

مقاله پژوهشی

پایش اثرات هایپوکسی و تیپر شدت بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک Bax و Bcl2 ریوی

مهدی یادگاری^{۱*}، سیمین ریاحی^۲، شادمهر میردار^۱، غلامرضا حمیدیان^۳، پریناز مصدق زوارق^۴، فریبا یحیوی^۵

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- مرکز پژوهشی علوم و فناوری اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

۳- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۵- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به پیشینه محدود پژوهشی در ارتباط با اثر تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف در کنار تنش هایپوکسی بر آپوپتوز ریوی، هدف پژوهش حاضر پایش اثرات هایپوکسی و تیپر شدت بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک Bax و Bcl2 ریوی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی ۲۴ سر رت نر صحرایی (سن ۴ هفته، وزن 72 ± 9 گرم) به‌صورت تصادفی به ۲ گروه کنترل (۸ سر) و تمرین (۱۶ سر) تقسیم شدند. نمونه‌ها پس از ۶ هفته تمرین بی‌هوازی وارد محیط هایپوکسی شده و ۳ هفته در آنجا زندگی کردند. گروه دیگری نیز هم‌زمان با قرارگیری در محیط هایپوکسی، به اجرای تیپر (کاهش ۳۰ درصدی در شدت تمرین) پرداختند. بیان پروتئینی Bax و Bcl2 حبابچه‌های ریه با روش ایمونوهیستوشیمی اندازه‌گیری شد. جهت تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD در سطح $P \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج: بیان پروتئین Bcl2 در نمونه‌های تمرین کرده و قرارگرفته در معرض هایپوکسی افزایش یافت و ۳ هفته بهره‌گیری از تیپر آن را کاهش داد ($P > 0.05$). بیان پروتئین Bax در نمونه‌های تمرین کرده و قرارگرفته در معرض هایپوکسی افزایش ($P \leq 0.05$) و در اثر تیپر کاهش یافت ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد هایپوکسی متوسط قادر است در ریه نمونه‌هایی که تمرینات شدیدی را پشت سر گذاشته‌اند اثرات آپوپتوزی اعمال کند و احتمال می‌رود بهره‌گیری از تیپر شدت این اثرات را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، تیپر، هایپوکسی، Bcl2، Bax

مقدمه

یکی از این محیط‌هایی که توسط ورزشکاران باهدف ارتقاء قابلیت‌های جسمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد ارتفاع است.

دستگاه تنفسی تغییراتی را جهت جبران کاهش فشار سهمی اکسیژن که همراه با افزایش ارتفاع به وجود می‌آید متحمل می‌شود (۱، ۲). علاوه بر این محیط مرتفع یا هایپوکسیک در کنار فواید فیزیولوژیکی که بر روی شاخص‌های خونی یا اجرای ورزشی دارد، ممکن است اثرات مضر التهابی یا آپوپتوزی

یکی از این محیط‌هایی که توسط ورزشکاران باهدف ارتقاء قابلیت‌های جسمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد ارتفاع است. دستگاه تنفسی تغییراتی را جهت جبران کاهش فشار سهمی اکسیژن که همراه با افزایش ارتفاع به وجود می‌آید متحمل می‌شود (۱، ۲). علاوه بر این محیط مرتفع یا هایپوکسیک در کنار فواید فیزیولوژیکی که بر روی شاخص‌های خونی یا اجرای ورزشی دارد، ممکن است اثرات مضر التهابی یا آپوپتوزی

(Apoptotic) مزمنی بر ساختار مسیرهای تبادل یا هدایتی ریه داشته باشد (۳-۶). آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول است که به‌وسیله مجموعه‌ای از پیام‌های بین سلولی و تحت شرایط مشخص رخ می‌دهد (۷). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به‌عنوان یک نقطه کنترلی در فعال‌سازی آبشار کاسپاسی آپوپتوز نقشی حیاتی را بر عهده دارند. بیش از ۱۲ عضو از اعضای خانواده Bcl-2 کشف و شناسایی شده است که به دو زیررده اصلی شامل اعضای ضد آپوپتوزی یا مهارکننده‌ها (از قبیل Bcl-2، Mcl-1، Bcl-XL، Bcl-W و Bag-1) و اعضای پیش آپوپتوزی یا پیش برنده‌ها

*نویسنده مسئول: مهدی یادگاری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
Email: mehdi.sport313@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0001-6442-4863

