

تأثیر ورزش با تردمیل بر پروتئین‌های ناقل گلوتامات و فعالیت استیل کولین‌استراز قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرائی دیابتی

مسلم محمدی* (Ph.D)

گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۴

mohammadimo@yahoo.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۳۵۴۳۰۸۱

چکیده

هدف: تغییرات عملکرد سیستم‌های نوروترانسمیتری مغز می‌تواند در بروز اختلالات عصبی ناشی از دیابت قندی نقش داشته باشد. برای تعیین اثرات دیابت قندی و فعالیت فیزیکی بر سیستم‌های گلوتاماترژیک و کولینرژیک مغز، سطوح پروتئین‌های ناقل گلوتامات و فعالیت استیل کولین‌استراز (AChE) قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرائی دیابتی با/بدون تمرین تردمیل بررسی شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه از موش‌های صحرائی نر بالغ نژاد ویستار (۵ سر در هر گروه) استفاده شد. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) القاء شد. حیوانات کنترل بافر سیترات ۱/۱ مولار را به عنوان حامل دریافت کردند. پس از ۱۴ روز، حیوانات به طور تصادفی به دو گروه بدون ورزش و با ورزش تقسیم شدند. حیوانات گروه‌های ورزش به مدت ۴ هفته (۵ روز در هفته) با تردمیل تمرین کردند. سپس حیوانات قربانی شدند و قشرهای پره‌فرونتال برای اندازه‌گیری سطح پروتئین‌های ناقل آستروسیتی (GLAST و GLT-1) و نورونی (EAAC1) گلوتامات و فعالیت استیل کولین‌استراز جدا شدند. یافته‌ها: حیوانات در گروه دیابتی سطوح GLAST بالاتر و EAAC1 پایین‌تری ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل داشتند، در حالی که سطح GLT-1 بدون تغییر باقی ماند. در ضمن، کاهش معنی‌دار فعالیت AChE در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$). ورزش تردمیل باعث کاهش سطح GLAST ($P < 0.05$) و افزایش سطح EAAC1 و فعالیت AChE به سطوح نرمال در گروه دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم تأثیر معنی‌دار بر سطح بالای GLAST، تمرین با تردمیل توانست کاهش پروتئین EAAC1 و فعالیت استیل کولین‌استراز مشاهده شده در قشر پره‌فرونتال حیوانات دیابتی را به حد کنترل بازگرداند.

واژه‌های کلیدی: دیابت قندی، ورزش، ناقلین گلوتامات، قشر پره‌فرونتال، استیل کولین‌استراز

مقدمه

دیابت قندی بیماری متابولیک رایجی است که با سطح بالای گلوکز خون به دلیل نقص در ترشح انسولین پانکراس یا اختلال در پاسخ سلولی به انسولین (مقاومت به انسولین) مشخص می‌شود [۱]. شیوع جهانی دیابت در حال افزایش است و تخمین زده می‌شود از ۱۰/۵ درصد (۵۳۶/۶ میلیون نفر) در سال ۲۰۲۱ به ۱۲/۲ درصد (۷۸۳/۲ میلیون نفر) در سال ۲۰۴۵ افزایش یابد. با افزایش شیوع دیابت، پیش‌بینی می‌شود هزینه‌های بهداشت جهانی مرتبط با دیابت نیز از حدود ۹۶۶ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ به ۱۰۵۴ میلیارد دلار در سال ۲۰۴۵ برسد [۲]. خطر بالای ابتلا به اختلالات شناختی و خلقی در بیماران مبتلا به دیابت در مطالعات انسانی و حیوانی مختلف نشان داده شده است [۳-۵]. اثرات نوروتوکسیک هیپرگلیسمی [۶،۷]، تغییرات سیستم‌های نوروترانسمیتری مغز شامل سیستم‌های کولینرژیک

[۸]، گلوتاماترژیک، گاباژژیک [۹] و دوپامینرژیک [۱۰] و تخریب اتصالات شکاف‌دار بین آستروسیت‌ها با اختلال در ترافیک متابولیت‌ها و مولکول‌های پیام‌رسان [۱۱] می‌تواند در بروز اختلالات شناختی و خلقی ناشی از دیابت نقش داشته باشد.

گلوتامات به عنوان مهم‌ترین نوروترانسمیتر تحریکی مغز نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله حافظه، یادگیری و فرایند اضطراب دارد [۱۲]. گیرنده‌های مختلف گلوتامات در سطح سلول‌های عصبی حضور دارند و ناقلین نورونی و آستروسیتی گلوتامات با برداشت گلوتامات و تعیین سطح آن در فضای سیناپسی مانع فعالیت بیش از حد گیرنده‌ها می‌شوند. پنج ایزوفرم ناقل اسید آمینه تحریکی (Excitatory amino acid transporter: EAAT) در پستان‌داران شناسایی شده است (EAAT1-5). EAAT1 و EAAT2 بر روی غشاء

تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری می‌شدند. تمامی آزمایشات حیوانی با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.REC.1397.3010) صورت گرفت.

