دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم–شماره ۱۲۹
تیر ۱۳۹۶

ردیابی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 حبابچه‌های ریوی، متعاقب شش هفته تمرین تناوبی شدید

نویسندگان: مهدی یادگاری[1*]، سیمین ریاحی[2]، شادمهر میردار[3]، غلامرضا حمیدیان[4]، میترا یوسف‌پور[5]، فاطمه ریاحی[6]

۱. دکترای تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران.

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

۳. دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران.

٤. استادیار، دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایهٔ دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۵. استادیار، دکترای تخصصی، گروه فیزیولوژی دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی ارتش، تهران، ایران.

٦. کارشناسی‌ارشد، پژوهشگر مرکز پژوهشی علوم و فناوری اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم‌پزشکی ارتش، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: مهدی یادگاری **E-mail: mehdi.sport313@yahoo.com**

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۳/۳۱
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۰

چکیده

مقدمه و هدف: از دیدگاه مطالعات ملکولی تاکنون رابطهٔ بین تمرینات تناوبی شدید، بروز آپوپتوز و پروتئین‌های مرتبط با آن در ریه، موردبررسی قرار نگرفته است. از این رو، هدف پژوهش حاضر ردیابی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 حبابچه‌های ریوی، متعاقب شش هفته تمرین تناوبی شدید بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش یک مطالعهٔ تجربی بود که نمونه‌های آن را چهارده سر، رت نر نژاد ویستار سالم و بدون سابقهٔ بیماری (سن چهار هفته و میانگین وزنی ۸±۷۲ گرم) تشکیل داده بودند که به‌طور تصادفی، به گروه تمرین و کنترل تقسم شدند. در طی شش هفته برنامهٔ تمرین تناوبی شدید با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه به پایان رسید. هر جلسهٔ تمرین شامل ده مرحلهٔ یک‌دقیقه‌ای، دویدن شدید با نه مرحلهٔ دودقیقه‌ای دویدن آهسته بین آن‌ها بود. جهت انجام آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی، بافت ریه خارج و سطح پروئین‌های Bax و Bcl-2 اندازه گیری شد. جهت تحلیل داده‌ها از آزمون پارامتریک t مستقل در سطح $\alpha \leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج: پس از شش هفته تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئین Bax حبابچه‌های ریوی به‌طور معناداری افزایش یافت. همچنین متعاقب شش هفته تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئینBcl-2 نیز به‌طور معناداری افزایش یافت ($P \leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد یک دورهٔ تمرین تناوبی شدید، سبب تغییرات بارزی در بیان پروتئین‌های آپوپتوزی حبابچه‌های ریوی می‌شود که تفسیر عواقب چنین تغییراتی به‌دنبال تمرینات ورزشی، نیازمند انجام پژوهش‌های بیشتر است.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی شدید، آپوپتوز، Bax، Bcl-2، ریه

مقدمه

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که به وسیلهٔ مجموعه‌ای از پیام‌های بین سلولی، تحت شرایط مشخص و بدون ایجاد التهاب رخ می‌دهد. 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 سلول‌های بافت مشخص را حفظ کنند(۱، ۲). آپوپتوز می‌تواند توسط تعدادی از محرک‌های زیان‌آور یا استرس‌زا شامل ضایعات DNA[1]، گرما، تحریک هورمونی، داروهای ضدسرطان و استرس فیزیکی (جسمانی) ایجاد شود. از آنجایی که آپوپتوز مواد داخل سلولی را به فضای خارج سلولی[2] آزاد نمی‌سازد؛ از این رو، معمولاً به واکنش‌های التهابی[3] منجر نمی شود(۱، ۳).

اگرچه آبشارهای پروتئولیتیک[4] فعال‌شده توسط کاسپاس‌ها[5] نقش محوری را در فرآیند آپوپتوز ایفا می‌کنند؛ اما آغاز این عملکرد توسط عوامل دیگری تنظیم و کنترل می‌شود(٤، ٥). پروتئین‌های خانوادهٔ Bcl-2[6] به‌عنوان یک نقطهٔ کنترلی بین سطح سلول و سیگنال‌های درونی، جهت شکل‌گیری آپوپتوز و فعال‌سازی آبشار کاسپاسی، نقشی حیاتی را بر عهده دارند. اگرچه نقش کلی پروتئین‌های اعضا خانواده Bcl-2 در ایجاد آپوپتوز کاملاً شناخته شده است؛ اما مکانیسم بیوشیمیایی عملکرد آن‌ها هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. اعضای این خانواده به‌عنوان یک نقطهٔ کنترلی مرکزی در مسیرهای آپوپتوزی عمل می‌کنند و هر دو خصوصیت القاکنندهٔ مرگ سلولی و ضدمرگ سلولی را دارا می‌باشند(٦، ٧). بیش از دوازده عضو از اعضا خانوادهٔ Bcl-2 کشف و شناسایی شده است که به دو زیرخانوادهٔ اصلی، شامل اعضا ضدآپوپتوزی یا مهارکننده‌ها (از قبیل Bcl-2، Mcl-1[7]، Bcl-XL، Bcl-W و Bag-1) و اعضا پیش‌آپوپتوزی یا پیش‌برنده‌ها[8] (از قبیل Bax[9]، Bad[10]، Bak، Bid[11] و پروتئین X وابسته به Bcl-2) تقسیم‌بندی می‌شوند(٦، ٨، ٩).

