Archive of SID



# تأثیر ۳ هفته کاهش بار تمرین در محیط هایپوکسی بر شاخص آپوپتوزی نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت سلول‌های اپیتلیالی حبابچه‌های ریوی

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

۱. دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، 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، بابلسر، ایران.
۴. استادیار، دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایه دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۴

## چکیده

**زمینه** هدف پژوهش حاضر بررسی تاثیر ۳ هفته کاهش بار تمرین در محیط هایپوکسی بر نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت سلول های اپیتلیالی حبابچه های ریوی بود.

**روش کار** ۳۵ سر موش صحرائی (سن ۴ هفته، وزن ۸± ۷۲ گرم) به ۵ گروه کنترل (۶ هفته)، تمرین (۶ هفته)، هایپوکسی (۳ هفته)، هایپوکسی کاهش بار (۳ هفته) و کنترل (۹ هفته) تقسیم شدند. نمونه ها پس از ۶ هفته تمرین تناوبی وارد هایپوکسی شده و ۳ هفته در آنجا زندگی کردند. گروه دیگری همزمان با قرارگیری در محیط هایپوکسی، به اجرای تمرینات تناوبی با شدت کمتر( کاهش بار) پرداختند. نسبت Bax/Bcl2 حبابچه های ریه با روش ایمونوهیستوشیمی و جمعیت نموسیت-۱ و نموسیت-۲ حبابچه های ریوی با روش استریولوژی اندازه گیری شد.

**یافته‌ها** پس از ۶ هفته تمرین تناوبی، نسبت **Bax/Bcl2** و جمعیت نموسیت-۲ افزایش و جمعیت نموسیت-۱ کاهش یافت($P\leq ۰/۰۵$). ۳ هفته هایپوکسی سبب کاهش نسبت **Bax/Bcl2** و کاهش جمعیت نموسیت-۱ در مقایسه با گروه تمرین ۶ هفته شد($P\leq ۰/۰۵$). ۳ هفته کاهش بار تمرین در گروه هایپوکسی، سبب کاهش نسبت **Bax/Bcl2**، کاهش نموسیت-۲ و افزایش نموسیت-۱ در مقایسه با گروه هایپوکسی شد ($P\leq ۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری** به نظر می رسد تمرین تناوبی شدید و هایپوکسی متعاقب آن می تواند آپوپتوز حبابچه های ریوی را افزایش دهد. همچنین به نظر می رسد تکنیک کاهش بار تمرین ابزاری کارآمد جهت کاهش آپوپتوز در ریه است.

**کلیدواژه‌ها:**
تمرین تناوبی شدید، نموسیت، هایپوکسی، کاهش بار، آپوپتوز.

## ۱. مقدمه

قرارگیری طولانی‌مدت در معرض هایپوکسی ممکن است اثرات تخریبی و مرتبط با مرگ سلولی را درپی داشته باشد [۱]. از سوی دیگر گزارش شده که تمرینات ورزشی با شدت بالا ممکن است منجر به اختلال در هموستاز کل بدن شود.

* **نویسندهٔ مسئول: مهدی یادگاری**
**نشانی:** مازندران، بابلسر، بلوار دانشگاه، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

**تلفن:** ۰۹۳۸۷۶۷۷۵۰۱ **دورنگار:**
**رایانه:** mehdi.sport313@yahoo.com
**شناسه ORCID:** 0000-0001-6442-4863
**شناسه ORCID نویسندهٔ اول:** 0000-0001-6442-4863

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۸، ص ۳۹۲-۴۰۲
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

www.SID.ir

Archive of SID



فعالیت ورزشی شدید اغلب با تولید مقادیر زیادی از رادیکال-های آزاد اکسیژن همراه است که می‌تواند به ساختار سلولی مانند DNA[1] آسیب بزند. آسیب DNA در بسیاری از ارگان‌ها ازجمله ریه به آپوپتوز[2] منجر می‌شود [۲]. آپوپتوز نقش اساسی در رشد، پاسخ‌های ایمنی و مهار تکثیر سلول‌های غیرطبیعی در موجودات زنده دارد. همچنین روش مهمی است که اندام‌ها می‌توانند مقدار ثابتی از سلول‌ها را در بافت مشخص حفظ کنند [۳]. بروز آپوپتوز ممکن است با شاخص-های ساختاری نیز همراه باشد که ازجمله شاخص‌های ساختاری و مورفولوژیک آن می‌توان به کاهش جمعیت سلولی در بافت‌های مختلف اشاره کرد [۴]. سلول‌های اپیتلیالی حبابچه‌های ریوی (نموسیت‌های ۱ و ۲) واحدهایی کارآمد در تبادل گاز و حفظ یک‌پارچگی سلول حبابچه‌ای هستند که تعداد و نسبت آن‌ها نقش مؤثری در سلامت پارانشیم ریوی ایفا می‌کند. یولی[3] و همکاران (۱۹۹۶) آپوپتوز نموسیت‌های۲ را در آسیب‌های حاد ریه بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد تکثیر نموسیت‌های۲ در طول مراحل اولیهٔ آسیب حاد ریه اتفاق می‌افتد و براساس وسعت و زمان تغییرپذیر است [۵]. درپی مراحل حاد آسیب ریه، آپوپتوز نموسیت‌ها مسئول اصلی ازبین رفتن این سلول‌هاست. چارچوب زمانی واکنش‌های آپوپتوزی متغیر است و به‌احتمال زیاد به علت خاص و میزان آسیب بستگی دارد. در مراحل مزمن آپوپتوز نموسیتی، جمعیت نموسیت۲ به‌طور مداوم گسترش می‌یابد؛ ولی مقدار آن کمتر از مرحلهٔ اول آسیب حاد ریه است و مقدار آپوپتوز به حداقل می‌رسد [۶].

سلول‌های پارانشیمی ریه ممکن است به میزان سریع تحت فشار هایپوکسی دستخوش آپوپتوز شوند. درمقابل این گزارش، مشاهده شده است که هیچ افزایشی در آپوپتوز سلول های بافت پوششی با هایپوکسی وجود ندارد. آپوپتوز ناشی از هایپوکسی در ریه، پیامدهای بالینی برای بیماری‌های حاد و مزمن ریه دارد [۱].

