

تأثیر ۳ هفته کاهش بار تمرین در محیط هایپوکسی بر شاخص آپوتوزی نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت سلول های اپیتلیالی حبابچه های ریوی

مهدی یادگاری^{۱*}، سیمین ریاحی^۲، شادمهر میردار^۳، غلامرضا حمیدیان^۴

۱. دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده 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 بافت شناسی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

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

زمینه هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر 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 صحرایی (سن ۴ هفته، وزن 72 ± 8 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.

یافته ها پس از ۶ هفته تمرین تناوبی، نسبت Bax/Bcl2 و جمعیت نموسیت-۲ افزایش و جمعیت نموسیت-۱ کاهش یافت ($P \leq 0/05$). ۳ هفته هایپوکسی سبب کاهش نسبت Bax/Bcl2 و کاهش جمعیت نموسیت-۱ در مقایسه با گروه تمرین ۶ هفته شد ($P \leq 0/05$). 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 ($P \leq 0/05$).

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

کلیدواژه ها:

تمرین تناوبی شدید، نموسیت، هایپوکسی، کاهش بار، آپوتوز.

۱. مقدمه

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

قرارگیری طولانی مدت در معرض هایپوکسی ممکن است

* نویسنده مسئول: مهدی یادگاری

نشانی: مازندران، بابلسر، بلوار دانشگاه، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

دورنگار:

تلفن: ۰۹۳۸۷۶۷۷۵۰۱

رایانه: mehdi.sport313@yahoo.com

شناسه ORCID: 0000-0001-6442-4863

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-6442-4863

آپوپتوز دارد. این نسبت نزدیک‌ترین ارتباط را با تعیین ادامه حیات یا مرگ آپوپتوزی سلول‌ها دارد [۸-۷].

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

با توجه به گزارش‌های موجود که بیانگر تأثیرات التهابی - آپوپتوزی تمرینات شدید در بافت ریه هستند [۱۰-۱۱] و همچنین نظر به اینکه هایپوکسی مزمن می‌تواند به طور بالقوه بافت را به سمت آپوپتوز پیش ببرد [۱۲]، محققان در این پژوهش به دنبال 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 به وضوح بر نقش کاهش بار تمرین در بهبود عملکرد و کاهش سطوح التهابی سرمی صحت گذاشته شده است [۱۳-۱۴]. 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 9 ± 72 gr) 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 سابقه بیماری نداشتند. در طی پژوهش، غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار 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 مرحله آشناسازی با دویدن روی تردمیل، وارد برنامه تمرین تناوبی شدند. مرحله آشناسازی شامل ۴ روز برنامه تمرین تناوبی با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر بر دقیقه مطابق الگوی برنامه تمرینی تناوبی فزاینده اجرا شد. برنامه تمرین تناوبی شدید به صورت ۱۰ تکرار یک دقیقه‌ای و استراحت فعال دودقیقه‌ای انجام می‌شد؛ به گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود و کل تمرین روزانه

فعالیت ورزشی شدید اغلب با تولید مقادیر زیادی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن همراه است که می‌تواند به ساختار سلولی مانند DNA آسیب بزند. آسیب DNA در بسیاری از ارگان‌ها از جمله ریه به آپوپتوز^۲ 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 شاخص‌های ساختاری نیز همراه باشد که از جمله 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 یک پارچگی سلول حبابچه‌ای هستند که تعداد و نسبت آن‌ها نقش مؤثری در سلامت پارانشیم ریوی ایفا می‌کند. یولی^۳ و همکاران (۱۹۹۶) آپوپتوز نموسیت‌های ۲ را در آسیب‌های حاد ریه بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد تکثیر نموسیت‌های ۲ در طول مراحل اولیه آسیب حاد ریه اتفاق می‌افتد و براساس وسعت و زمان تغییرپذیر است [۵]. در پی مراحل حاد آسیب ریه، آپوپتوز نموسیت‌ها مسئول اصلی از بین رفتن این سلول‌هاست. چارچوب زمانی واکنش‌های آپوپتوزی متغیر است و به احتمال زیاد به علت خاص و میزان آسیب بستگی دارد. در مراحل مزمن آپوپتوز نموسیتی، جمعیت نموسیت ۲ به طور مداوم گسترش می‌یابد؛ ولی مقدار آن کمتر از مرحله 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. در مقابل این گزارش، مشاهده شده است که هیچ افزایشی در آپوپتوز سلول‌های بافت پوششی با هایپوکسی وجود ندارد. آپوپتوز ناشی از هایپوکسی در ریه، پیامدهای بالینی برای بیماری‌های حاد و مزمن ریه دارد [۱].

پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به عنوان یک نقطه 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 پیش‌برد آپوپتوز است و اگر کاهش یابد، نشان از کاهش رخداد

1. Deoxyribonucleic acid
2. Apoptosis
3. Youle

یافتند که ۳ هفته ادامه داشت. در طی این ۳ هفته، ۷ سر باقی مانده از گروه تمرین برنامه تمرینی خود را با شدت کمتر از برنامه 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 بقیه شرایط اجرای پروتکل مانند مرحله قبل بود [۱۸]. در پایان این ۳ هفته نیز نمونه‌های تمرین و کنترل گشته و بافت ریه همگی آن‌ها جداسازی شد.

برای هر رت ۳۰ دقیقه طول می‌کشید. نمونه‌ها ۴ و ۵ جلسه در هفته به ترتیب در مراحل آماده‌سازی و دوره برنامه اصلی ورزشی تمرین کردند. برنامه تمرین تناوبی فزاینده با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع شد و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه (تمرین شدید، ۱۸۵٪ Vo2max) در پایان هفته ششم پایان یافت. به غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن در نظر گرفته شد [۱۵-۱۷]. پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، یک گروه از نمونه‌های تمرین (۷ سر) و گروه کنترل ۶ هفته گشته شدند و ۱۴ سر باقی‌مانده به فاز دوم پژوهش راه

جدول ۱. برنامه تمرین ورزشی تناوبی

| هفته | آشنایی | اول | دوم | سوم | چهارم | پنجم | ششم |
|----------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| سن | ۶ هفته | | | | | | |
| سرعت به متر در دقیقه | ۲۵-۱۰ | ۲۵-۲۵ | ۴۵-۳۵ | ۵۵-۴۵ | ۶۵-۵۵ | ۷۰-۶۵ | ۷۰-۶۵ |
| مدت به دقیقه | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| استراحت بین تکرارها | 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 |

ایمونوهیستوشیمی به روش انویژن^۳ 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 به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۸-۲ درجه قرار داده شد. در نهایت به بافت‌ها آنتی بادی ثانویه 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 [۲۰-۲۱]. در نهایت با میکروسکوپ فلورسانت و نسخه ۱/۴۹ نرم‌افزار ImageJ سلول‌ها ارزیابی و شمارش، و به صورت 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 کلموگروف - اسمیرنوف (K-S) استفاده شد. آزمون آمار استنباطی تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی LSD نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها به کار رفت. تمام محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ و در سطح معناداری $P \leq 0.05$ انجام شد.

نمونه‌گیری بافتی از ریه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره تمرین تناوبی و ۴۸ ساعت پس اتمام دوره هایپوکسی انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین^۱ (۵۰-۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین^۲ (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش و بلافاصله کل بافت ریه سمت چپ خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. به منظور مطالعه تغییرات ساختاری بافت ریه در قسمت‌های تبادلی، از هر ریه ۲۰ تا ۲۵ برش ضخیم جهت مطالعات استریولوژیک انتخاب شد و به روش استاندارد و معمول با رنگ هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت [۱۷]. جمعیت سلول‌های اپیتلیالی نوع ۱ (نموسیت ۱) و نوع ۲ حبابچه‌های ریوی (نموسیت ۲) در بافت ریه چپ با استفاده از روش‌های استریولوژیک تخمین زده شد [۱۹]. تمام مطالعات استریولوژیک با روش اویتیکال فراکشنیتر و با استفاده از میکروسکوپ متصل به میکرواریتور، دوربین و سیستم تمام‌دیجیتال و نسخه شماره ۹ نرم‌افزار Stereo-investigator انجام شد.

از هر ریه به طور 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

۳. یافته‌ها

3. Envision

1. Ketamine
2. Xylazine

درباره نسبت Bax/Bcl2 حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها به قرار زیر بود:
 پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معنادار افزایش یافت ($P \leq 0/05$)، قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب کاهش معنادار آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد ($P \leq 0/05$)، میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته کمتر بود ($P \leq 0/05$) (شکل ۲).

