Interactive effects of reducing exercise intensity and Adiantum capillus veneris extract on remodeling and modulation of pulmonary apoptotic indices in the rats exposed to the hypoxia.

Yadegari M., PhD[1], Riahy S., PhD[2], Mirdar Sh., PhD[3], Hamidian Gh., PhD[4]

1. PhD in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.
2. PhD in Exercise Physiology, Faculty of Aerospace Medicine and subsurface, Army Medical University, Tehran, Iran.
3. Professor, PhD in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.
4. Assistant Professor, PhD in Comparative Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-41-36378743, hamidian@tabrizu.ac.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

ABSTRACT

Background and Aim: Apoptosis is a type of programmed cell death occurring by a series of intercellular messages which is associated with tissue structure remodeling. The purpose of the present study was to investigate the interactive effects of reducing exercise intensity and Adiantum capillus veneris extract on remodeling and modulation of pulmonary apoptotic indices of the rats exposed to the hypoxia.

Material and Methods: This study included 16 male Wistar rats. After 6 weeks of high intensity interval training, the rats were kept in a hypoxic environment for 3 weeks. In hypoxic environment, half of the rats performed interval training and taper and received 500 mg/kg of Adiantum capillus veneris extract. Finally, lung tissue was extracted for immunohistochemical and stereology studies.

Results: 3 weeks of simultaneous exercise intensity and taper and Adiantum capillus veneris extract consumption in the hypoxia group led to decreased Bax/Bcl-2 ratio($p<0.05$) and nematocytes-2 population ($p>0.05$), compared to increased alveolar nematocytes-1 population in the hypoxia group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that simultaneous use of exercise intensity and taper and consumption of Adiantum capillus veneris extract is effective in decreasing apoptosis and remodeling of Alveolar epithelial cells after high intensity interval training and exposure to hypoxia.

Key Words: Interval exercise training, Hypoxia, Adiantum capillus veneris, Taper.

Received: Sep 23, 2017 **Accepted:** Apr 11, 2018

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم / خرداد و تیر ۹۱/۱۳۹۷-۸۱

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

اثرات تعاملی کاهش شدت تمرین ورزشی و عصاره پر سیاوش در تعدیل شاخص های ریمدلینگ و آپوپتوز ریوی رت های هیپوکسی شده

مهدی یادگاری[۱]، سیمین ریاحی[۲]، شادمهر میردار[۳]، غلامرضا حمیدیان[۴]

۱. دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران.

۲. دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، پژوهشگر مرکز پژوهشی علوم و فناوری اپیدمیولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران.

۳. استاد، دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی ، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۴. استادیار، دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران ، نویسنده مسئول ،تلفن ثابت:۳۶۳۷۸۷۴۳ -۰۴۱، hamidian@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلول است که توسط مجموعه‌ای از پیام های بین سلولی رخ می‌دهد که با تغییر ساختارهای بافتی همراه است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات تعاملی کاهش شدت تمرین ورزشی و عصاره پر سیاوش در تعدیل شاخص های آپوپتوز و ریمدلینگ ریوی رت های هیپوکسی شده بود.

روش بررسی: نمونه های پژوهش حاضر را ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار تشکیل داده بودند که پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، به مدت۳ هفته وارد محیط هیپوکسی شدند و نصف رت ها در طی ۳ هفته قرارگیری در هیپوکسی، به اجرای تمرینات تناوبی با شدت کمتر (تیپر) پرداختند و روزانه نیز ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره پرسیاوش دریافت کردند. در پایان، جهت انجام آزمایش های ایمونوهیستوشیمی و استریولوژی، بافت ریه خارج گردید.

یافته ها: ۳ هفته کاهش شدت تمرین و مصرف عصاره پرسیاوش در گروه هیپوکسی، سبب کاهش نسبت Bax/Bcl-2 ($P<۰/۰۵$)، کاهش جمعیت نموسیت-۲ ($P>۰/۰۵$) و همچنین افزایش جمعیت نموسیت-۱ حبابچه های ریوی ($P<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه هیپوکسی شد.

نتیجه گیری: سودمندی بهره گیری همزمان از کاهش شدت تمرین و مصرف عصاره پرسیاوش در کاهش آپوپتوز و ریمدلینگ سلول های اپیتلیالی حبابچه ای به دنبال تمرین تناوبی شدید و قرارگیری در معرض هیپوکسی نتیجه مهم پژوهش حاضر محسوب می‌شود.