پروتئین‌های خانوادهٔ Bcl-2 به‌عنوان یک نقطهٔ کنترلی بین سطح سلول و سیگنال‌های درونی جهت شکل‌گیری آپوپتوزوم و فعال‌سازی آبشار کاسپاسی، نقشی حیاتی برعهده دارند [۵]. شاخصی که اهمیت زیادی در تشخیص شرایط آپوپتوزی بافت دارد، نسبت Bax/Bcl-2 است که اگر افزایش یابد، حاکی از پیش‌بُرد آپوپتوز است و اگر کاهش یابد، نشان از کاهش رخداد آپوپتوز دارد. این نسبت نزدیک‌ترین ارتباط را با تعیین ادامهٔ حیات یا مرگ آپوپتوزی سلول‌ها دارد [۷ـ۸].

از سوی دیگر بسیاری از ورزشکاران که برای رقابت مهمی آماده می‌شوند، حداکثر عملکرد را درپی یک دورهٔ تمرینی شدید و متعاقب یک کاهش مشخص در بار و یا شدت تمرینی به‌دست می‌آورند که این دوره به کاهش بار یاد می‌شود [۹].

با توجه به گزارش‌های موجود که بیانگر تأثیرات التهابی ـ آپوپتوزی تمرینات شدید در بافت ریه هستند [۱۰ـ۱۱] و همچنین نظر به اینکه هایپوکسی مزمن می‌تواند به‌طور بالقوه بافت را به‌سمت آپوپتوز پیش ببرد [۱۲]، محققان در این پژوهش به‌دنبال پاسخ این سؤال بودند که یک دوره هایپوکسی مزمن در نمونه‌های تمرین‌دیده چه تأثیری بر نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت نموسیت‌های حبابچه‌های ریوی دارد. همچنین در مطالعات پیشین به‌وضوح بر نقش کاهش بار تمرین در بهبود عملکرد و کاهش سطوح التهابی سرمی صحه گذاشته شده است [۱۳ـ۱۴]. اما تاکنون تأثیر این الگوی تمرینی بر شاخص‌های آپوپتوتیک و ساختاری ریه بررسی نشده است. بنابراین پژوهشگر می‌کوشد تا به اثرات یک دوره کاهش بار تمرین در محیط هایپوکسی بر نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت نموسیت حبابچه‌های ریوی پی ببرد.

## ۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش حاضر را ۳۵ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزن ۹gr ± ۷۲) تشکیل دادند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند. این نمونه‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه، شامل کنترل ۶ هفته (۷ سر)، کنترل ۹ هفته (۷ سر)، تمرین ۶ هفته (۷ سر)، هایپوکسی (۷ سر) و هایپوکسی کاهش بار (۷ سر)، تقسیم شدند. نمونه‌ها از نظر سلامت بدنی کاملاً سالم بودند و هیچ گونه سابقهٔ بیماری نداشتند. در طی پژوهش، غذای استاندارد پلت و آب به‌صورت آزاد دراختیار نمونه‌ها قرار گرفت. قالب اجرای پژوهش بدین شکل بود که در ابتدا نمونه‌ها به ۲ گروه تمرین (۲۱ سر) و کنترل (۱۴ سر) تقسیم شدند. نمونه‌های گروه تمرین پس از مرحلهٔ آشناسازی با دویدن روی تردمیل، وارد برنامهٔ تمرین تناوبی شدند. مرحلهٔ آشناسازی شامل ۴ روز برنامهٔ تمرین تناوبی با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر بر دقیقه مطابق الگوی برنامهٔ تمرینی تناوبی فزاینده اجرا شد. برنامهٔ تمرین تناوبی شدید به‌صورت ۱۰ تکرار یک‌دقیقه‌ای و استراحت فعال دودقیقه‌ای انجام می‌شد؛ به‌گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود و کل تمرین روزانه

1. Deoxyribonucleic acid
2. Apoptosis
3. Youle



www.SID.ir

Archive of SID



برای هر رت ۳۰ دقیقه طول می‌کشید. نمونه‌ها ۴ و ۵ جلسه در هفته به‌ترتیب در مراحل آماده‌سازی و دورهٔ برنامهٔ اصلی ورزشی تمرین کردند. برنامهٔ تمرین تناوبی فزاینده با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع شد و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه (تمرین شدید، ۱۸۵٪ Vo2max) در پایان هفتهٔ ششم پایان یافت. به غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن درنظرگرفته شد [۱۵ـ۱۷]. پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، یک گروه از نمونه‌های تمرین (۷ سر) و گروه کنترل ۶ هفته کُشته شدند و ۱۴ سر باقی‌مانده به فاز دوم پژوهش راه یافتند که ۳ هفته ادامه داشت. در طی این ۳ هفته، ۷ سر باقی مانده از گروه تمرین برنامهٔ تمرینی خود را با شدت کمتر از برنامهٔ انتهای ۶ هفته تمرین (سرعت دویدن کمتر) اجرا کردند. در این مرحله، شدت دویدن از ۷۰ متر در دقیقه به ۵۰ متر در دقیقه رسید (معادل ۳۰٪ کاهش در شدت اوج) (تمرین شدید، ۱۴۰٪ Vo2max) و بقیهٔ شرایط اجرای پروتکل مانند مرحلهٔ قبل بود [۱۸]. در پایان این ۳ هفته نیز نمونه‌های تمرین و کنترل کُشته و بافت ریهٔ همگی آن‌ها جداسازی شد.