روش القاء دیابت. برای ایجاد مدل دیابت نوع یک، حیوانات تک دوز 60 mg/kg استریتوزوتوسین (Santa-Cruz) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. به حیوانات گروه کنترل بافر سترات 0.1 مولار (pH 4.5) به عنوان حامل تزریق شد. سه روز بعد از تزریق استریتوزوتوسین، قند ناشتای خون (FBS) با استفاده از گلوکومتر (Accu-Check، آلمان) از نمونه خون تهیه شده از دم حیوان اندازه‌گیری شد. از ده ساعت قبل از اندازه‌گیری FBS تا زمان اندازه‌گیری، حیوانات به غذا دسترسی نداشتند. حیوانات با FBS بیش‌تر از 300 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان حیوانات دیابتی وارد مطالعه شدند [۲۴].

روش تمرین با تردمیل. چهارده روز پس از تزریق، حیوانات کنترل و دیابتی به صورت تصادفی به دو گروه با و بدون تمرین اجباری با تردمیل تقسیم شدند. تمرین ورزشی به مدت چهار هفته (پنج روز در هفته) و به شکل زیر انجام شد: هفته‌های اول و دوم 30 دقیقه با سرعت 10 متر در دقیقه و هفته‌های سوم و چهارم 30 دقیقه با سرعت 15 متر در دقیقه. هر 15 دقیقه در هر جلسه به حیوان پنج دقیقه استراحت داده می‌شد. به منظور ایجاد شرایط مشابه، حیوانات گروه‌های بدون ورزش نیز به مدت روی تردمیل ثابت قرار می‌گرفتند. بعد از هر جلسه ورزش، تردمیل با محلول اتانول 70 درصد تمیز و خشک می‌شد. با توجه به ضعف عضلانی و به منظور جلوگیری از خستگی و استرس همراه با ورزش در حیوانات دیابتی از یک پروتکل ورزشی با شدت متوسط قابل تحمل در این مطالعه استفاده شد. زمان شروع تمرین ورزشی و مدت و شدت آن بر اساس مطالعه قبلی انتخاب شد [۲۵].

پس از اتمام ورزش، حیوانات به دنبال القاء بی‌هوشی و بی‌دردی با ترکیبات کتامین (80 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) کشته شدند. در ادامه، پس از خارج کردن مغز و جداسازی قشر پره‌فرونتال، نمونه‌های بافتی در نیتروژن مایع قرار گرفتند و تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مورد مطالعه در 80°C - نگهداری شدند.

روش وسترن‌بلات. از قشر پره‌فرونتال راست برای بررسی بیان پروتئین‌های ناقل گلوتامات استفاده شد. نمونه‌ها به طور جداگانه در بافر ریپا هموزن شدند. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها،

آستروسیت‌ها وجود دارد و مسئول اصلی برداشت گلوتامات به حساب می‌آیند، در حالی‌که EAAT3 بر روی غشاء نورون‌ها وجود دارد. EAAT4 و EAAT5 به ترتیب در مخچه و شبکیه بیان می‌شوند. ناقل گلوتامات-آسپاراتات (Glutamate-aspartate transporter: GLAST)، ناقل گلوتامات-1 (GLT-1) (Glutamate transporter-1) و ناقل اسید آمینه تحریکی 1 (Excitatory amino acid carrier 1: EAAC1) به ترتیب همولوگ‌های EAAT1، EAAT2 و EAAT3 در جوندگان هستند. تغییر در تعداد یا عملکرد این ناقلین، خصوصاً ناقلین آستروسیتی، با تعیین غلظت گلوتامات سیناپسی تقریباً در تمامی جنبه‌های فعالیت طبیعی و غیرطبیعی مغز مؤثر است [۱۳-۱۵].

نتایج مطالعه قبلی ما از کاهش یادگیری و حافظه فضایی و افزایش سطح اضطراب موش‌های صحرایی دیابتی به ترتیب در ماز آبی موریس و ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع حکایت داشت. بعلاوه، تمرین با تردمیل توانست منجر به بهبود حافظه فضایی و کاهش سطح اضطراب حیوانات دیابتی شود [۱۶]. برهم کنش سیستم گلوتاماترژیک و ورزش هوازی با تردمیل بر رفتار شبیه اضطرابی در موش‌های صحرایی نیز گزارش شده است [۱۷]. با توجه به نقش سیستم گلوتاماترژیک مغز در کنترل اعمال شناختی و رفتارهای اضطرابی و نقش فعالیت فیزیکی به عنوان یک روش مکمل درمانی غیردارویی در بهبود این اختلالات، در مطالعه حاضر نحوه تغییرات سطوح پروتئین‌های آستروسیتی (GLT-1 و GLAST) و نورونی (EAAC1) ناقل گلوتامات در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد.