درباره شاخص جمعیت نموسیت ۲ حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها عبارت بود از:

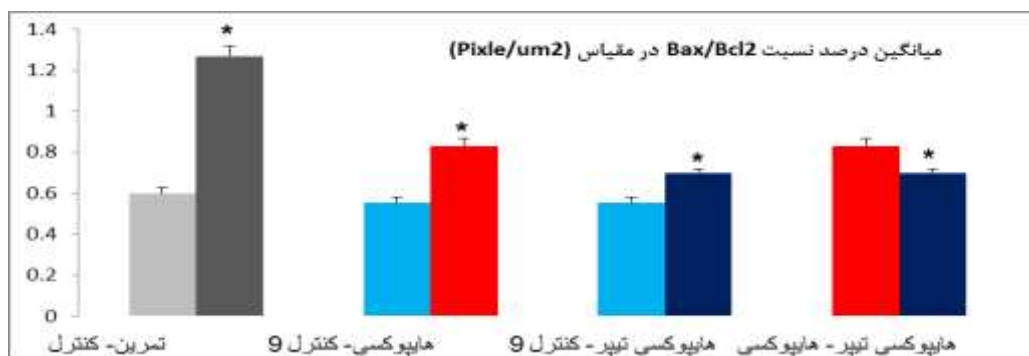
پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معنادار افزایش یافت ($P \leq 0/05$)، قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب افزایش خفیف آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد ($P > 0/05$)، اجرای کاهش بار در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی کاهش بار) سبب کاهش معنادار آن نسبت به محیط هایپوکسی محض شد ($P \leq 0/05$)، میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته بالاتر بود ($P \leq 0/05$) (شکل ۳).

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

پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معنادار افزایش یافت ($P \leq 0/05$)، قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب کاهش معنادار آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد ($P \leq 0/05$)، اجرای کاهش بار در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی کاهش بار) سبب کاهش معنادار آن نسبت به محیط هایپوکسی محض شد ($P \leq 0/05$)، میزان آن در گروه هایپوکسی کاهش بار به‌طور معناداری از گروه کنترل ۹ هفته بالاتر بود ($P \leq 0/05$) (شکل ۱).

درباره شاخص جمعیت نموسیت ۱ حبابچه‌های ریوی، یافته‌ها به این شرح بود:

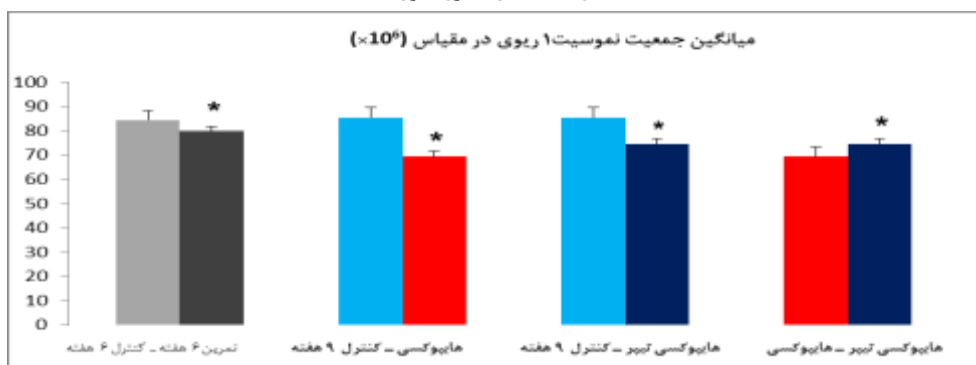
پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، به‌طور معناداری کاهش یافت ($P \leq 0/05$)، قرار گرفتن به‌مدت ۳ هفته در معرض هایپوکسی سبب کاهش معنادار آن نسبت به تمرین ۶ هفته شد



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

داده‌ها برحسب میانگین \pm خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um^2) 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.