**جدول ۱. برنامه تمرین ورزشی تناوبی**

| هفته | آشنایی | اول | دوم | سوم | چهارم | پنجم | ششم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| سن | ۶ هفته | | | | | | |
| سرعت به متر در دقیقه | ۱۰-۲۵ | ۲۵-۳۵ | ۳۵-۴۵ | ۴۵- ۵۵ | ۵۵-۶۵ | ۶۵-۷۰ | ۶۵-۷۰ |
| مدت به دقیقه | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| استراحت بین تکرار ها | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ |
| تعداد تکرار | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ |
| تعداد جلسه در هفته | ۴ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ |

نمونه‌گیری بافتی از ریهٔ رت‌ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دورهٔ تمرین تناوبی و ۴۸ ساعت پس اتمام دورهٔ هایپوکسی انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین[1] (۵۰ـ۳۰ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم) و زایلازین[2] (۵ـ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش و بلافاصله کل بافت ریهٔ سمت چپ خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. به‌منظور مطالعهٔ تغییرات ساختاری بافت ریه در قسمت‌های تبادلی، از هر ریه ۲۰ تا ۲۵ برش ضخیم جهت مطالعات استریولوژیک انتخاب شد و به‌روش استاندار و معمول با رنگ هماتوکسیلین ـ ائوزین (H&E) مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت [۱۷]. جمعیت سلول‌های اپیتلیالی نوع ۱ (نموسیت۱) و نوع ۲ حبابچه‌های ریوی (نموسیت۲) در بافت ریهٔ چپ با استفاده از روش‌های استریولوژیک تخمین زده شد [۱۹]. تمام مطالعات استریولوژیک با روش اوپتیکال فراکشنیتور و با استفاده از میکروسکوپ متصل به میکرواریتور، دوربین و سیستم تمام‌دیجیتال و نسخهٔ شمارهٔ ۹ نرم‌افزار Stereo-investigator انجام شد.

از هر ریه به‌طور تصادفی پنج برش نازک غیرمتوالی به ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bcl-2 و پنج برش نازک دیگر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bax انتخاب شد. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به‌روش انویژن[3] و با استفاده از آنتی بادی اختصاصی Bcl-2 کد 044-436 ساخت شرکت milli pore و Bax کد 69643 ساخت شرکت Abcam انجام شد. پس از آماده‌سازی بافت، آنتی بادی اولیه رقیق شد (۱ به ۱۰۰) با PBS به بافت اضافه گردید و به‌مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ـ۸ درجه قرار داده شد. درنهایت به بافت‌ها آنتی بادی ثانویهٔ کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) با رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه گردید و انکوبه شد. بعد از آن به نمونه‌ها PI اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه روی نمونه‌ها PBS ریخته شد [۲۰ـ۲۱]. درنهایت با میکروسکوپ فلورسانت و نسخهٔ ۱/۴۹ نرم‌افزار ImageJ سلول‌ها ارزیابی و شمارش، و به‌صورت داده‌های عددی توصیف شدند [۲۲].

برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه‌ها از آمار توصیفی و برای ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کلوموگروف ـ اسمیرنوف (K-S) استفاده شد. آزمون آمار استنباطی تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی LSD نیز جهت مقایسهٔ میانگین گروه‌ها به‌کار رفت. تمام محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۲۱ و در سطح معناداری $P\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

## ۳. یافته ها

1. Ketamine
2. Xylazine
3. Envision



www.SID.ir

Archive of SID



دربارهٔ نسبت Bax/Bcl2 حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها به قرار زیر بود:

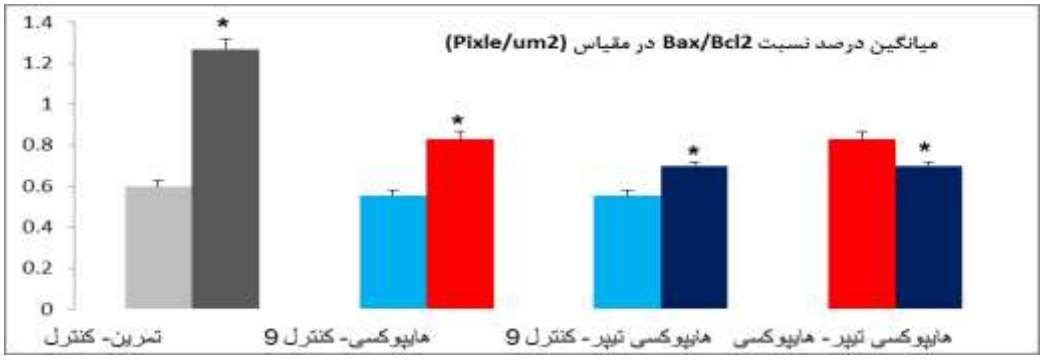
پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معنادار افزایش یافت (P≤۰/۰۵، ۱۱۲٪). قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب کاهش معنادار آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد (P≤۰/۰۵، ۳۴٪). اجرای کاهش بار در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی کاهش بار) سبب کاهش معنادار آن نسبت به محیط هایپوکسی محض شد (P≤۰/۰۵، ۱۵٪). میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته بالاتر بود (P≤۰/۰۵) (شکل ۱).

دربارهٔ شاخص جمعیت نموسیت۱ حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها به این شرح بود:

پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، به‌طور معناداری کاهش یافت (P≤۰/۰۵، ۵/۴۰٪). قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب کاهش معنادار آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد (P≤۰/۰۵، ۱۳٪). اجرای کاهش بار در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی کاهش بار) سبب افزایش معنادار آن نسبت به محیط هایپوکسی محض شد (P≤۰/۰۵، ۷/۵۹٪). میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته کمتر بود (P≤۰/۰۵) (شکل ۲).

دربارهٔ شاخص جمعیت نموسیت۲ حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها عبارت بود از:

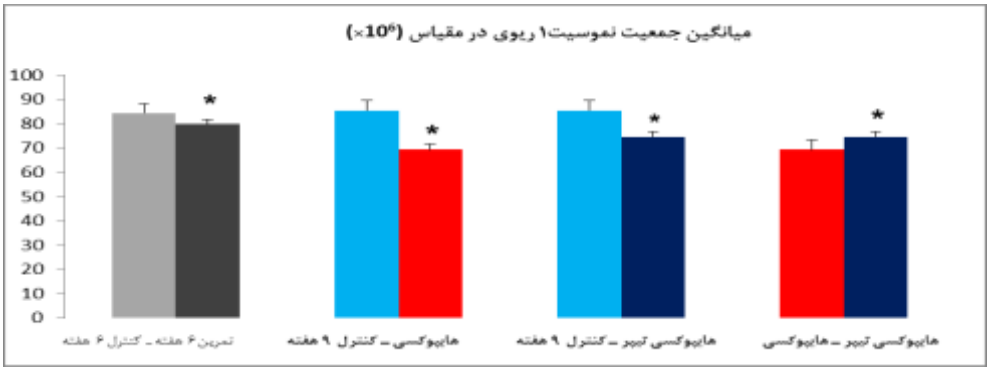
پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معنادار افزایش یافت (P≤۰/۰۵، ۱۲٪). قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب افزایش خفیف آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد (P>۰/۰۵، ۱/۰۱٪). اجرای کاهش بار در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی کاهش بار) سبب کاهش معنادار آن نسبت به محیط هایپوکسی محض شد (P≤۰/۰۵، ۶/۴٪). میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته بالاتر بود (P≤۰/۰۵) (شکل ۳).