باردالس[12] و همکاران (۱۹۹٦) آپوپتوز نموسیت‌های نوع دوم ریوی را در آسیب‌های حاد ریه بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد تکثیر نموسیت‌های-۲ در طول مراحل اولیهٔ آسیب حاد ریه اتفاق می‌افتد و براساس وسعت و زمان تغییرپذیر است (۱۰). در مطالعه‌ای که توسط باراس فیلهو[13] و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد، نتایج نشان داد در بسیاری از بیماری‌های ریوی با فیبروز ریوی ناشناخته (IFP)[14] یا ذات‌الریهٔ بینابینی معمول (UIP)[15]، تعداد زیادی از نموسیت‌های-۲ حبابچه‌ها برنامه‌ریزی آپوپتوز سلولی را به‌صورت فعال بر عهده دارند (۱۱).

در حیطهٔ تمرینات ورزشی، فانیوف[16] و لیوونبورغ[17] (۲۰۰۱) در مطالعات خود دریافتند تمرین ورزشی سبب ایجاد آپوپتوز می‌شود که یک روند طبیعی برای ازبین‌بردن سلول‌های آسیب‌دیده است و در آن واکنش‌های التهابی چشمگیری رخ نمی‌دهد. این روند باعث حصول اطمینان از عملکرد طبیعی بدن می‌شود (۱۲). همچنین، دوستار و همکاران (۱۳۸۸) به بررسی نقش ورزش شنا بر بروز آپوپتوز عضلانی در موش‌های دیابتی پرداختند. مطالعات بافت‌شناسی آن‌ها نشان داد دیابت سبب بروز آپوپتوز و نکروز در سلول‌های عضلانی می‌شود و یک دوره شنای استقامتی می‌تواند، باعث کاهش تغییرات پاتولوژیک و بهبود نسبی

1. deoxy ribo nucleic acid
2. extracellular
3. inflamatory responses
4. Proteolytic
5. Caspase
6. B. cell leukemia/lymphoma.2
7. Myeloid cell leukemia 1
8. Promoters
9. Bcl.2 homologous antagonist/killer
10. bcl.2.like protein 4
11. BH3 interacting.domain
12. Bardales
13. Barbas.Filho
14. Idiopathic pulmonary fibrosis
15. Usual interstitial pneumonia
16. Phaneuf
17. Leeuwenburgh

آسیب‌های بافتی در سلول عضلانی موش مبتلا به دیابت شود (۱۳). مخالف با این یافته‌ها، ساری صراف و همکاران (۱۳۹۵) اثر فعالیت مقاومتی و مکمل‌سازی کراتین بر بیان پروتئین‌های Bcl2، Bax و نسبت آن‌ها را موردمطالعه قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد یک جلسهٔ فعالیت مقاومتی میزان پروتئین Bax را افزایش و نسبت Bcl2/Bax را کاهش می‌دهد. همچنین دیده‌شد مکمل‌سازی کراتین فسفات این تغییرات را به سطح پایه نزدیک می‌کند (۱٤).

مستندات موجود نشان می‌دهد تاکنون پژوهشی به بررسی اثرات تمرین ورزشی بر شرایط آپوپتوزی بافت ریه نپرداخته است و یافته‌ای در این زمینه منتشر نشده است. همچنین مقایسهٔ تحقیقات ورزشی موجود، از ناهمگونی یافته‌ها در حوزهٔ تأثیر الگوهای مختلف ورزشی بر آپوپتوز بافتی حکایت دارد که جمع‌بندی و نتیجه‌گیری کلی از این اثرات ورزشی را مشکل می‌سازد. بر همین اساس، در این پژوهش محققین بر آن شدند تا اثر یک دورهٔ تمرینات تناوبی شدید بر پروتئین‌های پیش و ضدآپوپتوزی Bax و Bcl2 حبابچه‌های ریوی در رت‌های سالم را موردبررسی قرار دهند.

مواد و روش ها

نمونه و شرایط نگه‌داری

نمونه‌های پژوهش حاضر را چهارده سر رت نر نژاد ویستار(سن چهار هفته، میانگین وزنی۸ ±۷۲gr) تشکیل داده بودند که از انستیتوپاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند و به‌صورت تصادفی به گروه‌های تمرین ورزشی (هفت سر) و کنترل (هفت سر) تقسیم شدند. نمونه‌ها از نظر سلامت بدنی کاملاً سالم و هیچ‌گونه سابقهٔ بیماری نداشتند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، به‌مدت یک هفته، جهت سازگاری با محیط جدید در دمای ۲±۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ٤٥ تا ٥٥ درصد و چرخهٔ تاریکی‌روشنایی ۱۲:۱۲ساعته، نگهداری شدند؛ سپس به‌مدت یک هفته با نحوهٔ فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. حیوانات در مدت آزمایش با پلت استاندارد تهیه‌شده در انیستیتو پاستور آمل و آب لوله‌کشی به‌مقدار کافی تغذیه شدند. به‌گونه‌ای که آب و غذا به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفته بود.