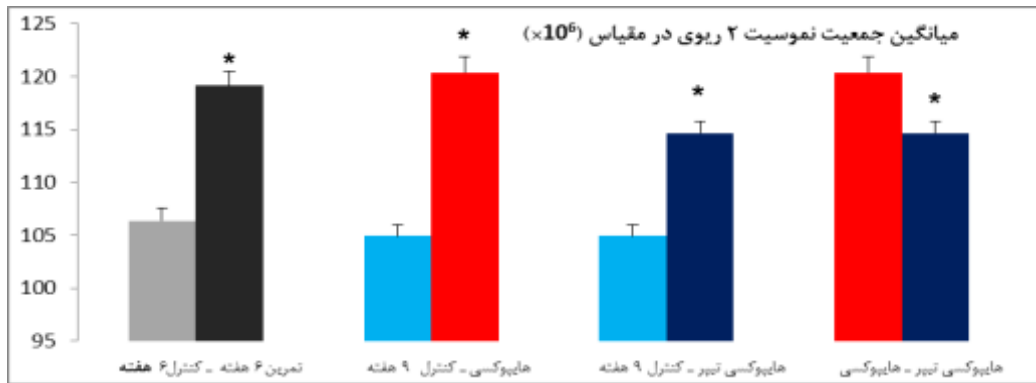
* نشانه تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه



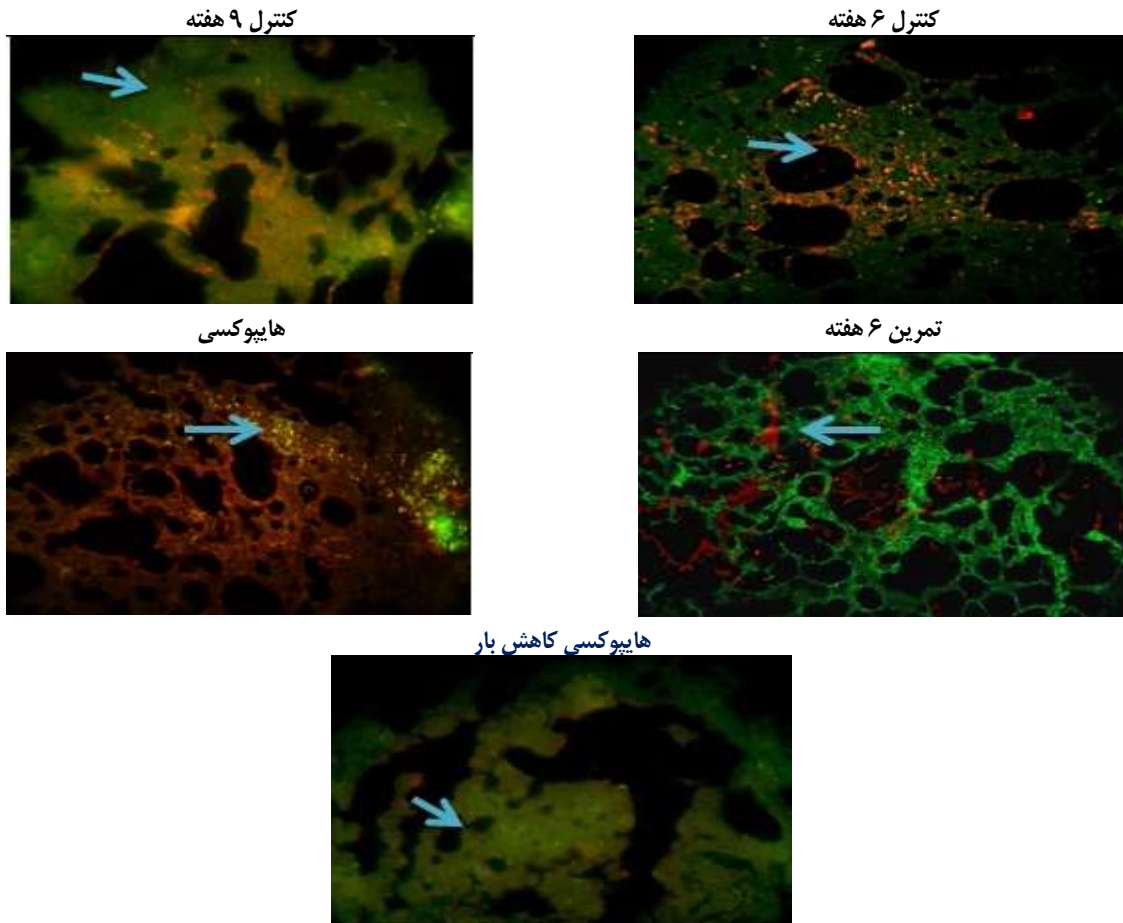
نمودار ۲. میانگین و خطای استاندارد جمعیت نموسیت ۱ حبابچه ریوی در گروه‌های پژوهش

داده‌ها برحسب میانگین \pm خطای استاندارد و در مقیاس ($\times 10^6$) 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