**نمودار ۱. میانگین و خطای استاندارد نسبت Bax/Bcl2 حبابچهٔ ریوی در گروه‌های پژوهش**

**داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بین گروه‌های کنترل ۶ و ۹ هفته با گروه‌های تجربی آن‌ها تفاوت معنادار وجود دارد. همچنین بین گروه هایپوکسی کاهش بار و هایپوکسی تفاوت معنادار هست.**

*** نشانهٔ تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه**




**نمودار ۲. میانگین و خطای استاندارد جمعیت نموسیت۱ حبابچهٔ ریوی در گروه‌های پژوهش**

**داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد و در مقیاس ($10^6$×) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بین گروه‌های کنترل ۶ و ۹ هفته با گروه های تجربی آن‌ها تفاوت معنادار وجود دارد. همچنین بین گروه هایپوکسی کاهش بار و هایپوکسی تفاوت معنادار هست**

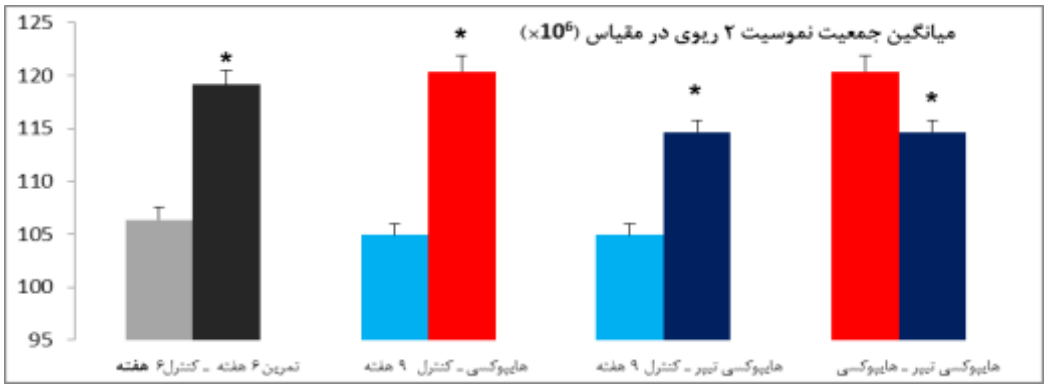
*** نشانهٔ تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه**



www.SID.ir

Archive of SID

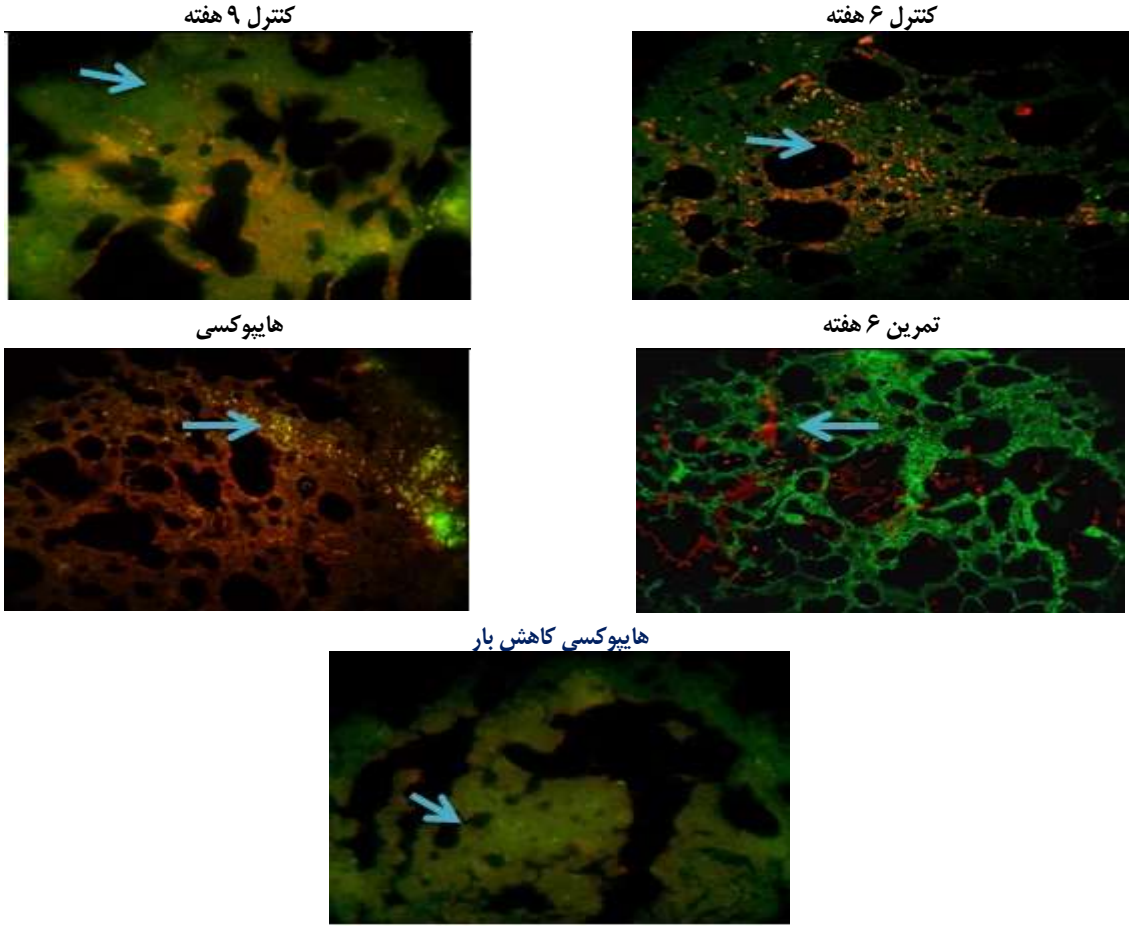





**نمودار ۳. میانگین و خطای استاندارد جمعیت نموسیت۲ حبابچهٔ ریوی در گروه‌های پژوهش**

**داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد و در مقیاس ($10^6$×) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بین گروه‌های کنترل ۶ و ۹ هفته با گروه های تجربی آن‌ها تفاوت معنادار وجود دارد. همچنین بین گروه هایپوکسی کاهش بار و هایپوکسی تفاوت معنادار هست**