برنامهٔ آشناسازی با نوارگردان و تمرین تناوبی شدید

مرحلهٔ آشناسازی، شامل چهار روز برنامهٔ تمرین تناوبی با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر بر دقیقه، مطابق الگوی برنامهٔ تمرینی تناوبی شدید اجرا شد. برنامهٔ تمرین تناوبی شدید، به‌صورت ده تکرار یک‌دقیقه‌ای و استراحت فعال دودقیقه‌ای انجام شد. به‌گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود وکل تمرین روزانه برای هر رت سی دقیقه طول می‌کشید. نمونه‌ها ٤ و ٥ جلسه در هفته به‌ترتیب در مراحل آماده‌سازی و دورهٔ برنامهٔ اصلی ورزشی تمرین کردند. برنامهٔ تمرین تناوبی شدید با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه، در پایان هفته ششم پایان پذیرفت (جدول شمارهٔ ۱). به‌غیر از زمان فعالیت اصلی، پنج دقیقه برای گرم‌کردن و پنج دقیقه برای سردکردن در نظرگرفته شد(۱۵). برای تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شد. برای جلوگیری از اثر احتمالی شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش، به روش شرطی‌سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک‌شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود.

جدول شمارهٔ ۱. برنامهٔ شش هفته تمرین تناوبی شدید

هفته	آشنایی	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
سن	۶ هفته						
سرعت تردمیل(متر به دقیقه)	۲۵-۱۰	۳۵-۲۵	۴۵-۳۵	۵۵- ۴۵	۶۵-۵۵	۷۰-۶۵	۷۰-۶۵
زمان ست شدید(دقیقه)	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
استراحت بین ست‌ها (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد ست در جلسه	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد جلسه در هفته	۴	۵	۵	۵	۵	۵	۵

نمونه‌برداری ریه و تهیهٔ مقاطع بافتی

نمونه‌گیری بافتی از ریهٔ رت‌ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دورهٔ تمرین تناوبی انجام شد. برای این منظور با تزریق سه واحد محلول کتامین[1] (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم) و زایلازین[2] (۵-۳ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش(۱۵) و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰درصد قرار داده شدند. پس از سپری‌شدن پنج روز از زمان فیکس بافتی، ابتدا با استفاده از تکنیک اورینتیتور و رعایت اصول IUR، برش‌هایی از بافت ریه تهیه و با انجام مراحل پاساژ (با استفاده از دستگاه اتوماتیک هیستوکینت مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت لایکا) و آماده‌سازی قالب‌های پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم دورانی مدل ۸۲۰، برش‌های متوالی به ضخامت پنج میکرومتر جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. به‌منظور تعیین اولین مقطع و حداقل فواصل بین مقاطع از نتایج مطالعهٔ پایلوت استفاده شد(۱۶).

مطالعات ایمونوهیستوشیمی

از هر ریه به‌طور تصادفی، پنج برش نازک غیر متوالی به ضخامت پنج 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[3] و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی Bcl-2 کد 044-436 ساخت شرکت milli pore و Bax کد 69643 ساخت شرکت Abcam انجام شد.

روش انجام آزمایش ایمونوهیستوشیمی

در ابتدا، محیط کشت رویی سلول‌ها دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS در چهار مرحله و به فاصلهٔ پنج دقیقه شسته شدند. پس از آن، محلول پارا فرمالدهید ٤درصد به‌مدت بیست دقیقه به بافت اضافه و در ادامه اسیدکلریدریک نرمال نیز به مدت سی دقیقه اضافه شد. آنتی‌بادی اولیهٔ رقیق‌شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به بافت اضافه گردید و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک‌شدن بافت، به‌مدت یک شب درون یخچال با دمای دو تا هشت درجه قرار داده شد. در نهایت به بافت‌ها آنتی‌بادی ثانویه، کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) با رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه گردید و سپس درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه، به‌مدت یک ساعت وسی دقیقه انکوبه شدند. بعد از آن، به نمونه‌ها PI اضافه گردید و پس از پنج دقیقه روی نمونه‌ها PBS ریخته شد(۱۷). در نهایت، با میکروسکوپ فلورسانت سلول‌ها ارزیابی و شمارش گردیدند. با استفاده از دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک پنج فیلد مختلف انتخاب و تصویربرداری صورت گرفت و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش، با نسخهٔ ۱/٤۹

[1]. Ketamine
[2]. Xylazine
[3]. Envision

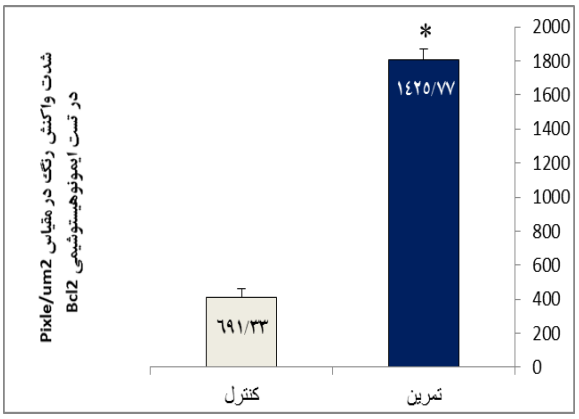
نرم‌افزار ImageJ موردآنالیز قرار گرفته و به‌صورت داده‌های عددی توصیف شدند (۱۸).

