنامه تمرینی و مکمل دهی، غلظت گلوکز خون گروه نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت به صورت معناداری پایین تر بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱).

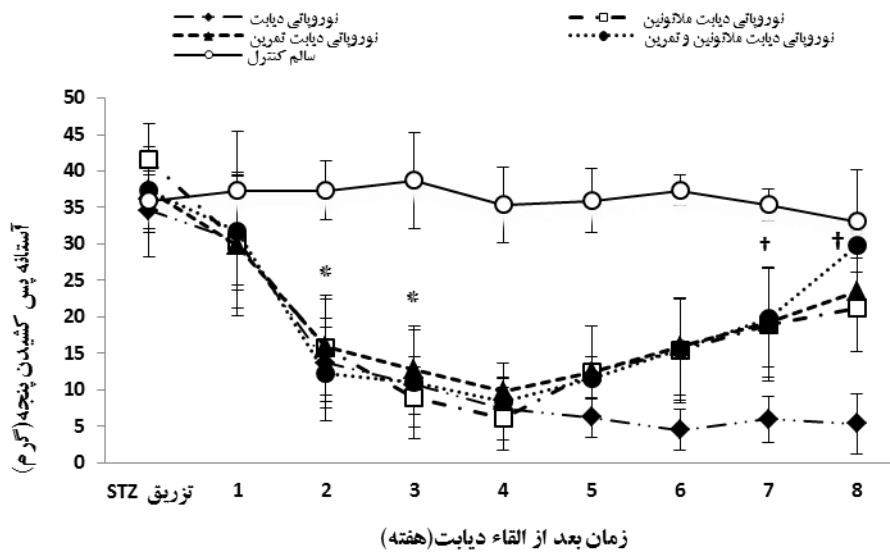
میانگین مدت زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه (**Paw**)



نمودار ۱. تغییرات زمان تاخیر در پس کشیدن پنجه در آزمون هایپرآلترزای حرارتی گروه های مختلف \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل  $P < 0.05$ . † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی  $P < 0.05$

در گروه های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی ملاتونین و تمرین افزایش معنی داری نسبت به گروه نوروپاتی دیابت داشتند ( $P < 0.05$ ). (نمودار ۲).

دو هفته بعد از القاء دیابت، میانگین تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینبای مکانیکی در گروه های نوروپاتی دیابت نسبت به گروه های سالم به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ). از طرفی در هفته های پایانی اجرای پروتکل، میانگین تغییرات آزمون آلودینبای مکانیکی

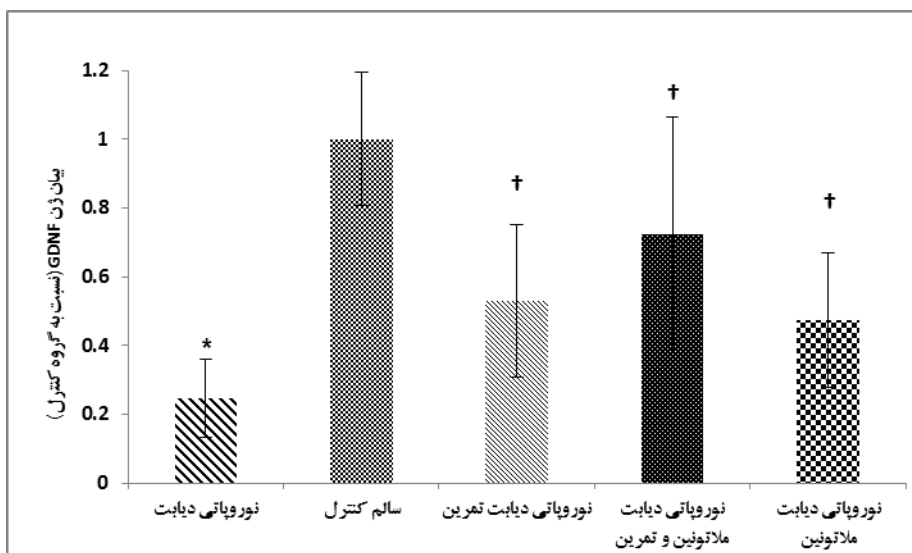


نمودار ۲. تغییرات آستانه پس کشیدن پنجه در آزمون آلودینبای مکانیکی گروه های مختلف \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل  $P < 0.05$ . † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی  $P < 0.05$