*** نشانهٔ تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه**




**شکل ۴. مجموعهٔ تصاویر مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl-2 در گروه‌های پژوهش**

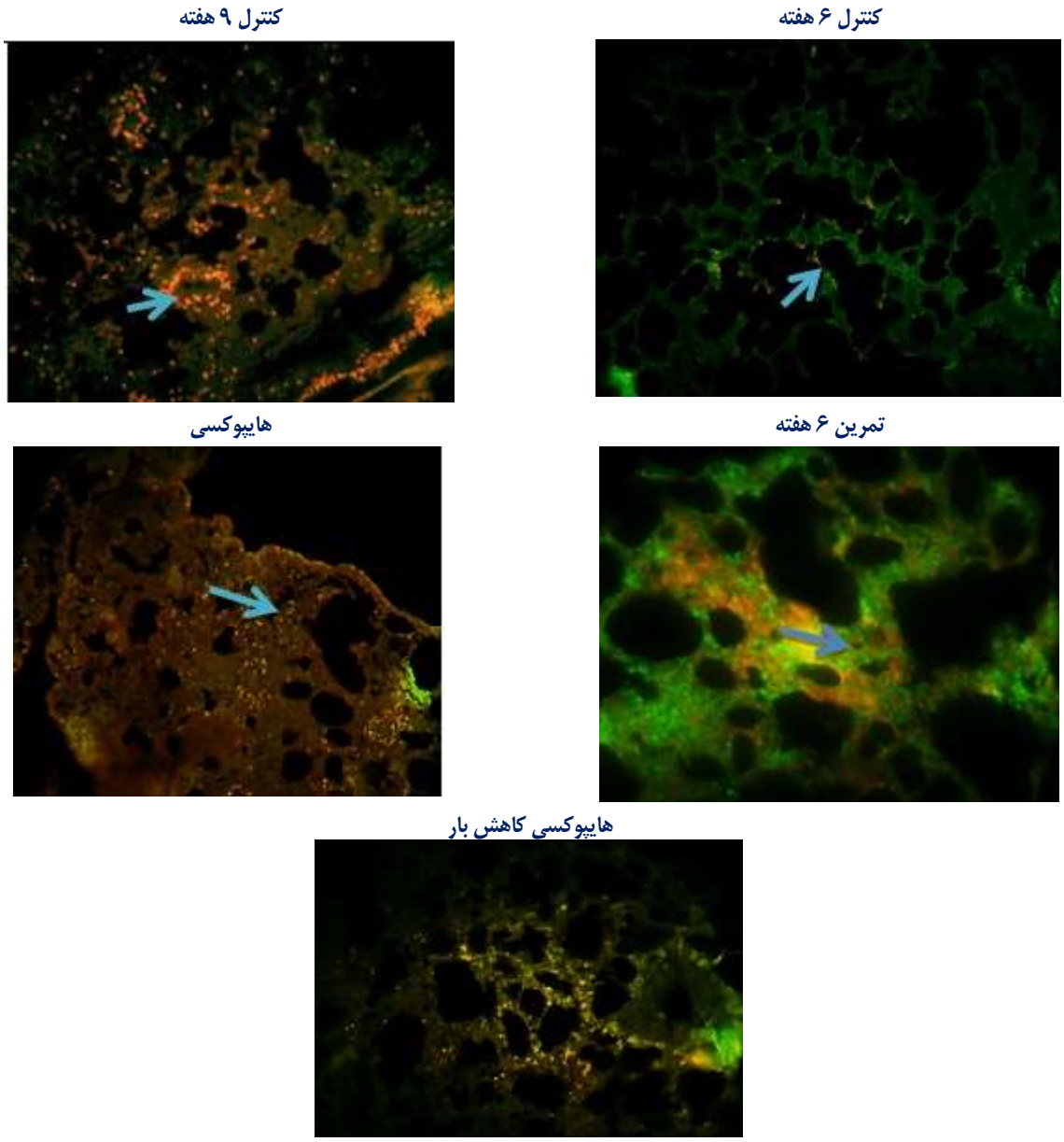
آنتی بادی ثانویه Bcl-2 به رنگ FITC متصل شده و هستهٔ سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگ‌نمایی تصاویر در مقیاس 200× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی بادی پروتئین Bcl-2 را نشان می‌دهد.



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۵. مجموعهٔ تصاویر مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bax در گروه‌های پژوهش**

آنتی بادی ثانویه **Bax** به رنگ **FITC** متصل شده و هسته سلول با رنگ **PI** رنگ‌آمیزی شده است. بزرگ‌نمایی تصاویر در مقیاس ×۲۰۰ صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول ها به آنتی بادی پروتئین **Bax** را نشان می‌دهد.

## ٤. بحث و نتیجه‌گیری

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، ۳ هفته هایپوکسی و ۳ هفته کاهش بار تمرین در محیط هایپوکسی بر شاخص آپوپتوزی **Bax/Bcl2** و جمعیت سلول‌های اپیتلیالی (نموسیت۱ و ۲) حبابچه¬های ریوی رت‌های نر ویستار و سالم بود. به‌طور خلاصه در این پژوهش مشاهده شد ۶ هفته تمرین تناوبی شدید نسبت **Bax/Bcl2** و جمعیت نموسیت۲ حبابچه‌های ریوی را افزایش داد و درمقابل به کاهش جمعیت نموسیت۱ منجر شد. همچنین ۳ هفته قرارگیری در معرض هایپوکسی منجر به تشدید افزایش جمعیت نموسیت۲ و کاهش جمعیت نموسیت۱ گردید که بهره‌گیری از کاهش بار منجر به افزایش معنادار جمعیت نموسیت۱، کاهش معنادار جمعیت نموسیت۲ و کاهش نسبت **Bax/Bcl2** حبابچه‌های ریوی نسبت به گروه هایپوکسی شد.