کلید واژه ها: تمرین تناوبی، هیپوکسی، پر سیاوش، کاهش شدت تمرین

وصول مقاله:۹۶/۷/۱ اصلاحیه نهایی:۹۷/۱/۶ پذیرش:۹۷/۱/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

مقدمه

آپوپتوز یک شکل تنظیمی عالی مرگ سلول است که برای نمو طبیعی اندامهای چندسلولی نیاز می باشد.(۳-۱). اگرچه آبشارهای پروتئولیتیک[1] فعال شده توسط کاسپاس[2]-ها نقش محوری را در فرآیند آپوپتوز ایفا می کنند، اما آغاز این فرآیند توسط عوامل دیگری تنظیم و کنترل می‌شود. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به عنوان یک نقطه کنترلی بین سطح سلول و سیگنال‌های درونی جهت شکل‌گیری آپوپتوز و فعال‌سازی آبشار کاسپاسی، نقشی حیاتی را بر عهده دارند. بیش از ۱۲ عضو از اعضاء خانواده Bcl-2 کشف و شناسایی شده است که به دو زیر رده اصلی شامل اعضاء ضدآپوپتوزی یا مهارکننده‌ها (از قبیل Bcl-2، Mcl-1، Bcl-XL، Bcl-W و Bag-1) و اعضاء پیش آپوپتوزی یا پیش‌برنده‌ها[3] (از قبیل Bax، Bad، Bak، Bid) تقسیم-بندی می‌شوند(۴و۳). شاخصی که سطح آن از اهمیت بالایی در تشخیص شرایط آپوپتوزی بافت برخوردار است، نسبت Bax/Bcl-2 می باشد که اگر افزایش یابد حاکی از پیشبرد آپوپتوز و اگر کاهش یابد نشان از کاهش رخداد آپوپتوز دارد. این نسبت نزدیکترین ارتباط به تعیین ادامه حیات یا مرگ آپوپتوزی سلول ها را دارد(۶و ۵و ۳).

بروز آپوپتوز ممکن است با شاخص های ساختاری نیز همراه باشد که از جمله شاخص های ساختاری و مورفولوژیک آن می توان و به کاهش جمعیت سلولی در بافت های مختلف اشاره کرد(۸ و ۷). سلول های اپیتلیالی حبابچه های ریوی (نموسیت های تیپ ۱ و ۲) واحدهایی کارامد در تبادل گاز و حفظ یکپارچگی سلول حبابچه ای هستند که تعداد و نسبت آنها نقش موثری در سلامت پارانشیم ریوی ایفا می کند. ریمدلینگ ریوی اشاره به الگوهای گسترده پاتوفیزیولوژیکی از جمله هایپرپلازی سلول های عضله‌ی صاف، افزایش فعالیت فیبروبلاست، میوفیبروبلاست، رسوب ماتریکس خارج سلولی و تغییر نامتعارف در جمعیت سلول های اپیتلیالی دارد(۱۰و ۹).

از جمله عواملی که می تواند نقش قوی در تسریع مرگ سلولی یا بروز آپوپتوز پاتولوژیایی آلوئول های ریه داشته باشد، تنش اکسیژن یا هیپوکسی است(۱۱). افراد زیادی همچون نیروهای نظامی و ورزشکاران نخبه، به دلایل مختلف مجبور به اقامت و یا تمرین در محیط های مرتفع و دارای فشار سهمی اکسیژن پایین هستند. نشان داده شده قرارگیری طولانی مدت در معرض هیپوکسی ممکن است اثرات تخریبی و مرتبط با مرگ سلولی روی سلول ها اعمال کند(۱۲). حذف و یا به حداقل رساندن این مشکلات با مداخله‌های تغذیه‌ای و تمرینی ممکن به نظر می رسد(۱۳). مطالعات گیاه‌شناسی نشان می‌دهد پرسیاوش با دارا بودن عناصر ضد التهابی و ضد اکسایشی مهمی همچون فلاونوئیدها[4] و ساپونین[5] ها نقش موثری در مهار واکنش های التهابی بازی می کند و از این نظر ممکن است در مهار آپوپتوز یا تخریب سلولی موثر باشد(۱۴). با وجود مصارف سنتی گیاه پرسیاوش، هنوز تحقیقات بالینی و ورزشی کاملی روی این گیاه ارزشمند صورت نگرفته. لذا لازم است با توجه به اثرات گوناگون بیولوژیک و درمانی گزارش شده از گیاه پرسیاوش با ایجاد الگوی بالینی- ورزشی مناسب، از لحاظ بودن در نقش یک مکمل محافظتی ریه در برابر آپوپتوز احتمالی ناشی از تنش هایپوکسی بیشتر مورد بررسی قرارگیرد. از جمله مداخلات تمرینی که برای کاهش اثرات منفی ورزش شدید و محیط هیپوکسی پیشنهاد شده است می توان به تیپر شدت یا کاهش شدت تمرین ورزشی اشاره کرد. تیپر کاهش پیشرونده بار تمرینی در طول یک دوره زمانی متغیر است که هدف آن تلاش برای کاهش استرس‌های فیزیولوژیک و استرس‌های روانی روزانه تمرین و بهینه‌سازی عملکرد ورزشی می‌باشد. میردار و همکاران(۱۳۹۴) اثرات ۲ و ۳ هفته تیپر متعاقب ۶ هفته