سیستم کولینرژیک سیستم عصبی مرکزی نیز اهمیت ویژه‌ای در عملکردهای عالی مغز از جمله فرایندهای یادگیری و حافظه دارد [۱۸]. تقویت اتصالات سیناپسی مرتبط با یادگیری و حافظه و اختلال در رمزگذاری خاطرات جدید، یادگیری فضایی و حافظه کاری به ترتیب به دنبال استفاده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده‌های استیل‌کولین نشان داده شده است [۱۹-۲۲]. آنزیم استیل‌کولین‌استراز از طریق مهار تجزیه استیل‌کولین نقش اصلی را تنظیم غلظت سیناپسی آن به‌عهده دارد [۲۳]. به منظور تعیین اثرات دیابت و فعالیت فیزیکی بر سیستم کولینرژیک مغز، فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فرونتال نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از 20 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (5 سر در هر گروه) در محدوده وزنی 200 تا 230 گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت

میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شدند و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

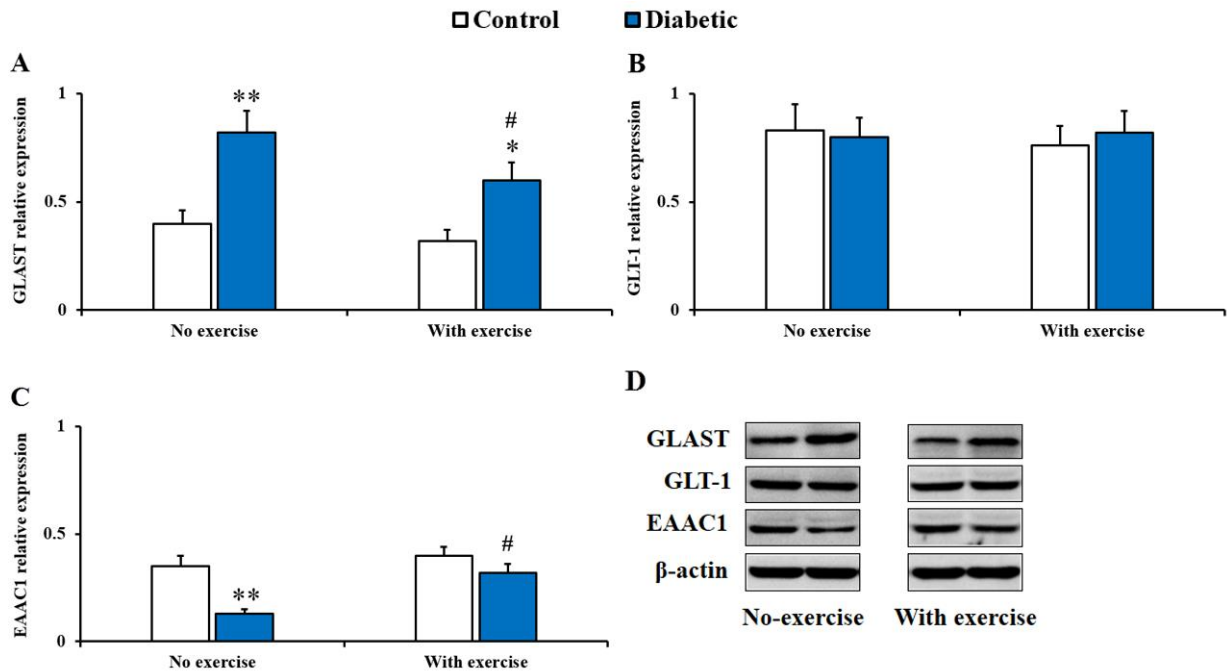
بیان پروتئین‌های آستروسیتی و نورونی ناقل گلوتامات در قشر پره‌فروتال گروه‌های مورد مطالعه توسط وسترن‌بلات اندازه‌گیری شد و بیان نسبی آن‌ها نسبت به بتا-اکتین در شکل ۱ نشان داده شده است. سطح پروتئین GLAST در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) بیش‌تر از گروه کنترل و سطح پروتئین EAAC1 در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) کم‌تر از گروه کنترل بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری در سطح پروتئین GLT-1 بین گروه‌های کنترل و دیابتی مشاهده نشد. تمرین با تردمیل منجر به کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح پروتئین GLAST در گروه دیابتی شد، با این وجود سطح آن همچنان بالاتر از گروه کنترل باقی ماند ($P < 0.05$). به دنبال ورزش، افزایش معنی‌دار سطح پروتئین EAAC1 حیوانات دیابتی اتفاق افتاد و اختلافی بین گروه‌های دیابتی و کنترل وجود نداشت. تمرین با تردمیل اثر معنی‌داری بر سطوح کلیه ناقلین گلوتامات در گروه کنترل و سطح GLT-1 در گروه دیابتی نداشت.