فعالیت ورزشی بیش از حد یا فعالیت ورزشی شدید ممکن



www.SID.ir

Archive of SID



است سبب آسیب‌های¬ مکانیکی زیادی شود که به پاسخ¬های التهابی، آپوپتوز و نکروز می‌انجامد. فانیوف و لیوونبورغ [۲۳] در طی مطالعات خود دریافتند که تمرین ورزشی باعث القای آپوپتوز می¬شود که روندی طبیعی برای ازبین بردن سلول‌های آسیب‌دیده است. اگرچه مکانیسم دقیق آپوپتوز با ورزش هنوز مشخص نیست، ممکن است با توجه به نوع سلول و نوع تحریکات متفاوت باشد. شاخصی که سطح آن اهمیت بسیاری در تشخیص شرایط آپوپتوزی بافت دارد، نسبت **Bax/Bcl-2** است که اگر افزایش یابد، حاکی از پیش‌بُرد آپوپتوز است و اگر کاهش یابد، نشان از کاهش رخداد آپوپتوز دارد [۷، ۲۴ـ۲۵]. در پژوهش حاضر، نسبت **Bax/Bcl-2** حبابچهٔ ریوی پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشانگر افزایش فرایندهای پیش‌برندهٔ مرگ سلولی در ریه است. بررسی نتایج شمارش سلولی اپتلیال در گروه تمرین ۶ هفته نیز از این موضوع حمایت می‌کند.

به‌نظر می‌رسد استرس ایجادشدهٔ ناشی از تمرین شدید تناوبی با افزایش فاکتورهای آپوپتوز مثل سایتوکین‌های پیش‌التهابی، گلوکوکورتیکوئیدها، **ROS**، فاکتورهای التهابی و افزایش کنترل‌نشدهٔ کلسیم سیتوزولی همراه بوده و سلول‌ها را به‌سمت آپوپتوز سوق داده است [۲۶ـ۲۷]. به‌عبارتی به‌نظر می‌رسد با افزایش فرایندهای آپوپتوتیک ناشی از ورزش، نموسیت‌های۱ دچار مرگ سلولی می‌شود و از این رهگذر سطح حبابچهٔ ریوی دچار کاهش و درنهایت سطح تنفس کم شده باشد. شمارش نموسیت‌های۲ نشان داد پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید میزان آن‌ها افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشان‌دهندهٔ تلاش ریه در جبران نموسیت‌های۱ ازدست‌رفته و حفظ سطح تنفسی خود است [۲۸ـ۲۹]. در این راستا فیشر و همکاران [۳۰] نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول لنفوسیتی را درپی دارد.

در بخش هایپوکسی این مطالعه دیده شد که پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، قرارگیری در محیط هایپوکسی سبب کاهش نسبت **Bax/Bcl2** و کاهش جمعیت نموسیت۱ می‌شود. به‌نظر می‌رسد غیر از فعالیت پروتئین‌های ضدآپوپتوزی و پیش‌آپوپتوزی در تعیین مرگ یا حیات سلول‌ها، فاکتورهای دیگری نیز هستند که فعالیت آن‌ها در تعیین شرایط آپوپتوزی حائز اهمیت است. بااینکه نمونه¬های گروه هایپوکسی ۳ هفته در حالت غیرفعال به‌سر می¬بردند، شاخص **Bax/Bcl2** هنوز به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل ۹ هفته در سطح بالاتری قرار داشت. علاوه‌بر این، جمعیت نموسیت¬های۱ نیز هنوز به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترلی بود. با توجه به نتایج، اگرچه هایپوکسی قادر است اثرات آپوپتوتیک را القا یا حفظ کند [۳۱ـ۳۳]، شدت این تأثیرات از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید کمتر بوده است. احتمالاً چندگانه بودن سازوکارهای آپوپتوتیک در طی فعالیت ورزشی (کاهش سطح اکسیژن، استرس¬های مکانیکی، تهویه¬های شدید، اسیدوز عضلانی و...) [۲، ۷] نسبت به محیط هایپوکسی که عمدتاً موجب کاهش سطح اکسیژن در دسترس سلولی می‌شود [۳۴]، عامل تعدیل شاخص¬های آپوپتوزی در محیط هایپوکسی پس از ورزش بوده باشد. شین دا لی و همکاران [۳۵] اثرات هایپوکسی متناوب بلندمدت بر میتوکندری و مسیر آپوپتوزی وابسته به گیرندهٔ مرگ قلب نمونه‌های موش را بررسی کردند. محققان درنهایت گزارش کردند که مسیرهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری و مسیرهای آپوپتوزی وابسته به گیرندهٔ مرگ در قلب موش در شرایط هایپوکسی بلندمدت فعال می‌شوند.

شدت هایپوکسی تعیین می‌کند که آیا سلول با هایپوکسی سازگار می‌شود و زنده می¬ماند و یا دچار مرگ می‌شود [۳۱]. در این راستا گزارش شده است هایپوکسی می‌تواند سبب القای آپوپتوز از طریق نفوذپذیری غشای میتوکندری شود که سازوکار اصلی آن آزادسازی سیتوکروم **C** از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سیتوزول است. آپوپتوزی که در شرایط هایپوکسی رخ می‌دهد، بیشتر توسط مهار زنجیرهٔ انتقال الکترون از غشای داخلی میتوکندری صورت می‌گیرد. کمبود اکسیژن حمل‌ونقل پروتون را مهار می‌کند که درنتیجه کاهش پتانسیل غشا را درپی دارد. کاهش **ATP** به‌دست‌آمده از میتوکندری سبب فعال شدن پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مثل**Bax** و **Bad** می‌شود و درنهایت منجر به انتشار سیتوکروم **C** به داخل سیتوزول می‌گردد [۳۶].