به گروه نوروپاتی دیابت بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین بین گروه‌های نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین به تنهایی و گروه نوروپاتی دیابت تمرین و ملاتونین به طور همزمان تفاوت معنی داری وجود نداشت ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۳).

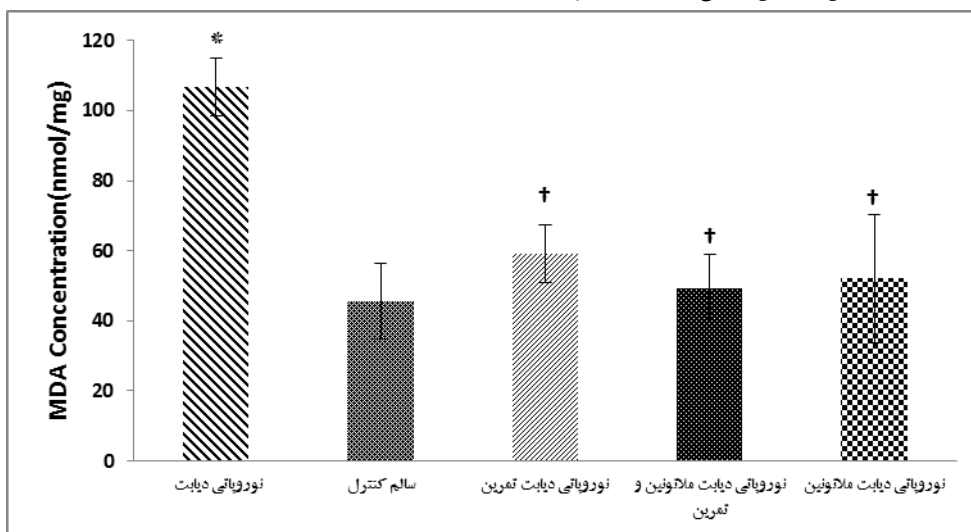
با توجه به میانگین گروه ها، مشخص شد که القاء دیابت موجب کاهش معنادار در میزان بیان ژن **GDNF** موش های نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه سالم کنترل شد ( $P < 0.05$ ). همچنین میزان بیان ژن **GDNF** در گروه های نوروپاتی دیابت ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین به طور معناداری نسبت



نمودار ۳. میزان بیان ژن **GDNF** در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ( $P < 0.05$ ). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ( $P < 0.05$ )

نوروپاتی ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به با گروه نوروپاتی دیابت وجود داشت ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۴).