* نشانه تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه



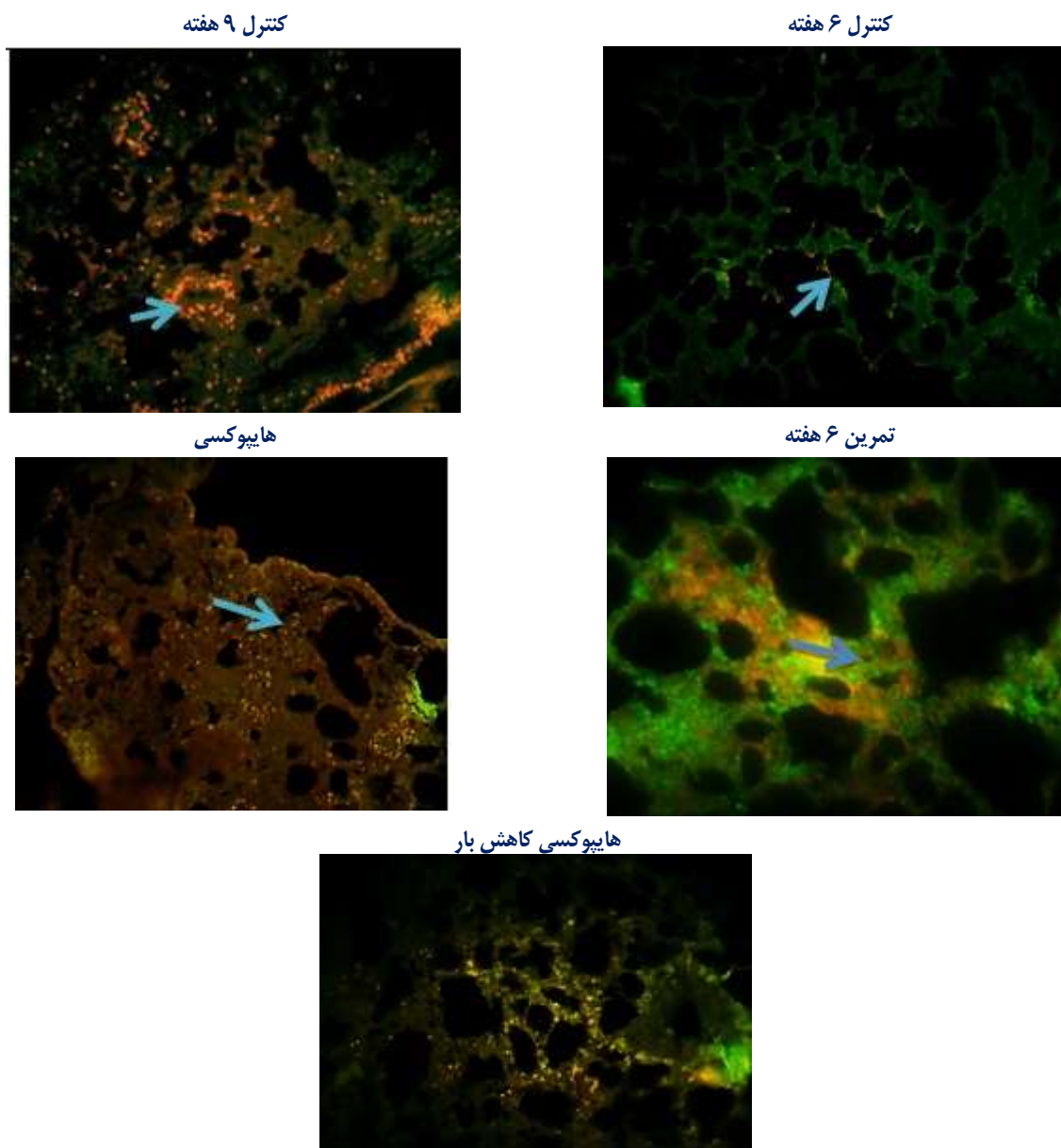
نمودار ۳. میانگین و خطای استاندارد جمعیت نموسیت ۲ حبابچه ریوی در گروه‌های پژوهش داده‌ها برحسب میانگین ± خطای استاندارد و در مقیاس (×10⁶) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بین گروه‌های کنترل ۶ و ۹ هفته با گروه های تجربی آن‌ها تفاوت معنادار وجود دارد. همچنین بین گروه هایپوکسی کاهش بار و هایپوکسی تفاوت معنادار هست * نشانه تفاوت معنادار با گروه مورد مقایسه



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

واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی بادی پروتئین Bcl-2 را نشان می‌دهد.