روش‌های آماری

برای تجزیه‌وتحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه‌ها از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کلوموگروف اسمیرنوف(k-s) استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی t مستقل نیز جهت مقایسهٔ میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیهٔ محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.21 و در سطح معناداری P≤ ۰/۰۵ انجام شد.

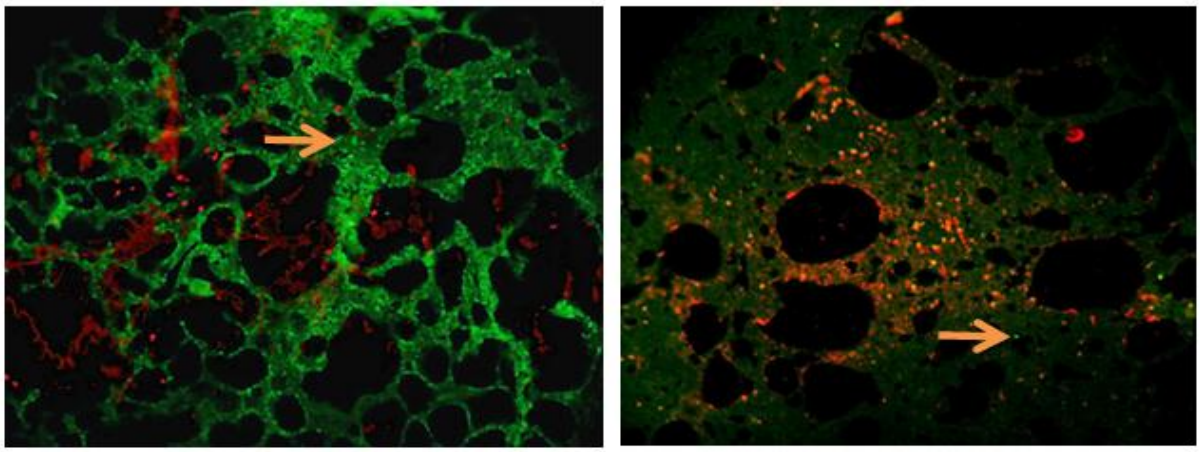
یافته‌ها

تحلیل آماری نشان داد متعاقب شش هفته اجرای تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئین Bcl-2 حبابچه‌های ریوی به‌طور معنادار افزایش یافت (۱۰۶/۲۲ درصد، P≤0.05، نمودار ۱، تصاویر شماره ۱). همچنین مشاهده شد پس از اجرای شش هفته تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئینی Bax حبابچه‌های ریوی نیز به‌طور معناداری افزایش نشان داد (۳۳۹/۲۲ درصد، P≤0.05، نمودار ۲، تصاویر شمارهٔ ۲).



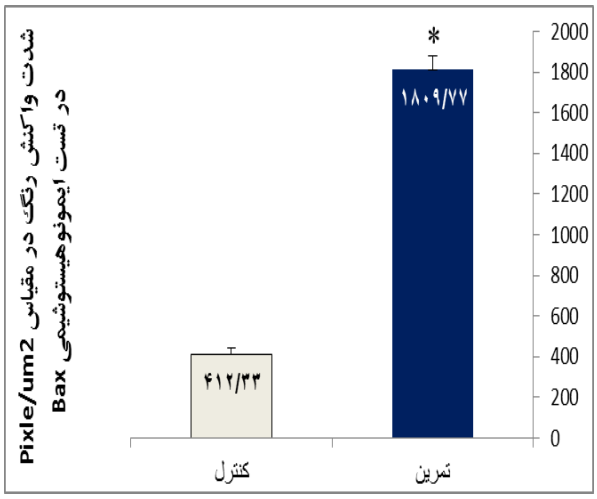
نمودار ۱. میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین Bcl-2 حبابچهٔ ریوی در گروه‌های پژوهش.

داده‌ها برحسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ، در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، میزان Bcl-2 در گروه تمرین شش هفته به‌طور معناداری نسبت به کنترل شش هفته افزایش یافته است.
* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل (P≤0.05).