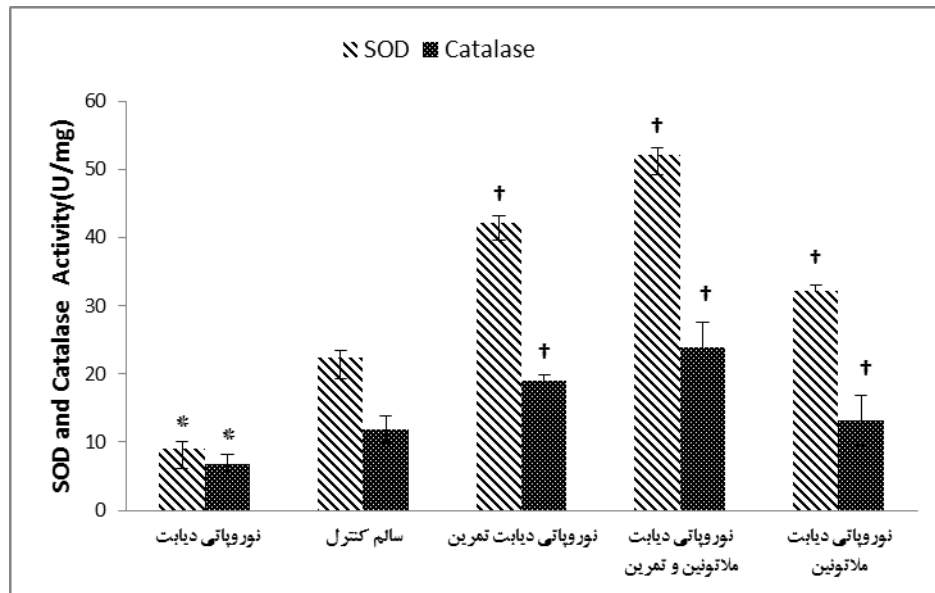
افزایش معنی داری در میزان غلظت محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدئید در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابتی در مقایسه با گروه سالم کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). همچنین کاهش معنی داری در گروه



نمودار ۴. میزان غلظت مالون دی آلدئید در بخش خلفی نخاع گروه‌های مختلف \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ( $P < 0.05$ ). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ( $P < 0.05$ )

ملاتونین، نوروپاتی دیابت تمرین و نوروپاتی دیابت ملاتونین و تمرین نسبت به گروه نوروپاتی دیابت مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۵).

میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه نوروپاتی دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین افزایش معنی داری در بین گروه نوروپاتی دیابت



نمودار ۵. میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بخش خلفی نخاع گروه های مختلف \* اختلاف معنی دار با گروه سالم کنترل ( $P < 0.05$ ). † اختلاف معنی دار با گروه نوروپاتی دیابتی ( $P < 0.05$ ).

## بحث

اعصاب محیطی است که در آن آستانه فعالیت نورون های هدایت کننده درد کاهش می یابد و این عامل در نتیجه انحطاط آکسون های دیستال یا اختلال عملکرد در میلین دار کردن سلول های شوان ایجاد می شود (۳). سلول های شوان منبع اصلی تولید نروتروفین ها از جمله GDNF هستند (۲۴). مطالعات نقش GDNF را در درد نوروپاتی دیابت نشان داده اند (۲۵). GDNF باعث تمایز، تکثیر و تشکیل میلین در آکسون ها بعد از آسیب عصبی می شود. همچنین فعال شدن مسیر سیگنالینگ GDNF منجر به افزایش نسخه برداری از ژن های می شود که در فرایند ترمیم یا بازتولید یا جایگزینی بافت های از دست رفته یا آسیب دیده عصبی در نتیجه هایپرگلیسمی، از طریق نوسازی طبیعی آکسون نورون های عصبی نقش دارد. محققین بر این باوراند که حفاظت نورون ها در برابر سیگنال های مرگ یکی از استراتژی های مهم برای مقابله با بروز و پیشرفت نورودژنراتیو ناشی از دیابت است (۲۶). منابع ایجاد سیگنال های مرگ نورونی را می توان در دو

در پژوهش حاضر اثر تمرین هوازی و مصرف ملاتونین برونزا بر بیان ژن نروتروفین GDNF و شاخص های استرس اکسیداتیو در موش های مبتلا به درد نوروپاتی دیابت مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد، بیان این ژن در نتیجه تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل ملاتونین در گروه نوروپاتی دیابت تمرین، نوروپاتی دیابت ملاتونین و نوروپاتی دیابت تمرین و ملاتونین در مقایسه با گروه نوروپاتی دیابت افزایش یافته و این افزایش معنی دار بوده است. همچنین نتایج تحلیل آماری نشان داد که بین گروه های تمرین هوازی و مصرف مکمل ملاتونین به تنهایی و گروه تمرین به همراه تزریق ملاتونین تفاوت معنی داری وجود ندارد. نروتروفین ها گروهی از پروتئین ها هستند که بقاء عصبی، نورون زایی، رشد آکسونی و تشکیل سیناپس را ارتقاء می دهند (۲۳). پژوهش های مدل حیوانی و انسانی نشان داده اند که کمبود و نقص عوامل نروتروفیکی و گیرنده های آنها در پیشرفت درد نوروپاتی دیابت دخیل هستند (۴). درد نوروپاتی یکی از اختلالات