ارزیابی عملکرد سیستم کولینرژیک هیپوکامپ با اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین‌استراز صورت گرفت و نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. فعالیت استیل‌کولین‌استراز در حیوانات دیابتی به طور قابل‌ملاحظه‌ای ($P < 0.05$) کم‌تر از گروه کنترل بود (به ترتیب $78/1 \pm 2/9$ و $91/6 \pm 3/8$ نانومول در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین). علی‌رغم افزایش فعالیت استیل‌کولین‌استراز در گروه‌های دیابتی و کنترل (به ترتیب $89/1 \pm 4/8$ و $95/2 \pm 5/1$ نانومول در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین) به دنبال تمرین با تردمیل، این افزایش تنها در حیوانات دیابتی معنی‌دار بود و توانست سطح فعالیت آن را به حد کنترل برگرداند.

مایع رویی جمع‌آوری و غلظت پروتئین آن با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۲۶]. پروتئین‌های نمونه (۳۰ میکروگرم در هر خط) روی ژل سدیم دودسیل سولفات (SDS) بارگذاری شدند. در ادامه الکتروفورز انجام شد و باندها به غشاء پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) منتقل شدند. پس از بلاک‌غشاهای با آلبومین سرم گاوی ۴ درصد (BSA) در بافر فسفات سالین، انکوباسیون با یکی از آنتی‌بادی‌های اولیه زیر انجام شد: آنتی‌بادی منوکلونال ضد EAAT1 خرگوش (Abcam)، آنتی‌بادی منوکلونال ضد EAAT2 خرگوش (Abcam)، آنتی‌بادی منوکلونال ضد EAAT3 خرگوش (Abcam) و آنتی‌بادی منوکلونال ضد بتا-اکتین موش (Santa-Cruz) به عنوان نرمال‌کننده. در ادامه، بلات‌ها با یکی از آنتی‌بادی‌های ثانویه کوئزوگه با پراکسیداز ضد خرگوش (Abcam) و موش (Bio-Rad) انکوبه شدند. پس از شست‌وشو، باندها با استفاده از کیت تشخیص کمی لومینسنس (پارس توس)، شناسایی و عکس گرفته شد. پس از مشخص شدن دانسیته باندها با استفاده از نرم‌افزار Gene tools، سطح هر یک از ناقلین نسبت به بتا-اکتین نرمالیزه شد [۲۷].

روش اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین‌استراز. به منظور سنجش میزان فعالیت استیل‌کولین‌استراز، بافت‌های قشر پره‌فروتال چپ به طور جداگانه وزن و در بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی تریتون X-100 (۱ درصد) و کلرید سدیم (۱ مولار) با نسبت وزنی حجمی ۱ به ۱۰ هموزن شدند. در ادامه، ۱/۸ میلی‌لیتر بافر ۰/۴۲۳ میلی‌مولار ۵ و ۵- دی‌تیوبیس-۲- نیتروبنزوات (DTNB) را وارد کووت کرده و ۰/۱ میلی‌لیتر هموزن بافتی (۱۰ mg/ml) به آن اضافه نمودیم. پس از اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر استیل تیوکولین (ATC) ۲۰ میلی‌مولار به عنوان سوبسترا، افزایش جذب به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده و فعالیت استیل‌کولین‌استراز هیپوکامپ برحسب نانومول در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محتوای پروتئین نمونه‌های بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۲۸].

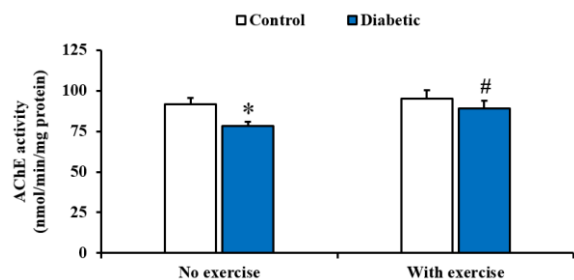
پس از تأیید توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن، از آزمون‌های تعقیبی توکی (Tukey) برای مقایسه بعدی استفاده شد. داده‌ها به صورت



شکل ۱. بیان پروتئین‌های ناقل گلوتامات (A) GLAST، (B) GLT-1 و (C) EAAC1 در قشر پره‌فرونتال گروه‌های مورد مطالعه. باندهای پروتئین توسط وسترن‌بلات اندازه‌گیری و دانسیته آن‌ها نسبت به بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی نرمالیزه شد (D). مقادیر به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شدند (n = 5 rats/group). $P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ** در مقایسه با گروه کنترل مربوطه؛ # $P < 0.05$ در مقایسه با گروه بدون تمرین ورزشی مربوطه.