[1] - Proteolytic
[2] - Caspase
[3]- Promoters
[4] - Flavonoids
[5] - Saponins

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

تمرین اینتروال شدید، بر رمدلینگ مجاری تنفسی تحتانی رت‌های صحرایی در حال رشد را بررسی کردند. محققان اظهار داشتند تیپر به مدت سه هفته عوارض ناشی از ورزش شدید در مجاری تنفسی تحتانی رت‌ها را کاهش می-دهد(۱۹). با بررسی ادبیات پژوهش به این واقعیت پی می بریم که اگرچه تا کنون مطالعات زیادی به بررسی تاثیر تیپر بر عملکرد ورزشی(۱۳) و گاه مطالعاتی به بررسی تاثیر این تکنیک در کاهش شاخص های التهابی خونی پرداخته است است(۲۰)؛ اما سودمندی این تکنیک بر مورفولوژی و فیزیولوژی بافت، مخصوصا بافت ریه با سوالات بسیاری روبه رو است که پاسخ به آنها مطالعات بیشتر را می طلبد. با توجه به سوالات پیش رو، پژوهش حاضر بر آن شد تا به بررسی همزمان تیپر شدت و عصاره پر سیاوش بر نسبت Bax/Bcl2 و ریمدلینگ سلول های اپیتلیالی حبابچه های ریوی در نمونه های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هیپوکسی بپردازد و نتایج آن را با مطالعاتی مقایسه کند که اثرات این متغیرها را به صورت مجزا بررسی کرده اند.

روش بررسی

این پژوهش از نوع آزمایشگاهی و به روش تجربی بود. نمونه‌های پژوهش حاضر را ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزنی gr ۸ ±۷۲) تشکیل داده بودند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند و به صورت تصادفی به گروه‌های هیپوکسی (۸ سر) و گروه هیپوکسی تیپر مکمل (۸ سر) تقسیم شدند. نمونه ها از نظر سلامت بدنی کاملا سالم و هیچ گونه سابقه بیماری نداشتند. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند، سپس به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. برای تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شده بود. جهت جلوگیری از اثر احتمالی شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش، در مرحله آشناسازی حیوانات با فعالیت روی نوارگردان به روش شرطی‌سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری کنند. در طی پژوهش غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار نمونه ها قرار گرفت(۱۵).

نمونه ها قبل از ورود به محیط هیپوکسی به مدت ۶ هفته برنامه تمرین تناوبی شدید با الگوی ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای را انجام دادند، به گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود وکل تمرین روزانه برای هر رت ۳۰ دقیقه طول می‌کشید. نمونه ها ۵ جلسه در هفته تمرین کردند. برنامه تمرین تناوبی شدید با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه در پایان هفته ششم پایان پذیرفت (۱۵). پس از پایان مرحله اول پژوهش (فعالیت تناوبی شدید ۶ هفته ای)، مرحله دوم پژوهش آغاز شد که ۳ هفته ادامه داشت. در طی این ۳ هفته نمونه های تمرین کرده پس از ۶ هفته تمرین تناوبی وارد محیط هیپوکسی (اتاقک کم فشار[6] اکسیژن در محیط شبیه سازی شده مصنوعی معادل ۲۸۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا، ۵۵۰ mmHg، ۷۲ درصد اکسیژن سطح دریا در دسترس) شدند و به مدت ۳ هفته در آنجا نگهداری شدند (گروه هیپوکسی). گروه دیگر در طی ۳ هفته قرارگیری در محیط هیپوکسی، روزانه تمرین تناوبی خود را با همان الگوی ۶ هفته قبل انجام دادند، منتها شدت تمرین به میزان ۳۰ درصد کاهش یافته بود. به عبارتی سرعت نوارگردان از ۷۰ متر در دقیقه به ۵۰ متر در دقیقه رسیده بود(۱۶). ضمن اینکه در این ۳ هفته عصاره پرسیاوش را به صورت گاواژ دریافت کردند. میزان مصرف عصاره پرسیاوش به میزان ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز بود(گروه هیپوکسی تیپر مکمل)(۱۷) .

[1]- Hypoxic chamber

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

نمونه‌گیری بافتی از ریه رت ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره هیپوکسی انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین[۷] (۵۰-۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین[۸] (۵-۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) رت ها بیهوش و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از سپری شدن ۵ روز از زمان فیکس بافتی، به منظور مطالعه تغییرات ساختاری بافت ریه در گروه‌های پژوهش، ابتدا با استفاده از تکنیک اورینتیتور و رعایت اصول IUR ، برش‌هایی از بافت ریه تهیه و با انجام مراحل پاساژ برش‌های متوالی به ضخامت ۲۰ میکرومتر جهت مطالعات استریولوژی تهیه شد و به روش استاندار و معمول با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند(۱۸). جمعیت سلول های اپیتلیالی نوع ۱ (نموسیت-۱) و نوع ۲ حبابچه های ریوی (نموسیت-۲) در بافت ریه چپ با استفاده از روش‌های استریولوژیک تخمین زده شد(۱۹). کلیه مطالعات استریولوژیک با روش اوپتیکال فراکشنیتور و با استفاده از میکروسکوپ متصل به میکرواریتور، دوربین و سیستم تمام دیجیتال و نسخه شماره ۹ نرم افز Stereo- investigator انجام شد.