از یافته‌های دیگر پژوهش حاضر کاهش معنادار نسبت **Bax/Bcl-2** در گروه هایپوکسی کاهش بار نسبت به گروه هایپوکسی بود. همسو با تغییرات پروتئینی مشاهده شد که در سطح سلولی نیز چنین تغییراتی با اجرای کاهش بار رقم خورد. به‌عبارتی دیده شد با اجرای کاهش بار در شرایط هایپوکسی جمعیت نموسیت۱ به‌طور معناداری نسبت به گروه هایپوکسی افزایش و جمعیت نموسیت۲ کاهش یافت. این یافته‌ها احتمالاً از نقش آنابولیکی و رشدی کاهش بار در شرایط تنش¬ اکسیژن هایپوکسی حمایت می‌کنند [۳۰ـ۳۱]. از آنجایی که نموسیت‌های۲ وظیفهٔ ساخت نموسیت۱ را برعهده دارند و با تکثیر خود به حفظ سطح تنفس حبابچه‌ای منجر می‌شوند، این کاهش احتمالاً دلیلی بر نزدیک شدن شرایط ریوی به حالت هموستازی است که در آن، مرگ نموسیت۱ کاهش می‌یابد و نموسیت‌های۲ مجبور نیستند با تکثیر جبرانی خود، جمعیت نموسیت۱ را درحد طبیعی حفظ کنند [۳۷].



www.SID.ir

Archive of SID



فرهنگی ¬ملکی و همکاران [۳۸] کاهش معنادار غلظت سایتوکاین‌های پیش‌التهابی **IL-1B**، **IL-6** و **TNF-a** پس از یک دوره کاهش بار در ورزشکاران را نشان دادند. در همین راستا گزارش شده سایتوکین¬های التهابی ازجمله عواملی هستند که منجر به القای آپوپتوز می¬شوند [۳۹]. همچنین پاپاکاستا و همکار [۴۰] در مقالهٔ مروری خود، تأثیر کاهش بار بر عملکرد سیستم ایمنی را بررسی کردند. آن‌ها کاهش بار را راهکاری مفید برای کاهش اختلالات سیستم ایمنی ناشی از ورزش شدید معرفی کردند. از سوی دیگر ایکویردو و همکاران [۴۱] گزارش کردند یک دوره کاهش بار پس از تمرینات قدرتی سبب افزایش سطح سرمی فاکتور رشد شبه‌انسولین ۱ (**IGF-1**) و پروتئین ناقل فاکتور رشد شبه‌انسولین (**IGFBP-3**) می‌شود. به‌عبارتی به‌نظر می‌رسد یک دوره کاهش بار این پتانسیل را دارد که شرایط فیزیولوژیک را به‌سمت سازوکارهای آنابولیکی (درمقابل شرایط کاتابولیسمی) سوق دهد و شرایط پایایی را برای رشد و تکثیر سلولی فراهم آورد. لذا از دلایل احتمالی دیگر تأثیر کاهش بار بر مهار فرایندهای پیش‌آپوپتوزی و رشد نموسیت‌های ۱ در پژوهش حاضر می‌توان به افزایش بیان هورمون رشد و فاکتور رشد شبه‌انسولینی ۱ اشاره کرد [۴۲].

به‌نظر می‌رسد پاسخ‌های مزمن آپوپتوتیک ریوی در پاسخ به تمرینات تناوبی شدید به‌گونهٔ دیگری است و آن‌هم افزایش فرایندهای پیش‌آپوپتوزی در مقایسه با فرایندهای رشدی است که موضوعی چالش‌برانگیز است. همچنین احتمالاً محیط هایپوکسی به‌عنوان محیطی تمرینی، کاری، حرفه‌ای و پذیرفته‌شده برای بسیاری از ورزشکان و نیروهای نظامی نیز دارای تأثیرات پیش‌آپوپتوزی مرتبط با مرگ سلول است. درنهایت اشاره می‌شود در دنیای علوم ورزشی حاضر، کسب سازگاری‌های رقابتی در بالاترین سطح ممکن با تمرینات شدید و محیط‌های نامتعارف فیزیولوژیکی همانند هایپوکسی پیوند خورده است؛ هرچند با عوارض جانبی همراه‌اند. پس بهره‌گیری از ملاحظات تمرینی و تغذیه‌ای ضروری رخ می‌نماید. به‌نظر می‌رسد کاهش بار تمرین راهکاری مناسب جهت تعدیل یا کاهش برخی از پاسخ‌های آپوپتوتیکی مزمن به تمرینات ورزشی شدید و تنش هایپوکسی است.

## تشکر و قدردانی

مطالعهٔ حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مورد نیاز ستاد کل نیروهای مسلح (با تأیید دانشکدهٔ پزشکی آجا به شمارهٔ ثبت ۹۹۵۶۷۴ در تاریخ ۱۳۹۵/۳/۱۷) است که زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی ارتش (آجا) و با همکاری دانشگاه‌های مازندران و تبریز به سرانجام رسید. بدین وسیله از مساعدت استادان و کارشناسان محترم مراکز نام‌برده تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

[1]. Jain M, Sznajder JI. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. Proceedings of the American Thoracic Society 2005; 2 (3): 202-5.
[2]. Podhorska-Okolow M, Dzlegiel P, Gomulkiewicz A, Kisiela D, Dolinska-Krajewska B, Jethon Z, et al. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors. Histology and histopathology 2006; 21 (4/6): 459.
[3]. Fleury C, Mignotte B, Vayssière J-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie 2002; 84 (2-3): 1. 43-31.
[4]. Kamal Ranjbar FN, Afshin Nazari, Mohammad Reza Golami. Effect of 10 Weeks Aerobic Exercise Training on Left Ventricular Systolic Function, Caspase-3 Level and Infarction Size in Myocardial Infarction Rat. Journal of Knowledge & Health of Shahroud University of Medical Sciences 2015; 10 (3): 20-9.
[5]. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology 2008; 9 (1): 47-59.
[6]. Barbas-Filho J, Ferreira M, Sesso A, Kairalla R ,Carvalho C, Capelozzi V. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). Journal of clinical pathology 2001; 54 (2): 132-38.
[7]. Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. Applied physiology, nutrition, and metabolism 2011; 36 (5): 608-17.
[8]. Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. Exercise immunology review 2014; 20.
[9]. Rietjens G, Keizer H, Kuipers H, Saris W. A reduction in training volume and intensity for 21 days does not impair performance in cyclists. British Journal of Sports Medicine 2001; 35 (6): 431-34.
[10]. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidiyan 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 Medicine 2016; 24 (129): 31-40.
[11]. Yadegari M, Riahi S, Mirdar SH, hamidiaan Gh, Mosadegh P. investigatingof IL-6 level and lung inflammatory cells after performing high-intensity interval training and Exposure to hypoxic environment. SJE 2016; 18 (3): 26-36.
[12]. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology 2007; 35. 516-495 (3).
[13]. Coutts AJ, Wallace L, Slattery K. Monitoring changes in performance, physiology, biochemistry, and psychology during overreaching and recovery in triathletes. International journal of sports medicine 2007; 28 (02): 125-34.
[14]. Bosquet L, Montpetit J, Arvisais D, Mujika I. Effects of tapering on performance: a meta-analysis. Medicine & Science in Sports & Exercise 2007; 39 (8): 1358-65.
[15]. Ogura Y, Naito H, Kurosaka M, Sugiura T, Junichiro A, Katamoto S. Sprint-interval training induces heat shock protein 72 in rat skeletal muscles. Journal of sports science & medicine 2006; 5 (2): 194.
[16]. Armstrong R, Laughlin MH. Rat muscle blood flows during high-speed locomotion. Journal of Applied Physiology 1985; 59 (4): 1322-28.
[17]. Yadegari M MS, Hamidian Gh. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. Daneshvar Medicine Journal 2016; 23 (124): 56-60. (persian)