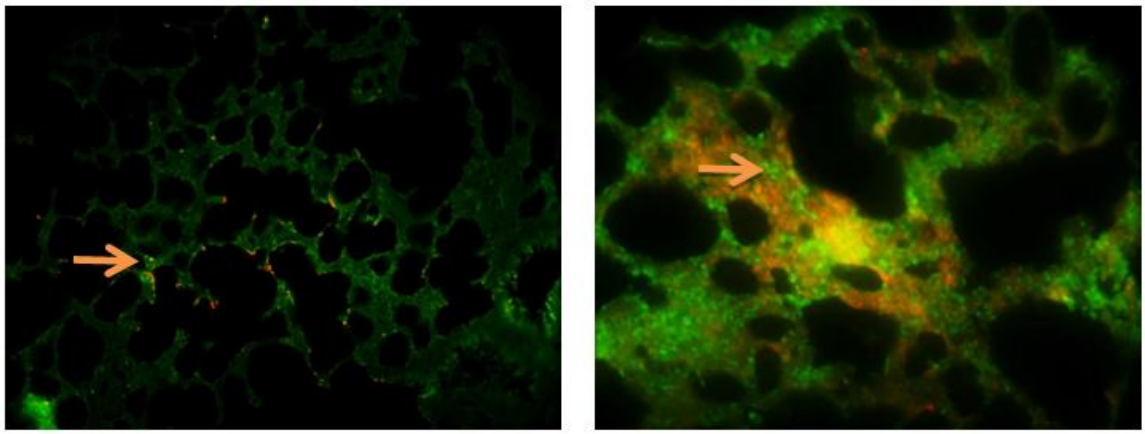
تصویر شماره ۱. بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl-2 در گروه‌های پژوهش.

تصاویر شمارهٔ ۱. تصاور مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl-2 در گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه Bcl-2 به‌رنگ FITC متصل شده است 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 آنتی‌بادی پروتئین Bcl-2 را نشان می‌دهد.



نمودار ۲. میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین Bax حبابچهٔ ریوی در گروه‌های پژوهش.

داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، میزان Bax در گروه تمرین شش هفته به‌طور معناداری نسبت به کنترل شش هفته افزایش یافته است.
* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل($P\leq0.05$).



تصویر شماره ۲. بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bax در گروه‌های پژوهش.

تصاویر شماره ۲. تصاویر مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bax در گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه Bax به‌رنگ FITC متصل شده است 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 آنتی‌بادی پروتئین Bax را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نخستین مطالعه‌ای است که به بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر سطوح پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی (Bax-Bcl-2) ریوی پرداخته است. یافته‌ها نشان داد پس از شش هفته تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئین Bcl-2 و Bax به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

در همین راستا، پژوهش‌هایی صورت گرفته است که عموماً نتایج همسو با پژوهش حاضر دارند؛ اما تاکنون در پیشینهٔ پژوهش به بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید بر پروتئین‌های مرتبط با مسیرهای آپوپتوزی بافت ریه پرداخته نشده است. به‌عبارتی عموماً بافت‌های مورداستفاده در مطالعات شامل قلب و عضلهٔ اسکلتی و یا سطح سرمی بوده است و گزارشی در ارتباط با بافت ریه وجود ندارد. در سال‌های اخیر، مطالعه در زمینهٔ آپوپتوز توجه بسیاری از پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کرده است. شواهد نشان می‌دهد علاوه بر مرگ سلولی به‌شکل نکروز، مرگ سلولی به‌صورت آپوپتوز

نیز با فعالیت ورزشی رخ می‌دهد. فعالیت ورزشی بیش از حد یا فعالیت ورزشی شدید، ممکن است سبب آسیب مکانیکی قابل‌ملاحظه‌ای شود که با پاسخ‌های التهابی منجر به آپوپتوز و نکروز همراه است. تمرینات ورزشی شدید، باعث تعدیل بسیاری از عواملی می‌شود که ممکن است آپوپتوز را در انواع بافت‌ها تغییر دهد. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت‌های ورزشی شدید موجب افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئیدها، غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر می‌شود که این امر عاملی برای ایجاد آپوپتوز است (۱۲، ۱۹). در همین راستا، گزارش شده است، یک جلسهٔ فعالیت ورزشی شدید، منجر به افزایش شاخص‌های مرتبط با پیشبرد روند آپوپتوز در سلول‌های لنفوسیت می‌شود (۲۰). همچنین، گفته شده یک جلسه فعالیت ورزشی شدید، آپوپتوز سلول‌های لنفوسیتی مردان را در پاسخ به تنش اکسایشی افزایش می‌دهد (۲۱). مخالف با این یافته‌ها در پژوهشی دیگر، گزارش شد سیزده هفته تمرین هوازی بر روی نوارگردان، هیچ تأثیری بر شاخص‌های مرتبط با آپوپتوز قلبی موش صحرایی ندارد (۲۲). اگرچه مکانیسم دقیق آپوپتوز هنوز مشخص نیست؛ اما ممکن است با توجه به نوع سلول و نوع تحریکات متفاوت باشد (۲۰). فانیوف[1] و لیوونبورغ[2] (۲۰۰۱) در طی مطالعات خود دریافتند، تمرین ورزشی سبب القا آپوپتوز می‌شود که یک روند طبیعی برای ازبین‌بردن سلول‌های آسیب دیده است که در آن واکنش‌های التهابی چشمگیری رخ نمی‌دهد. این روند باعث حصول اطمینان از عملکرد طبیعی بدن می‌شود (۱۲).