نوروپاتی دیابت است. نتایج ما نشان داد که فعالیت هوازی متعاقب ایجاد درد نوروپاتی موجب کاهش حساسیت سیستم عصبی به محرک های دردناک (هایپرالژزیا حرارتی) و بدون درد (آلودینیای مکانیکی) در آزمون های رفتاری شد. مکانیسم دقیق هایپرالژزیا متعاقب فعالیت های هوازی به طور دقیق معلوم نیست ولی اعتقاد بر این است بافت عصبی دارای سیستم آنتی اکسیدانی ضعیفی است و به دلیل مصرف اکسیژن بالا در معرض آسیب های اکسیداتیو قرار می گیرد از طرفی استرس اکسیداتیو مسیر مشترک آسیب های سلولی در نتیجه هایپر گلیسمی است (۲۹). فعالیت هوازی به واسطه مهار آنزیم های اکسیداتیو و همچنین افزایش بیان نوروتروفین ها بخصوص GDNF به علت اثرات آنتی اکسیدانی منجر به بهبود دفاعی درون سلول علیه ROS شده و از این طریق فشار اکسایش سلول های عصبی کاهش می یابد (۲۶). تحقیقات همچنین نشان داده اند که تمرین هوازی با بیورژنر میتوکندریایی در نورون ها، ظرفیت آنتی اکسیدانی را افزایش و عوامل اکسایشی را کاهش می دهد (۳۴). اخیراً ماده ملاتونین به عنوان آنتی اکسیدانی قوی مورد توجه قرار گرفته است. ملاتونین به واسطه مهار آنزیم های اکسیداتیو به طور گسترده در درمان نوروپاتی دیابت به کار می رود. ملاتونین از طریق اتصال به رسپتور های M1 و M2 و کاهش تولید CAMP، مهار سیکلواکسیژنازها، تحریک بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیدانی و مهار تولید رادیکال های آزاد باعث توقف پروسه التهابی می شود و از این طریق باعث افزایش آستانه درد در افراد دیابتی می شود (۹). با توجه به نتایج تحقیق حاضر، گروه های نوروپاتی دیابتی که ملاتونین مصرف کرده بودند، افزایش معنی داری در میزان بیان ژن GDNF و فعالیت آنزیم های SOD و CAT و کاهش غلظت MAD نسبت به گروه نوروپاتی دیابت داشتند. در ارتباط با شناسایی مکانیسم های درگیر در اثرات تجویز مکمل ملاتونین می توان استدلال کرد که ملاتونین با فعال کردن رسپتورهای اپیوئیدی، افزایش سطوح سایتوکین های ضد التهابی و کاهش سطوح رادیکال های آزاد توانسته است، سطوح نشانگرهای التهابی را کاهش دهد (۳۵،۳۶) و از تخریب پیشرونده عروق خون رسان به نورون های حسی جلوگیری کند و از این طرق باعث افزایش سطوح