www.SID.ir

Archive of SID



[18]. Mirdar S, Arabzadeh E, Hamidian G. Effects of two and three weeks of tapering on lower respiratory tract in the maturing rat. Koomesh 2015; 16 (3). (persian)
[19]. Ochs M, Mühlfeld C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 2013; 305 (1): L15-L22.
[20]. Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. Current protocols in immunology 2013; 103 (1): 21.4. 1-4. 6.
[21]. [21] Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. IUBMB life 2009; 61 (9): 915-22.
[22]. Di Cataldo S, Ficarra E, Acquaviva A, Macii E. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. Computer methods and programs in biomedicine 2010; 100 (1): 1-15.
[23]. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Medicine & Science in Sports & Exercise 2001; 33 (3): 393-96.
[24]. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology 2008; 9 (1): 47.
[25]. Krüger K, Agnischock S, Lechtermann A, Tiwari S, Mishra M, Pilat C, et al. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. Journal of Applied Physiology 2011; 110 (5): 1226-32.
[26]. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Medicine and science in sports and exercise 2001; 33 (3): 393-96.
[27]. Arslan S, Erdem S, Sivri A, Hasçelik Z, Tan E. Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam. Rheumatology international 2002; 21 (4): 133-36.
[28]. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. Respirology. 2006;11(1).
[29]. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. Respiratory research 2001; 2 (1): 33.
[30]. Fisher G, Schwartz DD, Quindry J, Barberio MD, Foster EB, Jones KW, et al. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. Journal of Applied Physiology 2010; 110 (3):730-37.
[31]. Greijer A, Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. Journal of clinical pathology. 2004;57(10):1009-14.
[32]. [32] Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1α as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene 2001; 20 (41): 5779.
[33]. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. Biochemical and biophysical research communications 2003; 308 (4): 990-94.
[34]. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. The role of K+ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. Microcirculation 2006; 13 (8): 615-32.
[35]. Lee S-D, Kuo W-W ,Lin JA, Chu Y-F, Wang C-K, Yeh Y-L, et al. Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. International journal of cardiology 2007; 116 (3): 348-56.
[36]. Korsmeyer S, Wei M, Saito M, Weiler S, Oh K, Schlesinger P. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell death and differentiation 2000; 7 (12): 1166.
[37]. Anthony LM. Junquira's Basic Histology Text and Atlas. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas [Internet] McGraw-Hill 2010.
[38]. Farhangimaleki N, Zehsaz F, Tiidus PM. The effect of tapering period on plasma pro-inflammatory cytokine levels and performance in elite male cyclists. Journal of sports science & medicine 2009; 8 (4): 600.
[39]. Souza KL, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. Journal of Endocrinology 2008; 197 (1): 139-50.
[40]. Papacosta E, Gleeson M. Effects of intensified training and taper on immune function. Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. 2013; 27 (1): 159-76.
[41]. Izquierdo M, Ibañez J, Gonzalez-Badillo JJ, Ratamess NA. Detraining and tapering effects on hormonal responses and strength performance. Journal of Strength and Conditioning Research 2007; 21 (3):768.
[42]. Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, Chaudhrai A, Murlasits ZS. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles . American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2003; 284 (2): R540-R9.



www.SID.ir

Archive of SID



# The Effect of Three Weeks Taper in Hypoxic Environment on Apoptotic Index of Bax / Bcl2 and Population of Alveolar Epithelial Cells

**Mehdi Yadegari[*1], Simin Riahy[2], Shadmehr Mirdar[3], Gholamreza Hamidian[4]**

1. PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of azandaran,Mazandaran,Iran.
2. PhD of Exercise Physiology, Researcher of Research Center of Epidemiology Science and Technology, Medical Sciences Army University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, aculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.
4. Assistant Professor, PhD of Histological, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

## Abstract

**Background** This study investigated the effect of 3-weeks Taper in hypoxic environment on the ratio of Bax / Bcl2 and alveolar epithelial cells populations in the lung.

**Materials & Methods** Thirty-five rats (4 weeks old, weighing 8 ± 72 g) were divided in five groups: control (6 weeks), training (6 weeks), hypoxia (3 weeks), hypoxia - taper (3 weeks) and control (9 weeks). Samples entered to the hypoxia after six weeks of interval training and lived there for 3 weeks. another group with exposure to hypoxic environment , implementation Taper technique.Bax/Bcl2 ratio of lung measured by immunohistochemistry and type II and type I pneumocytes population of pulmonary alveolar measured with stereologically.

**Results** Bax/Bcl2 ratio and type II pneumocytes population Increased and type I pneumocytes population Decreased After six weeks high intensity interval training (P≤0.5).

Bax/Bcl2 ratio and type I pneumocytes population of hypoxia group decreased compared with training group (P≤0.5). three weeks taper in hypoxia group, Led to decrease of Bax/Bcl2 ratio , type II population pneumocytes and Increase of type I pneumocytes (P≤0.5).

**Conclusion** It seems high intensity interval training and subsequent hypoxia can increase pulmonary alveolar apoptosis. Also appears taper is a Efficient Method to decrease of apoptosis lung.

**Received:** 2017/12/30
**Accepted:** 2018/19/15

**Keywords:** High intensity interval Training, Pneumocytes, Hypoxia, Taper, Apoptosis.



www.SID.ir