کاهش قابل ملاحظه سطح ناقل نورونی EAAC1 در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی دیابتی حکایت داشت. در تناقض با یافته‌های ما، عدم تغییر در ناقلین آستروسیتی GLAST و GLT-1 در هیپوکامپ، قشر مغز و مخچه موش‌های صحرایی دیابتی توسط Coleman و همکاران گزارش شده است [۳۷]. در مطالعه‌ای دیگر، کاهش معنی‌دار تعداد GLT-1 در مخچه موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین مشاهده شد [۳۸]. عوامل متعددی، از جمله تفاوت در ناحیه مغزی مورد مطالعه، زمان و روش بررسی ممکن است تا حدودی مسئول این نتایج متناقض باشد.

آستروسیت‌ها از طریق نقش‌های متنوعی که در سیستم عصبی بازی می‌کنند اهمیت زیادی در حفظ فعالیت عصبی طبیعی دارند. ناقلین آستروسیتی گلوتامات نقش اصلی را در تنظیم غلظت گلوتامات سیناپسی به‌عهده دارند، در حالی که به نظر نمی‌رسد ناقل نورونی گلوتامات نقش مهمی داشته باشد [۱۳]. پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال (Glial fibrillary acidic protein: GFAP) در سلول‌های آستروسیت بیان می‌شود و زمانی‌که آستروسیت‌ها به دلیل آسیب، بیماری یا دژنراسیون فعال می‌شوند، سطح آن افزایش می‌یابد [۳۹،۳۷]. افزایش پروتئین GFAP در قشر مغز و هیپوکامپ موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین [۴۱،۴۰] همسو با افزایش سطح پروتئین آستروسیتی GLAST در قشر پره‌فرونتال موش‌های دیابتی در مطالعه حاضر می‌باشد. با توجه به اهمیت بیان GFAP در حفظ ناقلین گلوتامات در غشاء پلاسمایی آستروسیت‌ها، اسکلت



شکل ۲. فعالیت استیل‌کولین‌استراز (AChE) در قشر پره‌فرونتال گروه‌های مورد مطالعه. فعالیت AChE برحسب نانومول در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین و مقادیر به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شدند (n = 5 rats/group). $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل مربوطه؛ # $P < 0.05$ در مقایسه با گروه بدون تمرین ورزشی مربوطه.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با توجه به فراوانی اعصاب کولینرژیک و گلوتاماترژیک [۲۹-۳۱]، حساسیت بالا نسبت به اثرات مخرب هیپرگلسیمی در دیابت [۳۲،۳۳] و اهمیت بالا در فرآیندهای انگیزشی و شناختی [۳۴،۳۵] در قشر پره‌فرونتال صورت گرفت. در این مطالعه از تزریق استرپتوزوتوسین برای ایجاد دیابت قندی نوع یک استفاده شد. تجویز سیستمیک استرپتوزوتوسین با تخریب سلول‌های بتای پانکراس و اختلال در ترشح انسولین کاربرد گسترده‌ای در ایجاد مدل حیوانی دیابت قندی دارد [۳۶]. برای تعیین اثرات دیابت قندی بر سیستم گلوتاماترژیک مغز، سطح پروتئین‌های ناقل گلوتامات در قشر پره‌فرونتال موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی شد. نتایج از افزایش معنی‌دار سطح ناقل آستروسیتی GLAST و

پره‌فروتال از محدودیت‌های مطالعه حاضر به شمار می‌رود. اثرات دیابت و ورزش بر سطوح مختلف سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری مهم در نواحی مختلف مغز در مطالعات آینده بررسی خواهد شد.

به طور خلاصه، یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد، دیابت قندی با افزایش GLAST و کاهش EAAC1 و فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال منجر به تغییر عملکرد سیستم‌های گلوتاماترژیک و کولینرژیک مغز می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد این تغییرات اهمیت بسزایی در بروز اختلالات عصبی ناشی از دیابت داشته باشند. فعالیت فیزیکی با برگرداندن سطوح پروتئین EAAC1 و فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال حیوانات دیابتی به سطح کنترل می‌تواند نقش مهمی در بهبود اختلالات عصبی ناشی از دیابت داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر حمایت مالی این مطالعه (کد ۳۰۱۰) قدردانی می‌شود.

مشارکت و نقش نویسندگان

نویسنده مسئولیت ایده و طراحی، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز و تفسیر نتایج و آماده نمودن مقاله را به عهده دارد.

منابع

- [1] Schuster DP, Duvuuri V. Diabetes mellitus. Clin Podiatr Med Surg 2002; 19: 79-107. [https://doi.org/10.1016/S0891-8422\(03\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0891-8422(03)00082-X) PMID:11806167
- [2] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes Res Clin Pract 2022; 183: 109. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119> PMID:34879977
- [3] de Senna PN, Ilha J, Baptista PP, do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, et al. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. Metab Brain Dis 2011; 26: 269-279. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9262-x> PMID:21892662
- [4] Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. Endocr Rev 2008; 29: 494-511. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0034> PMID:18436709 PMCid:PMC2528851
- [5] van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, Launer LJ, Stehouwer CDA. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression. Lancet Diabetes Endocrinol 2020; 8: 325-336. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30405-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30405-X) PMID:32135131
- [6] Caletti G, Herrmann AP, Pulcinelli RR, Steffens L, Morás AM, Vianna P, et al. Taurine counteracts the neurotoxic effects of streptozotocin-induced diabetes in rats. Amino Acids 2018; 50: 95-104. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2495-1> PMID:28936709