گروه التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو دسته بندی کرد (۲). نتایج نشان داده اند که GDNF اثر حفاظتی بر نورون های دیابتی در مقابل فاکتور های التهابی و رادیکال های آزاد دارد (۲۷،۲۸). التهاب عصبی و عدم تعادل بین آنتی اکسیدان ها آندروژنیک و رادیکال های آزاد در دیابت منجر به کاهش نفوذپذیری مویرگی، انقباض عروقی، ضخیم سازی غشاء پایه و تکثیر اندوتلیال عروقی می شوند و در نتیجه آن ایسکمی نورونی ناشی از کاهش جریان خون عروق عصبی رخ می دهد، این عوامل در کاهش حمایت نوروتروفیکی، اختلال هدایت عصبی و آتروفی آکسونی نقش دارند (۲۹،۳۰). بنابراین، بررسی گزینه های درمانی با رویکرد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی که منجر به کاهش روند پیشرفت آسیب های نورونی در دیابت شود، ضروری به نظر می رسد. علی رغم تمام روش های درمانی دارویی که تاکنون ارائه شده (داروهای ضد درد غیراستروئیدی، اپیوئیدها) نه تنها هیچ کدام از آنها در درمان یا جلوگیری از پیشرفت درد نورپاتیک دیابتی به طور کامل موثر نبوده اند بلکه دارای عوارض جانبی نیز بوده است (۳). از این رو به کارگیری روش هایی که دارای هیچ عارضه جانبی نباشد یا دارای حداقل عوارض جانبی باشد دارای اهمیت است. تحقیقات متعددی نشان داده اند که فعالیت جسمانی شکل پذیری نورونی را بهبود می بخشد و این عامل را در نتیجه افزایش تولید فاکتور های رشد عصبی نوروتروفیک دانسته اند (۳۱). مطالعات، فعالیت ورزشی را یکی از رویکرد های حمایتی و غیر تهاجمی برای ارتقاء نوروزنر، آنژیورژنر و افزایش سطوح نوروتروفین ها می دانند (۳۲). همچنین به نقش فعالیت های جسمانی به توسعه دندریت ها اشاره شده است (۳۳). مطالعات آلمیدا و همکاران مطالعه حاضر را مورد تایید قرار دادند و نشان دادند که ورزش اجباری یا اختیاری سطح نوروتروفین ها را در نواحی مرکزی و محیطی سیستم عصبی حیوانات سالم و دچار بیماری را افزایش می دهد (۳۲). تصور بر این است که افزایش سطح نوروتروفین ها در نتیجه فعالیت های جسمانی ممکن است در بهبود وضعیت درد نوروپاتیک نقش داشته باشد. بنابراین در مطالعه حاضر تمرکز بر نقش نوروتروفین GDNF بر بازیابی عملکرد حسی به دنبال ضایعه درد

### نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش بیان ژن GDNF در بخش حسی نخاع شده و این عامل منجر به درد نوروپاتی دیابت می شود. با این حال شش هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل ملاتونین به صورت همزمان و به تنهایی توانسته است این کاهش را تا حدودی جبران کند. لذا پیشنهاد می شود با توجه به اینکه درد نوروپاتیک دیابت به شدت کیفیت زندگی فرد را مختل می کند و نیز با توجه به عدم کارایی قطعی روش های فارماکولوژی معمول که دارای عوارض جانبی زیادی می باشند، تغییر سبک زندگی روزانه به شکل فعالیت منظم هوازی ممکن است به عنوان یک هدف درمانی بدیع در بیماران درد نوروپاتی دیابت مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به اثبات غیر سمی بودن ملاتونین، می توان از آن با اطمینان به عنوان گزینه ای برای جلوگیری از بروز پیشرفت درد نوروپاتی دیابتی به همراه فعالیت های هوازی مورد استفاده قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از یافته های پایان نامه کارشناسی ارشد خانم مرضیه کریمی دانشجوی رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش تغذیه ورزشی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز است. کلیه هزینه های این طرح شخصی تامین شده است.

### تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

نوروتروفین بخصوص GDNF در سلول های عصبی شده و حساسیت نوسیسپتورها به عوامل دردزا را کاهش دهد (۳۷). شواهد زیادی این نتایج را مورد تایید و نشان دادند که ملاتونین عوارض ناشی از دیابت را به وسیله فعالیت های بیولوژیکی شامل آنتی اکسیدانی و ضد التهابی کاهش می دهد (۳۸). همچنین تحقیقات حاکی از موثر بودن ملاتونین بر فعالیت و نیز شکل پذیری سیناپسی نورون های نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی است (۱۵،۳۹). در این پژوهش اثر همزمان تمرین هوازی و مصرف ملاتونین بر میزان بیان ژن GDNF نسبت به گروه های تمرین و ملاتونین به تنهایی در گروه های نوروپاتی دیابت افزایش داشت ولی از نظر آماری معنی دار نبود. این احتمال وجود دارد که سلول های عصبی، در نتیجه تمرین و تجویز همزمان ملاتونین به حداکثر ظرفیت پتانسیل عملکردی آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود رسیده باشند و اثر سینرژیکی تجویز همزمان این دو روش نتوانسته است تفاوت محسوسی در ساختار نورون های حسی نسبت به تجویز به تنهایی به وجود بیاورد. از طرفی آسیب عصبی ناشی از دیابت مزمن منجر به تغییرات پایداری در ساختار نورون های حسی سیستم عصبی محیطی شده است که تجویز همزمان ملاتونین و تمرین قادر نبوده که به طور کامل تارهای عصبی حسی را باسازی کرده و آنها را به حالت نرمال نزدیک کند. بنابراین پیشنهاد می شود در پژوهش های آتی، برای دستیابی به شرایط قطعی تر به جای اندازه گیری بیان ژن، سطوح پروتئین GDNF، سطوح رسپتور این لیگاند، سایتوکین های پیش التهابی و همچنین سایر نوروتروفین ها دخیل در باسازی نورون های حسی را مورد بررسی قرار دهند.

### منابع

1. Feldman EL, Nave K-A, Jensen TS, Bennett DL. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron* 2017;93(6):1296-313.
2. Sloan G, Shillo P, Selvarajah D, Wu J, Wilkinson ID, Tracey I, et al. A new look at painful diabetic neuropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2018;144:177-91.
3. Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes* 2015;6(3):432.

4. Khan N, Smith MT. Neurotrophins and neuropathic pain: role in pathobiology. *Molecules* 2015;20(6):10657-88.
5. Brewster WJ, Fernyhough P, Diemel LT, Mohiuddin L, Tomlinson DR. Diabetic neuropathy, nerve growth factor and other neurotrophic factors. *Trends in Neurosciences* 1994;17(8):321-5.
6. Mitroshina E V, Mishchenko TA, Shirokova OM, Astrakhanova TA, Loginova MM, Epifanova EA, et al. Intracellular neuroprotective mechanisms in neuron-glia networks mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019(2-3):1-15.
7. Akkina S, Patterson C, Wright D. GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice. *Experimental Neurology*. 2001;167(1):173-82.
8. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004;9(1):26-53.
9. Metwally MM, Ebraheim LL, Galal AA. Potential therapeutic role of melatonin on STZ-induced diabetic central neuropathy: A biochemical, histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Histochemica* 2018;120(8):828-36.
10. Safakhah HA, Kor NM, Bazargani A, Bandegi AR, Pourbadie HG, Khoshkholgh-Sima B, et al. Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation. *Journal of Pain Research* 2017;10:1457.
11. Dobson JL, McMillan J, Li L. Benefits of exercise intervention in reducing neuropathic pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014;8:102.
12. Yan J-e, Yuan W, Lou X, Zhu T. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. *Neuroscience Letters* 2012;526(1):54-8.
13. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Current Protocols in Neuroscience* 2004. DOI:10.1002/0471142301.ns0918s29
14. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung & Circulation* 2003;12(1):44-50.
15. Zangiabadi N, Sheibani V, Asadi-Shekaari M, Shabani M, Jafari M, Asadi AR, et al. Effects of melatonin in prevention of neuropathy in STZ-induced diabetic rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2011;6(2):59-67.
16. Malmberg AB, Bannon AW. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current Protocols in Neuroscience* 2007;8-9(8).
17. Chen Y-W, Hsieh P-L, Chen Y-C, Hung C-H, Cheng J-T. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesthesia & Analgesia* 2013;116(2):482-90.
18. Yoon H, Thakur V, Isham D, Fayad M, Chattopadhyay M. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Experimental Neurology* 2015;267:107-14.
19. Rossi DM, Valenti VE, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clinics* 2011;66(9):1615-9.
20. Gong Y-H, Yu X-R, Liu H-L, Yang N, Zuo P-P, Huang Y-G. Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced

- diabetic rats. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2011;49(1):16-20.
21. Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2011;67(2):235-41.
  22. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *The Anatomical Record* 1977;188(1):45-7.
  23. Sun Q, Tang D-D, Yin E-G, Wei L-L, Chen P, Deng S-P, et al. Diagnostic significance of serum levels of nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor in diabetic peripheral neuropathy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2018;24:5943.
  24. Xu P, Rosen KM, Hedstrom K, Rey O, Guha S, Hart C, et al. Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (gdnf) expression in schwann cells through purinergic signaling and the pkc-pkd pathway. *Glia* 2013;61(7):1029-40.
  25. Sidorova YA, Bernalov MM, Wong AW, Kambur O, Jokinen V, Lilius TO, et al. A novel small molecule GDNF receptor RET agonist, BT13, promotes neurite growth from sensory neurons in vitro and attenuates experimental neuropathy in the rat. *Frontiers in Pharmacology* 2017;8:365.
  26. Farmer K. The effect of voluntary exercise on neuropathic pain: University of Kansas; 2010.
  27. Boss JD, Singh PK, Pandya HK, Tosi J, Kim C, Tewari A, et al. Assessment of neurotrophins and inflammatory mediators in vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2017;58(12):5594-603.
  28. Wang Z, Li S, Wang Y, Zhang X, Chen L, Sun D. GDNF enhances the anti-inflammatory effect of human adipose-derived mesenchymal stem cell-based therapy in renal interstitial fibrosis. *Stem Cell Research* 2019;41:101605.
  29. Hosseini A, Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013;2013:168039. doi: 10.1155/2013/168039.
  30. Leung L, Cahill CM. TNF- $\alpha$  and neuropathic pain—a review. *Journal of Neuroinflammation* 2010;7(1):1-11.
  31. Groover AL, Ryals JM, Guilford BL, Wilson NM, Christianson JA, Wright DE. Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with prediabetes in mice. *Pain* 2013;154(12):2658-67.
  32. Almeida C, DeMaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Queiroz AL, et al. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2015;156(3):504-13.
  33. Cooper MA, Kluding PM, Wright DE. Emerging relationships between exercise, sensory nerves, and neuropathic pain. *Frontiers in Neuroscience* 2016;10:372.
  34. Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, et al. PGC-1 $\alpha$  plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2010;298(3):C572-C9.
  35. Chen S-J, Huang S-H, Chen J-W, Wang K-C, Yang Y-R, Liu P-F, et al. Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Immunopharmacology* 2016;31:169-77.
  36. Elbe H, Esrefoglu M, Vardi N, Taslidere E, Ozerol E, Tanbek K. Melatonin, quercetin and resveratrol attenuates oxidative hepatocellular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Human &*

- Experimental Toxicology 2015;34(9):859-68.
- 37.Ogłodek EA, Just MJ, Szromek AR, Araszkiwicz A. Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity. Pharmacological Reports 2016;68(5):945-51.
- 38.Muhammad T, Ali T, Ikram M, Khan A, Alam SI, Kim MO. Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. Journal of Neuroimmune Pharmacology 2019;14(2):278-94.
- 39.Babaei BF, Zare S, Heydari R, Farokhi F. Effects of melatonin and vitamin E on peripheral neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic rats 2010 (13)2:1-8.