در پژوهش حاضر سطح پروتئین Bax در حبابچهٔ ریوی پس از شش هفته تمرین تناوبی شدید، افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشانگر تشدید فرایندهای پیش‌برندهٔ مرگ سلولی در ریه است. همسو با این موضوع، بیان پروتئین مهارگر آپوپتوز یعنی Bcl-2 نیز افرایش یافت که احتمالاً دلیلی بر بروز واکنش‌های جبرانی ضد آپوپتوزی است. با توجه به اینکه Bcl-2 مانع افزایش Bax می‌شود، به‌نظر می‌رسد افزایش Bcl-2 یکی از مکانیسم‌های سرکوب‌کنندهٔ Bax بوده است (۲۳). افزایش Bcl-2 با تحکیم دیوارهٔ میتوکندری، سرکوب Bax، جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c، تنظیم کلسیم رهاشده از سارکوپلاسمیک و کاهش اثر ROS[3] ناشی از فعالیت ورزشی، ایمنی سلول را بالا می‌برد و از آپوپتوز ناشی از استرس جلوگیری می‌کند (۲۴، ۲۵). در پژوهش حاضر، به‌نظر می‌رسد استرس ایجادشدهٔ ناشی از تمرین تناوبی شدید، با افزایش فاکتورهای پیش‌آپوپتوزی، مثل سایتوکین‌های پیش‌التهابی، گلوکوکورتیکوئیدها، ROS، فاکتورهای التهابی و افزایش کنترل‌نشدهٔ کلسیم سیتوزولی همراه بوده است و سلول‌های حبابچه‌ای را به‌سمت آپوپتوز سوق داده است (۱۲، ۱۹). در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر، مطالعاتی وجود دارند که با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های بافت‌شناسی یا تست تانل، تأثیر تنش ورزشی در توسعهٔ آپوپتوز بافت عضلانی را نشان داده‌اند (۲۶، ۲۷). همچنین، با استفاده از تست تانل گزارش شده است یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز، بر روی نوترگردان منجر به تخریب و مرگ سلولی توبول‌های دیستال کلیوی می‌شود (۲۸).

تحقیقات مختلف نشان داده‌اند تمرینات ورزشی با شدت بالا، منجر به اختلال در هموستاز بدن شده و با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است (۲۹). فیشر[4] و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول را در پی دارد(۳۰). رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از استرس اکسیداتیو می‌توانند به ساختار سلولی DNA آسیب بزنند. آسیب DNA در بسیاری از ارگان‌ها از جمله ریه منجر به بروز رخداد آپوپتوز می‌شود (۳۱). ممکن است میتوکندری هدف مهمی برای فرآیند آپوپتوز ناشی ازROS باشد. ROS باعث کاهش پتانسیل اکسیدانتی سلولی می‌شود و

[1]. Phaneuf
[2]. Leeuwenburgh
[3]. Reactive oxygen species
[4]. Fisher

نفوذپذیری غشای میتوکندری را افزایش می‌دهد که باعث رهاسازی سیتوکروم c و در نهایت فعالیت کاسپاس-۳ می‌شود(۳۲).

مخالف با یافته پژوهش حاضر، گزارش شده است که فعالیت ورزشی تک جلسه‌ای با شدت بالا سبب کاهش بیان Bcl-2 می‌شود که دلیل این تناقض، احتمالاً ناشی از تفاوت در الگوی برنامهٔ ورزشی می‌باشد. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر از پروتکل شش هفته‌ای استفاده شده است، احتمال می‌رود سازگاری‌های ناشی از تمرین سبب فعال‌سازی مسیرهای ضدآپوپتوزی شده باشد. Bcl-2 یک پروتئین ضدآپوپتوز است که در مسیر داخلی آپوپتوز نقش دارد و مانع فعالیت کاسپاس-۳ می‌شود (۳۳). همچنین گزارش شده که فعالیت ورزشی شدید باعث افزایش غلظت TNF-α پلاسمایی می‌شود (۳٤). TNF-α یک شاخص التهابی است که به گیرندهٔ مرگ TNFR1 در سطح سلول متصل می‌شود که پس از آن فعالیت کاسپاس-۳ منجر به جریان‌های پایین‌دست و مرگ سلولی می‌شود (۲۹)؛ اما اطلاعات بسیار اندکی دربارهٔ التهاب پس از ورزش در پاسخ به تمرین تناوبی با شدت بالا وجود دارد (۳۰).

همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، ساری صراف و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند یک جلسه فعالیت حاد مقاومتی، سبب افزایش پروتئین Bax در سطح سرمی مردان میان‌سال می‌شود. محققان گزارش کرده‌اند، احتمالاً فعالیت‌های حاد مقاومتی باعث تحریک رخداد فرایندهای آپوپتوتیک می‌شوند (۱٤). امروزه، به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است که فعالیت شدید ورزشی تغییرات هومئوستاتیک مهمی در محیط داخلی بدن ایجاد می‌کند که به‌معنی ایجاد چالش در سلول‌ها در توانایی زنده‌ماندن تحت‌شرایط استرس است (۳۵). نیازهای مکانیکی و متابولیکی افزایش‌یافته توسط تمرینات شدید ورزشی در چندین اندام و بافت، به‌ویژه بافت‌های متابولیک مهم در طی ورزش، ممکن است ظرفیت هموستازی آن‌ها را در هم شکند و موجب افزایش بیان فاکتورهای آسیب، مرگ سلولی، التهابی و تغییرات ایمونولوژیکی شود (۳٦).