از هر ریه به طور تصادفی پنج برش نازک غیر متوالی به ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bcl-2 و پنج برش نازک دیگر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bax انتخاب شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش انویژن[۹] و با استفاده از آنتی بادی اختصاصی Bcl-2 کد 436-044 ساخت شرکت milli pore و Bax کد 69643 ساخت شرکت Abcam انجام شد.

جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی در ابتدا محیط کشت رویی بافت ها دور ریخته شد. سپس بافت ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. پس از آن محلول پارا فرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه به بافت اضافه و در ادامه اسیدکلریدریک نرمال نیز به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به بافت اضافه گردید و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت، به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. در نهایت به بافت ها آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) با رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه گردید و سپس درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از آن به نمونه ها PI اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه روی نمونه ها PBS ریخته شد(۲۰). در نهایت برای ارزیابی داده های کمی ایمونوهیستوشیمی، با میکروسکوپ فلورسانت سلول ها ارزیابی و شمارش گردیدند. با استفاده از دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک ۵ فیلد مختلف انتخاب و تصویربرداری صورت گرفت و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش، با نسخه ۱/۴۹ نرم افزار ImageJ مور آنالیز قرار گرفته و به صورت داده‌های عددی توصیف شدند(۲۱).

برای تهیه عصاره گیاه پرسیاوش از روش خیساندن استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۵ گرم پودر پرسیاوش با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد و در محلول ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصدآب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. در طول این مدت درب ظرف حاوی خیسانده با پارافین به خوبی پوشانده شد و در دمای محیط ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. مخلوط هر۶ ساعت یکبار توسط میله شیشه‌ای هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و توسط روتاری با دمای ملایم (زیر ۶۰ درجه سانتی‌گراد) حلال آن حذف گردید. با وزن کردن عصاره غلیظ شده بازده آن ۷۵/۰۶ گرم بدست آمد(۲۲).

7- Ketamine
8-Xylazine
9- Envision

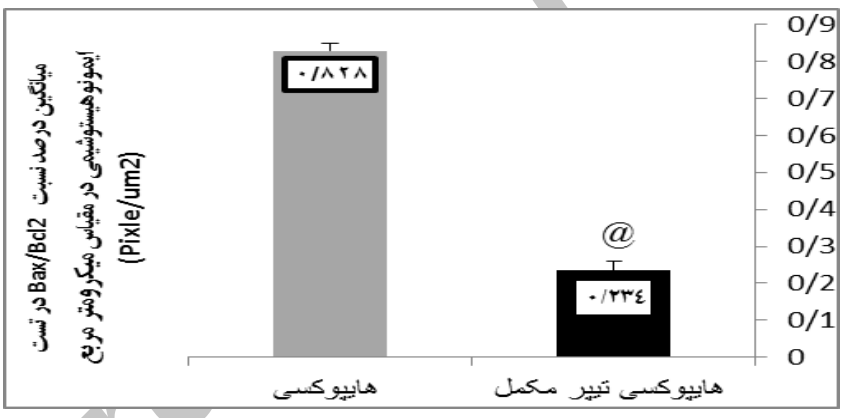
Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه ها از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون آماری کلوموگروف اسمیرنوف (k-s) استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی t مستقل نیز جهت مقایسه میانگین گروه ها استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.21و در سطح معناداری P< ۰/۰۵ انجام شد.

یافته ها

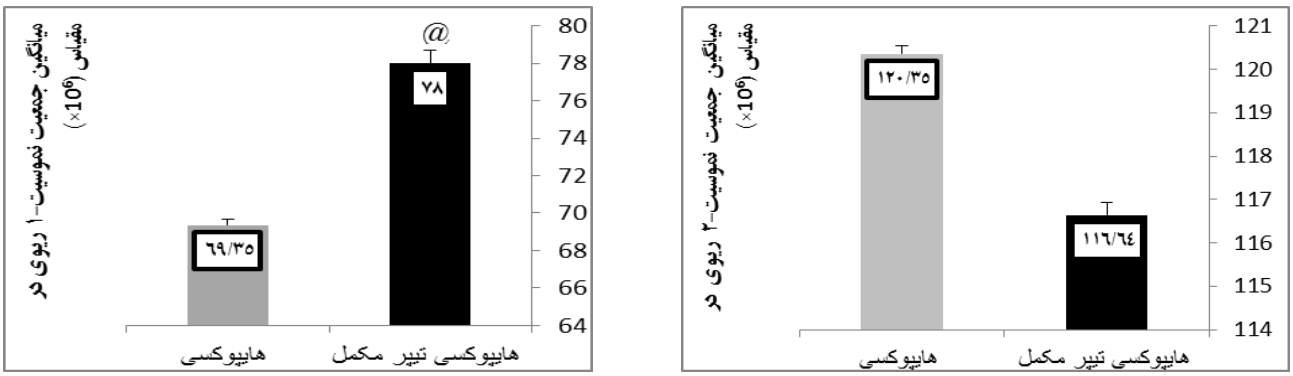
تحلیل آماری نشان داد ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت و مصرف عصاره پرسیاوش در گروه هیپوکسی، نسبت Bax/Bcl-2 حبابچه های ریوی را به طور معنادار کاهش داد (۷۱/۷۳ درصد کاهش، P<۰/۰۵، نمودار ۱، تصویر ۱ و ۲). همچنین دیده شد ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت و مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هیپوکسی سبب افزایش معنادار جمعیت نموسیت-۱ حبابچه های ریوی شد(۸/۷۵ درصد افزایش، P<۰/۰۵، نمودار ۲، تصویر ۳). علاوه بر این ملاحظه شد ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت و مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه های هیپوکسی، سبب کاهش غیر معنادار جمعیت نموسیت-۲ حبابچه های ریوی شد (۳/۷۱ درصد کاهش، نمودار ۳، تصویر ۳).