آنتی بادی ثانویه Bcl-2 به رنگ FITC متصل شده و هسته سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگ‌نمایی تصاویر در مقیاس 200× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر



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

بود. به‌طور خلاصه در این پژوهش مشاهده شد ۶ هفته تمرین تناوبی شدید نسبت **Bax/Bcl2** و جمعیت نموسیت ۲ حبابچه‌های ریوی را افزایش داد و درمقابل به کاهش جمعیت نموسیت ۱ منجر شد. همچنین ۳ هفته قرارگیری در معرض هایپوکسی منجر به تشدید افزایش جمعیت نموسیت ۲ و کاهش جمعیت نموسیت ۱ گردید که بهره‌گیری از کاهش بار منجر به افزایش معنادار جمعیت نموسیت ۱، کاهش معنادار جمعیت نموسیت ۲ و کاهش نسبت **Bax/Bcl2** حبابچه‌های ریوی نسبت به گروه هایپوکسی شد. فعالیت ورزشی بیش از حد یا فعالیت ورزشی شدید ممکن

آنتی بادی ثانویه **Bax** به رنگ **FITC** متصل شده و هسته سلول با رنگ **PI** رنگ‌آمیزی شده است. بزرگ‌نمایی تصاویر در مقیاس $200\times$ صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی بادی پروتئین **Bax** را نشان می‌دهد.

۴. 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 (نموسیت ۱ و ۲) حبابچه‌های ریوی رت‌های نر ویستار و سالم

[۳۳-۳۱]، شدت این تأثیرات از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید کمتر بوده است. احتمالاً چندانگانه 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 می شود [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 گیرنده مرگ قلب نمونه های موش را بررسی کردند. محققان در نهایت گزارش کردند که مسیرهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری و مسیرهای آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ در قلب موش در شرایط هایپوکسی بلندمدت فعال می شوند.

شدت هایپوکسی تعیین می کند که آیا سلول با هایپوکسی سازگار می شود و زنده می ماند و یا دچار مرگ می شود [۳۱]. در این راستا گزارش شده است هایپوکسی می تواند 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 می دهد، بیشتر توسط مهار زنجیره انتقال الکترون از غشای داخلی میتوکندری صورت می گیرد. کمبود اکسیژن حمل و نقل پروتون را مهار می کند که در نتیجه کاهش پتانسیل غشا را در پی دارد. کاهش ATP به دست آمده از میتوکندری سبب فعال شدن پروتئین های پیش آپوپتوزی مثل Bax و Bad می شود و در نهایت منجر به انتشار سیتوکروم C به داخل سیتوزول می گردد [۳۶].

از یافته های 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. به عبارتی دیده شد با اجرای کاهش بار در شرایط هایپوکسی جمعیت نموسیت ۱ به طور معناداری نسبت به گروه هایپوکسی افزایش و جمعیت نموسیت ۲ کاهش یافت. این یافته ها احتمالاً از نقش آنابولیکی و رشدی کاهش بار در شرایط تنش اکسیژن هایپوکسی حمایت می کنند [۳۰-۳۱]. از آنجایی که نموسیت های ۲ وظیفه ساخت نموسیت ۱ را برعهده دارند و با تکثیر خود به حفظ سطح تنفس حبابچه ای منجر می شوند، این کاهش احتمالاً دلیلی بر نزدیک شدن شرایط ریوی به حالت هموستازی است که در آن، مرگ نموسیت ۱ کاهش می یابد و نموسیت های ۲ مجبور نیستند با تکثیر جبرانی خود، جمعیت نموسیت ۱ را در حد طبیعی حفظ کنند [۳۷].

است سبب آسیب های مکانیکی زیادی شود که به پاسخ های التهابی، آپوپتوز و نکروز می انجامد. فانیوف و لیوونبورگ [۲۳] در طی مطالعات خود دریافتند که تمرین ورزشی باعث القای آپوپتوز می شود که روندی طبیعی برای از بین بردن سلول های آسیب دیده 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 پیش برد آپوپتوز است و اگر کاهش یابد، نشان از کاهش رخداد آپوپتوز دارد [۷، ۲۴-۲۵]. در پژوهش حاضر، نسبت Bax/Bcl-2 حبابچه ریوی پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشانگر افزایش فرایندهای پیش برنده مرگ سلولی در ریه است. بررسی نتایج شمارش سلولی اپتلیال در گروه تمرین ۶ هفته نیز از این موضوع حمایت می کند.