سلولی آستروسیت نقش مهمی در محافظت از مغز در برابر سمیت تحریکی ناشی از گلوتامات دارد [۴۲]. افزایش پروتئین GLAST از طریق کاهش سطح گلوتامات در شکاف سیناپسی می‌تواند یک پاسخ جبرانی به افزایش غلظت گلوتامات سیناپسی باشد و در پیشگیری یا مهار گسترش سمیت ناشی از تحریک بیش از حد و آسیب عصبی نقش داشته باشد [۴۳، ۴۴]. مکانیسم‌های مختلفی از جمله القاء آپوپتوز و استرس اکسیداتیو نیز می‌توانند در ایجاد آسیب‌های عصبی و اختلالات ناشی از دیابت دخیل باشند [۴۵، ۴۶]. کاهش مشاهده شده در EAAC1 که بر روی پایانه نورون‌های گلوتاماترژیک بیان می‌شود و افزایش ناقل آستروسیتی GLAST ممکن است به ترتیب به دنبال آسیب‌های عصبی ناشی از دیابت قندی و فعال شدن آستروسیت‌ها اتفاق افتاده باشد. فعال شدن آستروسیت‌ها که به دنبال آسیب عصبی اتفاق می‌افتد، علاوه بر تنظیم غلظت سیناپسی نوروترانسمیترها، در حذف بافت‌های آسیب‌دیده و مرده و محدود کردن وسعت آسیب نیز نقش دارد [۴۷].

در مطالعه حاضر القاء دیابت منجر به کاهش قابل ملاحظه فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال در مقایسه با گروه کنترل شد. در تناقض با یافته‌های مطالعه حاضر، افزایش فعالیت استیل‌کولین‌استراز موش‌های صحرایی دیابتی در مطالعه Schmatz و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است [۴۸]. القاء آپوپتوز و کاهش تعداد نورون‌ها در قشر پره‌فروتال موش‌های صحرایی دیابتی نشان داده شده است [۳۳]. علاوه بر پیوسته‌های عصبی-عضلانی، ایزوفرم سیناپسی آنزیم استیل‌کولین‌استراز در سیناپس‌های کولینرژیک سیستم عصبی مرکزی نیز وجود دارد [۲۳]. آسیب عصبی ناشی از دیابت با کاهش سیناپس‌های کولینرژیک می‌تواند در کاهش فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال نقش داشته باشد.

همسو با کاهش آسیب عصبی مشاهده شده در قشر پره‌فروتال موش‌های صحرایی دیابتی به دنبال تمرین با تردمیل [۳۳]، بازگشت سطح ناقل نورونی EAAC1 و ریکاوری فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال این حیوانات نیز در مطالعه حاضر مشاهده شد. تمرین با تردمیل اثر معنی‌داری بر بیان هیچ یک از ناقلین آستروسیتی و نورونی گلوتامات و فعالیت استیل‌کولین‌استراز قشر پره‌فروتال در حیوانات کنترل نداشت. این یافته‌ها با نتایج مطالعه قبلی ما که از عدم تغییر معنی‌دار یادگیری و حافظه فضایی و سطح اضطراب حیوانات گروه کنترل به دنبال تمرین با تردمیل حکایت داشت [۱۶]، هم‌خوانی دارد.

بررسی اثرات دیابت و فعالیت فیزیکی بر سیستم‌های گلوتاماترژیک و کولینرژیک به ترتیب تنها در سطح ناقلین گلوتامات و فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز و صرفاً در قشر

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.05.007>

PMid:15946748

[21] Green A, Ellis KA, Ellis J, Bartholomeusz CF, Ilic S, Croft RJ, et al. Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 575-584.

<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.04.010>

PMid:15936063

[22] Tehrani Farzin F, Bananej M, Sahraei H. Involvement of muscarinic system of the dorsal hippocampus on acute stress-induced spatial learning and memory enhancement in male mice. *Koomesh* 2021; 23: 821-833. (Persian).

[23] Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 294-302.