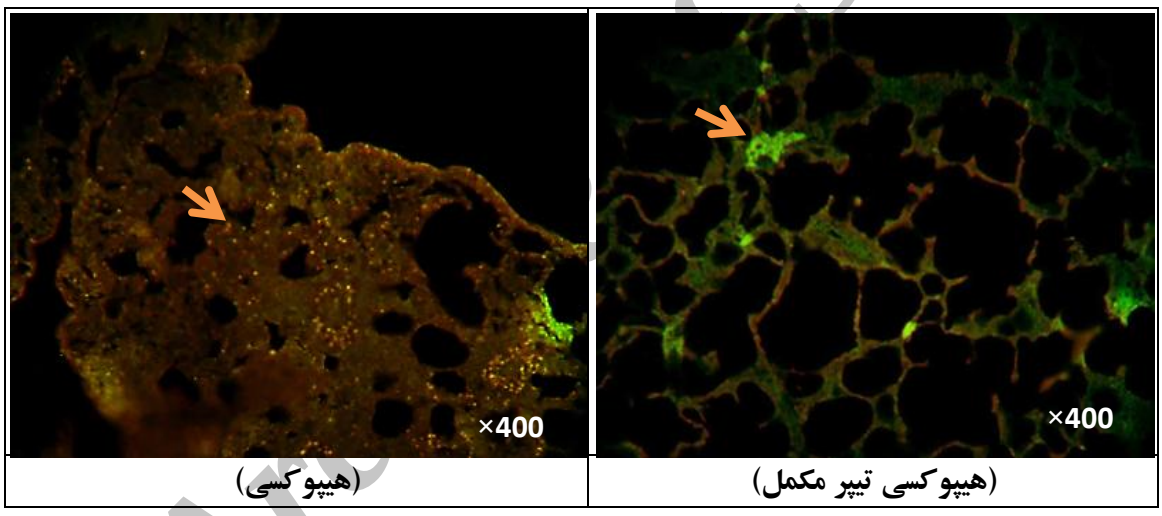
نمودار ۱. میانگین و خطای استاندارد نسبت Bax/Bcl2 حبابچه ریوی در گروه های پژوهش. داده ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. همانطور که مشاهده می شود نسبت Bax/Bcl2 در گروه هیپوکسی تیپر مکمل به طور معناداری نسبت به گروه هیپوکسی کاهش یافته است. @ تفاوت بت به گروه هیپوکسی(P<۰/۰۵).

www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018



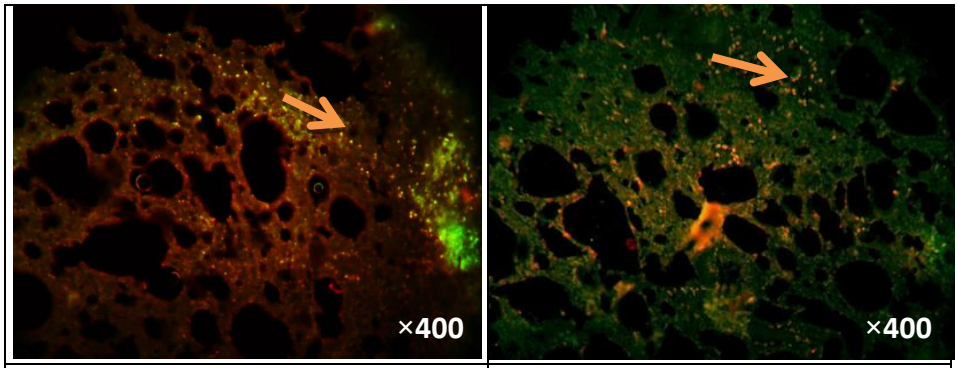
به ترتیب از چپ به راست، نمودار ۲ و ۳. میانگین و خطای استاندارد جمعیت نموسیت -۱ و جمعیت نموسیت -۲ حبابچه های ریوی در گروههای پژوهش. داده ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و در مقیاس (10^6×) گزارش شده اند. @ تفاوت معنادار نسبت به گروه هیپوکسی($P<۰/۰۵$).



تصویر ۱. تصاور مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bax در گروه های پژوهش. آنتی بادی ثانویه Bax به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 200× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول ها به آنتی بادی پروتئین Bax را نشان می دهد.