به نظر می رسد استرس ایجاد شده ناشی از تمرین شدید تناوبی با افزایش فاکتورهای آپوپتوز مثل سایتوکین های پیش التهابی، گلوکوکورتیکوئیدها، ROS، فاکتورهای التهابی و افزایش کنترل نشده کلسیم سیتوزولی همراه بوده و سلول ها را به سمت آپوپتوز سوق داده است [۲۶-۲۷]. به عبارتی به نظر می رسد با افزایش فرایندهای آپوپتوتیک ناشی از ورزش، نموسیت های ۱ دچار مرگ سلولی می شود و از این رهگذر سطح حبابچه ریوی دچار کاهش و در نهایت سطح تنفس کم شده باشد. شمارش نموسیت های ۲ نشان داد پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید میزان آن ها افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشان دهنده تلاش ریه در جبران نموسیت های ۱ از دست رفته و حفظ سطح تنفسی خود است [۲۸-۲۹]. در این راستا فیشر و همکاران [۳۰] نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول لنفوسیتی را در پی 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 نموسیت ۱ می شود. به نظر می رسد غیر از فعالیت پروتئین های ضد آپوپتوزی و پیش آپوپتوزی در تعیین مرگ یا حیات سلول ها، فاکتورهای دیگری نیز هستند که فعالیت آن ها در تعیین شرایط آپوپتوزی حائز اهمیت است. باینکه نمونه های گروه هایپوکسی ۳ هفته در حالت غیرفعال به سر می بردند، شاخص Bax/Bcl2 هنوز به طور معناداری نسبت به گروه کنترل ۹ هفته در سطح بالاتری قرار داشت. علاوه بر این، جمعیت نموسیت های ۱ نیز هنوز به طور معناداری کمتر از گروه کنترلی بود. با توجه به نتایج، اگرچه هایپوکسی قادر است اثرات آپوپتوتیک را القا یا حفظ کند

که موضوعی چالش‌برانگیز است. همچنین احتمالاً محیط هایپوکسی به‌عنوان محیطی تمرینی، کاری، حرفه‌ای و پذیرفته‌شده برای بسیاری از ورزشکاران و نیروهای نظامی نیز دارای تأثیرات پیش‌آپوپتوزی مرتبط با مرگ سلول است. در نهایت 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

مطالعه حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مورد نیاز ستاد کل نیروهای مسلح (با تأیید دانشکده پزشکی آجا به شماره 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 JJ. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005; 2 (3): 202-5.
- [2]. Podhorska-Okolow M, Dzegiel P, Gomulkiewicz A, Kisiela D, Dolinska-Krajewska B, Iethon 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 Shahrood 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 (IPF)/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

فرهنگی -ملکی و همکاران [۳۸] کاهش معنادار غلظت سایتوکاین‌های پیش‌التهابی **IL-6**، **IL-1B** و **TNF-a** پس از یک دوره کاهش بار در ورزشکاران را نشان دادند. در همین راستا گزارش شده سایتوکاین‌های التهابی از جمله عواملی هستند که منجر به القای آپوپتوز می‌شوند [۳۹]. همچنین پاپاکاستا و همکار [۴۰] در مقاله مروری خود، تأثیر کاهش بار بر عملکرد سیستم ایمنی را بررسی کردند. آن‌ها کاهش بار 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 به سمت سازوکارهای آنابولیکی (درمقابل شرایط کاتابولیسیمی) 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 به‌گونه دیگری است و آن‌هم افزایش فرایندهای پیش‌آپوپتوزی در مقایسه با فرایندهای رشدی است

performance in cyclists. *British Journal of Sports Medicine* 2001; 35 (6): 431-34.

- [10]. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidiyan GH, yousefpour M, Rivahi 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, hamidiyan Gh, Mosadegh P. investigating of 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, Sugiyama 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)

- [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] Stüttfeld 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 1 α 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. Junqueira'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.

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 Riahy², Shadmehr Mirdar³, Gholamreza Hamidian⁴

1. PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Azadaran, 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, Faculty 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 ($P \leq 0.5$).

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

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.