تمرینات ورزشی شدید با افزایش گونه‌های اکسیژن فعال و P53[1] از طریق القا استرس بر میتوکندری می‌توانند، موجب افزایش Bax شوند. همچنین این امکان وجود دارد فعالیت‌های ورزشی شدید از طریق افزایش کاسپاس-۸ (۳۷) و در نتیجهٔ تجزیهٔ BID سبب کاهش بیان Bcl-2 شوند که در نهایت این تغییرات آپوپتوز را القا می‌کنند (۳۸). همچنین فعالیت شدید، منجر به تشکیل رادیکال‌های اکسیژن فراتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن می شود که نشانهٔ آن کاهش فعالیت سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز است. کاسپاس-۳ پروتئاز عملکردی اصلی در طی مرحلهٔ تخریبی آپوپتوز است (۳۹). سلول‌های پروتئینی تنظیمی آپوپتوز به‌طور ظریفی متعادل هستند و یک توازن پیچیده بین عواملی که موجب آپوپتوز می‌شوند و عواملی که با آپوپتوز مقابله می‌کنند وجود دارد(٤۰).

به‌طور کلی، مطالعهٔ حاضر نشان داد یک دورهٔ تمرین تناوبی شدید، موجب افزایش شدید پروتئین Bax در حبابچه‌های ریوی می‌شود که احتمالاً نشانی از پیشبرد فرایندهای آپوپتوزی در ریه است. در همین راستا، افزایش معنادار Bcl-2 پس از تمرینات تناوبی شدید مشاهده شده که با توجه به مبانی نظری موجود، به‌نظر می‌رسد سازوکار مهاری برای توقف یا کاهش آپوپتوز و مقابله با Bax باشد. جهت تفسیر دقیق‌تر و مطمئن‌تر در ارتباط با چنین اثراتی از تمرینات تناوبی در ریه، به پژوهش‌های بیشتر نیاز است. همچنین آزمایشات جانبی هیستولوژی و استریولوژی نیز می‌تواند، در درک واقعی‌تر از تغییرات آپوپتوزی ریه با ورزش شدید موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

مطالعهٔ حاضر برگرفته از طرح پژوهشی موردنیاز ستاد کل نیروهای مسلح است که زیر نظر دانشگاه علوم‌پزشکی ارتش (آجا) و با حمایت دانشگاه‌های

[1]. Cellular tumor antigen *p53*

مازندران و تبریز به سرانجام رسید. بدین وسیله از مساعدت اساتید و کارشناسان محترم دانشگاهای مذکور تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Fan T-J، Han L-H، Cong R-S، Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2005;37(11):719-27.
2. Forde H، Harper E، Davenport C، Rochfort KD، Wallace R، Murphy RP، et al. The beneficial pleiotropic effects of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) within the vasculature: A Review of the Evidence. Atherosclerosis. 2016;247:87-96.
3. Krüger K، Alack K، Ringseis R، Mink L، Pfeifer E، Schinle M، et al. Apoptosis of T Cell Subsets after Acute High-Intensity Interval Exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2016.
4. Man SM، Kanneganti T-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation، cell death and innate immunity. Nature Reviews Immunology. 2016;16(1):7-21.
5. Shalini S، Dorstyn L، Dawar S، Kumar S. Old، new and emerging functions of caspases. Cell Death & Differentiation. 2015;22(4):526-39.
6. 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.
7. Um H-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. Oncotarget. 2016;7(5):5193-203.
8. Chao DT، Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annual Review of Immunology. 1998;16(1):395-419.
9. Czabotar PE، Lessene G، Strasser A، Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014;15(1):49-63.
10. Bardales RH، Xie S-S، Schaefer R، Hsu S-M. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. The American Journal of Pathology. 1996;149(3):845.
11. 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):132-8.
12. Phaneuf S، Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2001;33(3):393-6.
13. Yosef DO DM، Ali RE، Mehrdad HA. The effect of endurance swimming exercise on the occurrence of apoptosis in experimental diabetic myopathic rats. Journal of Veterinary Medicine، Islamic Azad University of Tabriz. 2009;3(4):629-36.
14. Sari-Sarraf V AR، Sheikholeslami-Vatani D، Faraji H. Effect of creatine supplementation on the factors involved in apoptosis-related process (Bax، Bcl-2) and their ratio (Bcl-2/Bax) during acute resistance exercise in middle-aged men. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2016;21(84):17-28.
15. Mehdi YA SM، GholamReza HA. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. Daneshvar Medicine 2016;23(124):51-60.
16. Schneider JP، Ochs M. Stereology of the lung. Methods in Cell Biology. 2012;113:257-94.
17. Hofman F. Immunohistochemistry. Current Protocols in Immunology. 2002:21.4. 1-.4. 3.
18. 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.
19. 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):133-6.
20. Mooren FC، Blöming D، Lechtermann A، Lerch MM، Völker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. Journal of Applied Physiology. 2002;93(1):147-53.
21. Wang J-S، Huang Y-H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. European Journal of Applied Physiology. 2005;95(4):290-7.
22. Lee YI، Cho JY، Kim MH، Kim KB، Lee DJ، Lee KS. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. European Journal of Applied Physiology. 2006;97(2):216-24.
23. Bagci E، Vodovotz Y، Billiar T، Ermentrout G، Bahar I. Bistability in apoptosis: roles of bax ،bcl-2، and mitochondrial permeability transition pores. Biophysical Journal. 2006;90(5):1546-59.
24. Skommer J، Wlodkowic D، Deptala A. Larger than life: mitochondria and the Bcl-2 family. Leukemia Research. 2007;31(3):277-86.