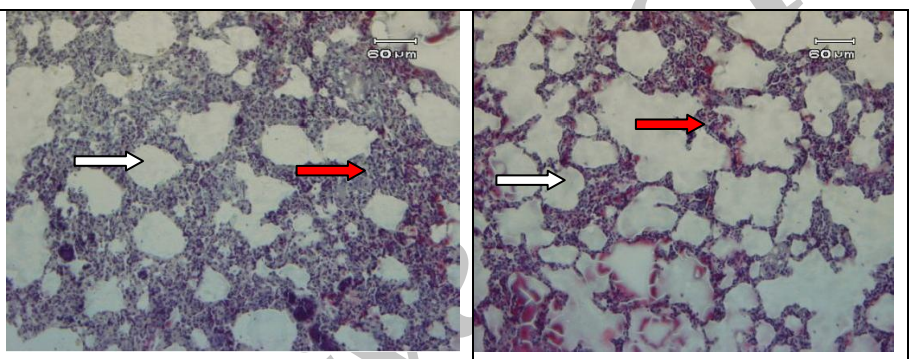
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018



(هیپوکسی)	(هیپوکسی تیپر مکمل)

تصویر ۲. تصاور مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl2 در گروه های پژوهش. آنتی بادی ثانویه Bcl2 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 200× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول ها به آنتی بادی پروتئین Bcl2 را نشان می دهد.



(هیپوکسی)	(هیپوکسی تیپر مکمل)

تصویر ۳: ساختار هیستولوژیک بافت ریه در گروه های پژوهش (رنگ آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰×).

همانطور که مشاهده می شود در گروه هیپوکسی تیپر مکمل نسبت به گروه هیپوکسی، تعداد حبابچه های ریوی و به تبع آن سطح تنفس افزایش یافته است که احتمالا به طور قوی با افزایش شمار نموسیت های-۱ در ارتباط است. پیکان سفید رنگ اشاره به تعداد حبابچه‌ها و کیسه های هوایی می‌کند که بر اساس عکس‌های موجود مشاهده می شود در گروه هیپوکسی نسبت به گروه هیپوکسی تیپر مکمل مقدار این واحدهای هوایی در ریه کاهش یافته است. همچنین پیکان قرمز رنگ اشاره به فضاهای بین حبابچه ای دارد. همانطور که ملاحضه می شود در گروه هیپوکسی این فضاها به دلیل مهاجرت سلول‌های سیستم ایمنی افزایش یافته است و در گروه هیپوکسی تیپر مکمل این میزان کمتر است.

بحث

نتایج مطالعه ما نشان داد ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت و مصرف عصاره پرسیاوش در گروه هیپوکسی، نسبت Bax/Bcl-2 حبابچه های ریوی را به طور معنادار کاهش می دهد. این کاهش به صورت غیرمعنادار نیز در جمعیت نموسیت-۲ دیده شد. همچنین مشاهده شد ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت و مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هیپوکسی سبب افزایش معنادار جمعیت نموسیت-۱ حبابچه های ریوی گردید.

با توجه به یافته ها، به نظر می رسد نمونه های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هیپوکسی، سطوحی از پیشرفت آپوپتوز را تجربه کرده اند که با تغییرات ساختاری در

www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

حبابچه های ریوی همراه بوده است. در ادامه چنین بر می آید که کاهش شدت تمرین و بهره گیری از عصاره گیاهی پرسیاوش تا حدود بسیار زیادی توانسته است مهمترین شاخص پروتئینی آپوپتوز یعنی نسبت Bax/Bcl2 را کاهش داده و جمعیت نموسیت های-۱ را افزایش دهد که نقش مهمی در ساختار دیواره حبابچه ای و توسعه سطح تنفسی پارانشیم دارند. در ارتباط با تاثیرات التهابی – آپوپتوزی تمرینات شدید ورزشی بر روی بافت ریه و همچنین اثرات مخرب هیپوکسی در مرگ سلول های ریوی پژوهش های گوناگونی به ثبت رسیده است و تا حدودی مسیر این حوزه روشن می باشد. یادگاری و همکاران(۱۳۹۵) پس از اجرای یک طرح تجربی گزارش کردند ۶ هفته تمرین تناوبی شدید موجب افزیش پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و تا حدودی Bcl2 می شود. نتایج این پژوهش افزایش فرآیندهای پیش آپوپتوزی ریه با تمرینات ورزشی شدید را گوشزد کردند(۲۳). شین دا لی[10] و همکاران (۲۰۰۶) اثرات هیپوکسی متناوب بلند مدت روی میتوکندری و مسیر آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ را بررسی کردند. نتایج نشان داد فعالیت مسیر آپوپتوزی وابسته به میتوکندری $BNIP_3$ ،کاسپاس ۳،کاسپاس ۸،کاسپاس۹ و مسیر آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ Fas افزایش یافت. علاوه بر این Bcl-2 ،پروتئین ضد آپوپتوزی مرتبط به میتوکندری و سیتوکروم C اکسیداز بعد ۴ هفته کاهش یافت(۲۴). در همین راستا یادگاری و همکاران (۱۳۹۶) در یک طرح تجربی بر روی نمونه های رت بالیده شده به این نتیجه رسیدند که یک دوره تمرینات ورزشی شدید، شاخص Bax/Bcl2 را به طور معناداری افزایش می دهد و در کنار شاخص آپوپتوزی، ریمدلینگ معیوب در نموسیت های حبابچه ای را موجب می شود. این محققان همچنین گزارش کردند ۳ هفته اجرای تکنیک تیپر شدت یا همان کاهش شدت تمرین ورزشی و ادامه آن در شرایط هیپوکسی این تغییرات را به نحو کارآمدی تعدیل کرده و به سطوح استراحتی نزدیک می کند. در این مطالعه میزان کاهش شاخص پیش آپوپتوزی Bax/Bcl2 با اجرای کاهش شدت تمرین پانزده درصد بود. همچنین در اثر اجرای تیپر در محیط هیپوکسی جمعیت نموسیت-۱ به میزان ۷ درصد افزایش و جمعیت نموسیت-۲ به میزان ۶/۵ درصد کاهش یافت(۲۵). در پژوهش پیش رو با اضافه کردن عصاره پرسیاوش به اجرای تکنیک تیپر در محیط هیپوکسی، نتایج چشمگیرتر شد. به عبارتی میزان کاهش شاخص پیش آپوپتوزی Bax/Bcl2 ۷۱ درصد و افزایش جمعیت نموسیت-۱ حدود ۹ درصد بود که نشان از تاثیر تعاملی مفید کاهش شدت تمرین و عصاره پرسیاوش در بهبود شاخص آپوپتوزی و ریمدلینگ حبابچه های ریوی دارد.