<https://doi.org/10.1038/35067589>

PMid:11283752

[24] Caliskan H, Akat F, Tatar Y, Zaloglu N, Dursun AD, Bastug M, Ficilar H. Effects of exercise training on anxiety in diabetic rats. *Behav Brain Res* 2019; 376: 112084.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112084>

PMid:31356829

[25] Zare Z, Zarbakhsh S, Tehrani M, Mohammadi M. Neuroprotective effects of treadmill exercise in hippocampus of ovariectomized and diabetic rats. *Neuroscience* 2022; 496: 64-72.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.06.012>

PMid:35700817

[26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

PMid:942051

[27] Zare Z, Tehrani M, Rafiei A, Valadan R, Mohammadi M. Differential expression of glutamate transporters in cerebral cortex of paraoxon-treated rats. *Neurotoxicol Teratol* 2017; 62: 20-26.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.06.001>

PMid:28603072

[28] Zare Z, Tehrani M, Rezaei N, Dana Ghalebarzand B, Mohammadi M. Anxiolytic activity of paraoxon is associated with alterations in rat brain glutamatergic system. *Neurotoxicol Teratol* 2019; 71: 32-40.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.12.001>

PMid:30576762

[29] Auger ML, Floresco SB. Prefrontal cortical GABAergic and NMDA glutamatergic regulation of delayed responding. *Neuropharmacology* 2017; 113: 10-20.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.09.022>

PMid:27678413

[30] Millard SJ, Lum JS, Fernandez F, Weston-Green K, Newell KA. Perinatal exposure to fluoxetine increases anxiety- and depressive-like behaviours and alters glutamatergic markers in the prefrontal cortex and hippocampus of male adolescent rats: A comparison between Sprague-Dawley rats and the Wistar-Kyoto rat model of depression. *J Psychopharmacol* 2019; 33: 230-243.

<https://doi.org/10.1177/0269881118822141>

PMid:30698051

[31] Tinkler GP, Tobin JR, Voytko ML. Effects of two years of estrogen loss or replacement on nucleus basalis cholinergic neurons and cholinergic fibers to the dorsolateral prefrontal and inferior parietal cortex of monkeys. *J Comp Neurol* 2004; 469: 507-521.

<https://doi.org/10.1002/cne.11028>

PMid:14755532

[32] Martínez-Tellez R, Gómez-Villalobos Mde J, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res* 2005; 1048: 108-115.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.048>

PMid:15916754

[33] Zare Z, Tehrani M, Zarbakhsh S, Mohammadi M. Protective effects of treadmill exercise on apoptotic neuronal damage and astrocyte activation in ovariectomized and/or diabetic rat prefrontal cortex: molecular and histological aspects. *Int J Neurosci* 2022; 1-9.

[7] Erukainure OL, Ijomone OM, Oyebo OA, Chukwuma CI, Aschner M, Islam MS. Hyperglycemia-induced oxidative brain injury: Therapeutic effects of Cola nitida infusion against redox imbalance, cerebellar neuronal insults, and upregulated Nrf2 expression in type 2 diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2019; 127: 206-217.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.044>

PMid:30914353

[8] Rahigude A, Bhutada P, Kaulaskar S, Aswar M, Otari K. Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience* 2012; 226: 62-72.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.026>

PMid:22999973

[9] Wang C, Li J, Zhao S, Huang L. Diabetic encephalopathy causes the imbalance of neural activities between hippocampal glutamatergic neurons and GABAergic neurons in mice. *Brain Res* 2020; 1742: 146863.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146863>

PMid:32360099

[10] Pignalosa FC, Desiderio A, Mirra P, Nigro C, Perruolo G, Ulianich L, et al. Diabetes and cognitive impairment: A role for glucotoxicity and dopaminergic dysfunction. *Int J Mol Sci* 2021; 22.

<https://doi.org/10.3390/ijms222212366>

PMid:34830246 PMCid:PMC8619146

[11] Gandhi GK, Ball KK, Cruz NF, Dielen GA. Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* 2010; 2: e00030.

<https://doi.org/10.1042/AN20090048>

PMid:20396375 PMCid:PMC2839462

[12] Pitsikas N. The metabotropic glutamate receptors: potential drug targets for the treatment of anxiety disorders? *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 181-184.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.019>

PMid:24361306

[14] Mohammadi M, Zare Z, Allah-Moradi E, Vaezi N, Valadan R, Tehrani M. Alterations in mRNA and protein expression of glutamate transporters in rat hippocampus after paraoxon exposure. *Neurotoxicology* 2016; 57: 251-257.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.009>

PMid:27769869

[15] Zhou Y, Danbolt NC. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 165.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>

PMid:24273530 PMCid:PMC3822327

[16] Mohammadi M, Zare Z. Effects of treadmill exercise on cognitive functions and anxiety-related behaviors in ovariectomized diabetic rats. *Physiol Behav* 2020; 224: 113021.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113021>

PMid:32569602

[17] Jafari A, Rostampour M, Ataei A, Khakpour-Taleghani B. Interaction of glutamatergic system inhibition and aerobic exercise on anxiety-like behaviors in rats. *Koomesh* 2022; 24: 531-537. (Persian).

[18] Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 2018; 141: 1917-1933.

<https://doi.org/10.1093/brain/awy132>

PMid:29850777 PMCid:PMC6022632

[19] Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav Neurosci* 2004; 118: 223-236.

<https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.223>

PMid:14979800

[20] Buccafusco JJ, Letchworth SR, Bencherif M, Lippiello PM. Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 352-360.

GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J Biol Chem* 2007; 282: 29414-29423.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M704152200>

PMid:17684014

[43] Crino PB, Jin H, Shumate MD, Robinson MB, Coulter DA, Brooks-Kayal AR. Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 211-218.

<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.35001.x>

PMid:11906504 PMCID:PMC2441873

[44] Hsu PC, Lan YJ, Chen CC, Lee LY, Chen WP, Wang YC, Lee YH. Erinacine A attenuates glutamate transporter 1 downregulation and protects against ischemic brain injury. *Life Sci* 2022; 306: 120833.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120833>

PMid:35882273

[45] Groeneveld ON, van den Berg E, Johansen OE, Schnaidt S, Hermansson K, Zinman B, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction are associated with reduced cognition in type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2019; 16: 577-581.

<https://doi.org/10.1177/1479164119848093>

PMid:31068001

[46] Kong FJ, Ma LL, Guo JJ, Xu LH, Li Y, Qu S. Endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in diabetes-induced neuronal apoptosis and cognitive decline in mice. *Clin Sci (Lond)* 2018; 132: 111-125.

<https://doi.org/10.1042/CS20171432>

PMid:29212786

[47] Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 2005; 11: 400-407.

<https://doi.org/10.1177/1073858405278321>

PMid:16151042

[48] Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 610: 42-48.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.032>

PMid:19303406

[13] Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1-105.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)

PMid:11369436

<https://doi.org/10.1080/00207454.2022.2148529>

PMid:36377197

[34] Thierry AM, Gianni Y, Dégénétais E, Glowinski J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 2000; 10: 411-419.

[https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<411::AID-HIPO7>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<411::AID-HIPO7>3.0.CO;2-A)

PMid:10985280

[35] Wood JN. Social cognition and the prefrontal cortex. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2003; 2: 97-114.

<https://doi.org/10.1177/1534582303002002002>

PMid:13678518

[36] Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* 2021; 1: e78.

<https://doi.org/10.1002/cpz1.78>

PMid:33905609

[37] Coleman E, Judd R, Hoe L, Dennis J, Posner P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia* 2004; 48: 166-178.

<https://doi.org/10.1002/glia.20068>

PMid:15378652

[38] Nagayach A, Patro N, Patro I. Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 355.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00355>

PMid:25400546 PMCID:PMC4215794

[39] Lu Y, Dong Y, Tucker D, Wang R, Ahmed ME, Brann D, et al. Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and oxidative stress in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2017; 56: 1469-1484.

<https://doi.org/10.3233/JAD-160869>

PMid:28157094 PMCID:PMC5450951

[40] Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 2003; 462: 67-71.

[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01294-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01294-9)

PMid:12591097

[41] Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Roig P, Lima A, et al. Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain Res* 2002; 957: 345-353.

[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03675-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03675-2)

PMid:12445977

[42] Sullivan SM, Lee A, Björkman ST, Miller SM, Sullivan RK, Poronnik P, et al. Cytoskeletal anchoring of

Effect of treadmill exercise on glutamate transporter proteins and acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex of diabetic rats

Moslem Mohammadi (Ph.D)*

Dept. of Physiology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

* Corresponding author. +981133543081 mohammadimo@yahoo.com

Received: 28 May 2023; Accepted: 5 Jul 2023

Introduction: Diabetes-induced neurological disorders could be attributed to changes in the neurotransmitter systems. To determine the effects of diabetes mellitus and physical activity on the brain's glutamatergic and cholinergic systems, the levels of glutamate transporter proteins and acetylcholinesterase activity were investigated in the prefrontal cortex of diabetic animals with/without treadmill exercise.

Materials and Methods: Adult Wistar rats (5 rats/group) were used in this study. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg). Control animals received 0.1 M citrate buffer as vehicle. After 14 days, animals were randomly divided into non-exercise and exercise groups. In the exercise groups, animals were subjected to 4 weeks of treadmill exercise (5 days per week). Thereafter, animals were sacrificed and prefrontal cortices were isolated to measure protein levels of astrocytic (GLAST and GLT-1) and neuronal (EAAC1) glutamate transporters and acetylcholinesterase (AChE) activity.

Results: Animals in the diabetic group had higher GLAST and lower EAAC1 levels ($P<0.001$) compared to the control group, whereas the level of GLT-1 remained unchanged. In addition, a significant decrease in AChE activity was observed in the diabetic group compared to the control group ($P<0.001$). Treadmill exercise decreased GLAST level ($P<0.05$) and increased EAAC1 level and AChE activity to the normal levels in the diabetic group.

Conclusion: Despite no significant effect on the elevated level of GLAST, treadmill exercise was able to restore decreased EAAC1 protein and acetylcholinesterase activity observed in the prefrontal of diabetic animals to the control levels.

Keywords: Diabetes Mellitus, Exercise, Glutamate Transporters, Prefrontal Cortex, Acetylcholinesterase