25. 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.

26. Podhorska-Okolow M، Krajewska B، Carraro U، Zabel M. Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. Folia Histochemica et Cytobiologica. 1999;37(2).

27. Podhorska-Okolow M، Sandri M، Zampieri S، Brun B، Rossini K، Carraro U. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. Neuropathology and Applied Neurobiology. 1998;24(6):518-31.

28. Podhorska-Okołów M، Dzięgiel P، Murawska-Ciałowicz E، Krajewska B، Ciesielska U، Jethon Z، et al. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. Folia Morphol. 2004;63(2):213-6.

29. Packer N، Pervaiz N، Hoffman-Goetz L. Does exercise protect from cognitive decline by altering brain cytokine and apoptotic protein levels? A systematic review of the literature. Exerc Immunol Rev. 2010;16:138-62.

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. 2011;110(3):730-7.

31. Podhorska-Okolow M، Dziegiel 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. 2006.

32. Wang HY، Shin VY، Leung SY، Yuen ST، Cho CH. Involvement of bcl-2 and caspase ۳–in apoptosis induced by cigarette smoke extract in the gastric epithelial cell. Toxicologic Pathology. 2003;31(2):220-6.

33. Siu PM، Bryner RW، Martyn JK، Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. The FASEB Journal. 2004;18(10):1150-2.

34. Tuan T-C، Hsu T-G، Fong M-C، Hsu C-F، Tsai KK، Lee C-Y، et al. Deleterious effects of short-term، high-intensity exercise on immune function: evidence from leucocyte mitochondrial alterations and apoptosis. British Journal of Sports Medicine. 2008;42(1):11-5.

35. Viña J، Gomez-Cabrera MC، Borras C، Froio T، Sanchis-Gomar F، Martinez-Bello VE، et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009;61(14):1369-74.

36. Neto JCR، Lira FS، Oyama LM، Zanchi NE، Yamashita AS، Batista Jr ML، et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. European Journal of Applied Physiology. 2009;106(5):697-704.

37. Koçtürk S، Kayatekin B، Resmi H، Açıkgöz O، Kaynak C، Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. European Journal of Applied Physiology. 2008;102(5):515-24.

38. Billen L، Shamas-Din A، Andrews D. Bid: a Bax-like BH3 protein. Oncogene. 2008;27:S93-S104.

39. Hoffman-Goetz L، Pervaiz N، Guan J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-α in intestinal lymphocytes. Brain، Behavior، and Immunity. 2009;23(4):498-506.

40. 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.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
24th Year, No.129
June- July 2017

Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli following six weeks of high intensity exercise training

Mehdi Yadegari[1*], Simin Riahy[2], Shadmehr Mirdar[1], GholamReza Hamidiyan[3], Mitra Yousefpour[4], Fatemeh Riyahi[2]

1. Department of Exercise Physiology، Faculty of Physical Education and Sport Sciences، University of Mazandaran، Mazandaran، Iran
2. Research Center of Epidemiology Science and Technology، Army University of Medical Sciences, Tehran، Iran
3. Department of Basic Sciences، Faculty of Veterinary Medicine، University of Tabriz، Tabriz، Iran
4. Department of Physiology، Medical Faculty، Army University of Medical Sciences, Tehran، Iran

*** Corresponding author e-mail: mehdi.sport313@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: From the perspective of molecular studies، since the relationship between high intensity interval training and apoptosis-related proteins in the lungs has not investigated, aim of this study was immunohistochemical detection of apoptotic proteins Bax and Bcl-2 in the lungs alveoli after 6 weeks of high intensity interval training.

Materials and Methods: This research was an experimental study. Samples of this study were 14 male Wistar rats (4 weeks old، 72±8 gr weight), healthy and no history of disease that divided into training and control groups (exercise training=7، control=7). The high intensity interval training program was carried out for 6 weeks. Training program was started with 25 m/min and ended with 70 m/min speed at the final stage. In each training session, rats completed the 1-min activity with 10 repetition and work to rest ratio was 1:2. Lung tissue was extracted for Immunohistochemistry tests and protein levels of Bax and Bcl-2 were measured. To analyze data، independent t- test was used ($P<0.05$).

Results: After 6 weeks of high intensity interval training، level of Bax protein significantly increased. Also, after 6 weeks of high intensity interval training، level of Bcl-2 protein also significantly increased ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that intensity interval training period causes significant changes in expression of pulmonary alveolar apoptotic proteins and its accurate interpretation that it may be helpful or harmful require further researches.

Key words: High intensity interval training، Apoptosis، Bax، Bcl-2، Lung

Received: 08/05/2017
Last revised: 21/06/2017
Accepted: 1/07/2017