شاید بتوان بخشی از اثرات تعدیل کنندگی تیپر بر روی شاخص های آپوپتوز و ریمدلینگ ریه را با نقش های ضد اکسایشی و ضد التهابی تیپر توجیه کرد. در این راستا یادگاری و همکاران(۱۳۹۵) نشان دادند تمرینات ورزشی بی هوازی و شدید قادر هستند پارانشیم ریه را به سمت التهاب و ریمدلینگ سوق دهند(۳۴). فرهنگی‌ملکی و همکاران (۲۰۰۹) کاهش معنی دار در غلظت سایتوکاین های پیش التهابی IL-1B، IL-6 و TNF-a پس از یک دوره تیپر در ورزشکاران را گزارش کردند(۲۰). گزارش شده سایتوکین‌های پیش التهابی از جمله عواملی هستند که منجر به القاء آپوپتوز می‌شوند(۴۰). همچنین پاپاکاستا و گلیسون[11](۲۰۱۳) در مقاله‌ی مروری خود، تاثیر تیپر بر عملکرد سیستم ایمنی را بررسی کردند. آنها تیپر را به عنوان یک راهکار مفید برای کاهش اختلالات سیستم ایمنی ناشی از ورزش شدید معرفی کردند. اکثر مطالعات گزارش کرده اند که تیپر با افزایش فعالیت آنابولیکی، کاهش استرس فیزیولوژیکی و ترمیم ایمنی مخاطی و عملکرد سیستم ایمنی همراه است(۴۱). لذا به نظر می رسد در این پژوهش نیز

[10] – Shin-Da lee

11- Papacosta and Gleeson

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

احتمالا تیپر توانسته است اختلالات سیستم ایمنی در بیان فاکتورهای پیش التهابی مختلف را متعادل کند و احتمالا با مهار بیان بیش از حد آنها در شرایط تمرین و هیپوکسی، به مهار سازوکارهای مرتبط با آپوپتوز و ریمدلینگ معیوب اپیتلیالی کمک کند(۴۲).

از سویی ارزیابی فیتوشیمیایی پرسیاوش نشان از حضور مجموعه ای از ترکیبات از جمله فلانوئیدها[12]، تری ترپنوئیدها[13]، پروپانوئیدها[14]، اولی آننس ها[15]، کربوهیدرات ها، کاروتنوئیدها[16] و آلاسایکلیس ها[17] در این گیاه دارویی دارد. همچنین برگ پرسیاوش دارای موسیلاژ[18]، قند، اسید گالیک[19]، تانن[20]، اسانس و ماده‌ای تلخ به نام کاپیلارین[21]است. بسیاری از ترکیبات یاد شده توانایی خنثی سازی رادیکال های آزاد و کاهش التهاب را دار هستند. در این راستا گزارش شد عصاره پرسیاوش توانایی مهار پر اکسیداسیون چربی و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم ها و همچنین افزایش محتوای گلوتاتیونی تام را دارد. TNF-α یکی از سایتوکاین های قوی در بروز آپوپتوز مرتبط با گیرنده های مرگ سلولی است. در تائید این فرضیات، مشاهده شد عصاره پرسیاوش توانایی مهار بیان TNF-α و IL-6 در مونوسیت/ماکروفاژ را دارد. گزارش شده که بخش مهمی از این تاثیرات مهاری ناشی از غیر فعال سازی NF-κB است(۲۶). مطالعات نشان می دهد p38[22] برای نسخه برداری NF-κB ناشی از تحریک TNF ضروری است. عنوان شده است که عصاره پرسیاوش ممکن است به طور انتخابی بر فسفریلاسیون p38 MAPK اثر گذار باشد و تاثیر مهاری بر NF-κB داشته باشد(۲۶).

نتیجه گیری

فواید بیشتر بهره گیری همزمان از کاهش شدت تمرین و مصرف پرسیاوش در کاهش آپوپتوز و ریمدلینگ اپیتلیالی حبابچه های ریوی به دنبال تمرین تناوبی شدید و قرارگیری در معرض هیپوکسی نتیجه مهم پژوهش حاضر محسوب می‌شود. همچنین با توجه به مقایسه یافته های این پژوهش با پژوهش های مشابه گذشته، به نظر می رسد جهت حمایت از فرایندهای رشد سلولی در حبابچه های ریوی و مهار فرایندهای پیش آپوپتوزی ناشی از قرارگیری در معرض هیپوکسی، استفاده همزمان از تکنیک تیپر شدت و عصاره پرسیاوش موثرتر از استفاده هرکدام به تنهایی است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مورد نیاز ستاد کل نیروهای مسلح (تاریخ تصویب:۱۳۹۵/۳/۱۷ ، کد طرح:۹۹۵۶۷۴) است که زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی ارتش (آجا) و با حمایت مالی آن و همچنین با مساعدت دانشگاه های مازندران و تبریز به سرانجام رسید. بدین وسیله از مساعدت اساتید و کارشناسان محترم مراکز نام برده تشکر و قدردانی بعمل می آید.

[12]- flavonoids
[13]- triterpenoids
[14]- phenylpropanoids
[15]- oleananes
[16]- carotenoids
[17]- alicyclics
[18] - Mucilage
[19]- Gallic acid
[20] - tannin
[21]- Capillarine
[22]- mitogen-activated protein kinases

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

Reference

1. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc 2001; 33: 393-6.
2. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. Mol Cancer 2010; 9: 135.
3. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9: 47-59.
4. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 2007; 87: 99-163.
5. Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. Appl Physiol Nutr Metab 2011; 36: 608-17.
6. Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. Exerc Immunol Rev 2014; 20: 117-34.
7. Ranjbar K, Nazem F, Nazari A, Golami MR. Effect of 10 weeks aerobic exercise training on left ventricular systolic function, Caspase-3 level and infarction size in myocardial infarction rat. Knowledge Health, J Shahroud Univ Med Sci 2015; 10: 20-9. [In Persian]
8. Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. FASEB J 1998; 12: 479-86.
9. Westergren-Thorsson G, Larsen K, Nihlberg K, Andersson-Sjöland A, Hallgren O, Marko-Varga G, et al. Pathological airway remodelling in inflammation. Clin Respir J 2010; 4: 1-8.
10. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. Respir Res 2001; 2: 33-46.
11. Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183: 152-6.
12. Jain M, Sznajder JI. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 202-5.
13. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. Scand J Med Sci Sports 2010; 20: 24-31.
14. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J, et al. Ethanol extract of Adiantum capillus-veneris L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. J Ethnopharmacol 2013; 147: 603-11.
15. Yadegari M, Mirdar S, Hamidian Gh. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. Daneshvar Med 2016; 23: 51-60. [In Persian]
16. Mirdar S, Arabzadeh E, Hamidian Gh. Effects of two and three weeks of tapering on lower respiratory tract in the maturing rat. Koomesh 2015; 16: 366-75. [In Persian]
17. Nilforoushzadeh MA, Javanmard SH, Ghanadian M, Asghari G, Jaffary F, Yakhdani AF, et al. The effects of Adiantum capillus-veneris on wound healing: An experimental in vitro evaluation. Int J Prev Med 2014; 5: 1261-8.
18. Schneider JP, Ochs M. Stereology of the lung. Methods Cell Biol 2013; 113: 257-94.
19. Ochs M, Mühlfeld C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013; 305: L15-22.
20. Hofman F. Immunohistochemistry. Curr Protoc Immunol 2002; 21: 21-4.

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.81]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 10:53 +0430 on Sunday July 8th 2018

21. Di Cataldo S, Ficarra E, Acquaviva A, Macii E. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. Comput Methods Programs Biomed 2010; 100: 1-15.
22. Wendakoon C, Calderon P, Gagnon D. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. J Med Act Plants 2012; 1: 60-8.
23. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidian Gh, Yousefpour M. Riyahi F. Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli, followed by six weeks of high intensity exercise training. Daneshvar Med 2016; 24: 31-40. [In Persian]
24. Lee SD, Kuo WW, Lin JA, Chu YF, Wang CK, Yeh YL, et al. Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. Int J Cardiol 2007; 116: 348-56.
25. Yadegari M, Mirdar S, Hamidian Gh, editors. The impact of three weeks taper in hypoxic environment on apoptotic index of Bax / Bcl2 and pulmonary alveolar epithelial cell population. Proceedings of 10th International Congress on Sport Science. 2017 April. 26-27, Tehran, Iran.
26. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J, et al. Ethanol extract of Adiantum capillus-veneris L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. J Ethnopharmacol 2013; 147: 603-11.

Archive of SID

www.SID.ir