بررسی اثرات هایپوکسی و تیپر شدت در بیان پروتئین‌های آپوتوتیک Bcl2 و Bax ریوی بپردازد تا به این پاسخ برسد که آیا بهره‌گیری از تکنیک شدت تیپر می‌تواند عوارض آپوپتوزی ریوی قرارگیری در معرض هایپوکسی را کاهش دهد یا خیر.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش تجربی حاضر را (کد ثبت طرح: ۹۹۵۶۷۴) ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزنی 72 ± 9 گرم) تشکیل داده بودند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند و به‌صورت تصادفی به ۳ گروه کنترل ۹ هفته (۸ سر)، هایپوکسی (۶ هفته تمرین + ۳ هفته هایپوکسی، ۸ سر) و هایپوکسی تیپر (۶ هفته تمرین + ۳ هفته تیپر در هنگام قرارگیری در هایپوکسی، ۸ سر) تقسیم شدند. نمونه‌ها از نظر سلامت بدنی کاملاً سالم و هیچ‌گونه سابقه بیماری نداشتند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید در دمای 23 ± 2 درجه سانتی-گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند، سپس به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوار گردان آشنا شدند. در طی پژوهش غذای استاندارد پلت (ساخت شرکت به پرور) و آب به‌صورت در دسترس در اختیار نمونه‌ها قرار گرفت.

قالب اجرای پژوهش بدین شکل بود که در ابتدا نمونه‌ها به ۲ گروه تمرین (۱۶ سر) و کنترل (۸ 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 برنامه‌ی تمرین تناوبی فزاینده اجرا شد. برنامه تمرین تناوبی شدید اصلی به‌صورت ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای انجام شد، به‌گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود و کل تمرین روزانه برای هر رت ۳۰ دقیقه طول کشید. نمونه‌ها ۴ و ۵ جلسه در هفته به ترتیب در مراحل آماده-سازی و دوره برنامه اصلی ورزشی تمرین کردند. برنامه تمرین تناوبی فزاینده با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه (تمرین شدید، ۱۸۵ درصد Vo_{2max}) در پایان هفته ششم پایان پذیرفت (جدول ۱). به‌غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن در نظر گرفته شد (۶). برای تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی

(Promoters) (از قبیل Bax، Bad، Bak و Bid) تقسیم‌بندی می‌شوند (۸). مشاهده‌شده بیان این پروتئین‌ها با تمرینات ورزشی و هایپوکسی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، اما مکانیسم‌های درگیر در این پاسخ‌ها و سازگاری این پروتئین‌ها به پروتکل‌های مختلف ورزشی از هویت روشنی برخوردار نیست (۹، ۱۰).

در علوم ورزشی هرگونه کاهش بار تمرین که می‌تواند در ابعاد حجم یا شدت باشد تیپر گفته می‌شود (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد راهبرد تیپر در بهبود عملکرد مؤثر است، هرچند معجزه نمی‌کند. گزارش‌های واقع‌بینانه حاکی از بهبود عملکرد حدود ۳٪ است (۱۴-۱۲). از سال ۱۹۸۰ تعدادی از مطالعات، پاسخ‌های فیزیولوژیک مختلف در ارتباط با تغییرات قلبی-تنفسی، متابولیکی، هورمونی، عصبی-عضلانی و سیستم ایمنی در سراسر دوره تیپر در تعدادی از رشته‌های ورزشی را بررسی کردند (۱۵، ۱۶). مطالعات متعددی وجود دارد که بهبود قابل‌توجهی را در عملکرد ریوی به‌عنوان نتیجه ورزش نشان می‌دهند اما برخی دیگر از مطالعات این موضوع را نقض می‌کنند (۱۷). مطالعه Chimenti و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند تمرین استقامتی تداومی سلول‌های التهابی راه‌های هوایی را افزایش می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که تمرینات استقامتی با شدت متوسط تحت شرایط استاندارد منجر به کاهش سلول‌های اپیتلیال مزک‌دار (Ciliated epithelial cells)، افزایش آپوپتوز و ترمیم فعال راه‌های هوایی کوچک اپیتلیال برونشیا (Bronchial epithelium) می‌شود (۱۸). در ادامه mirdar و همکاران (۱۳۹۴) اظهار داشتند تیپر به مدت سه هفته عوارض ناشی از ورزش شدید در مجاری تنفسی تحتانی رت‌ها را کاهش می‌دهد (۱۹). همچنین yadegari و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند پس از یک دوره تمرین تناوبی شدید، بیان پروتئین‌های Bcl2 و Bax حبابچه‌های ریوی به‌طور معناداری افزایش یافته است (۱۰). با بررسی ادبیات پژوهش به این واقعیت پی می‌بریم که هرچند تاکنون مطالعات زیادی به بررسی تأثیر تیپر بر عملکرد ورزشی (۱۳) و تا حدودی مطالعاتی به بررسی تأثیر این تکنیک در کاهش شاخص‌های التهابی خونی پرداخته است (۲۰)، اما سودمندی این تکنیک بر مورفولوژی و فیزیولوژی بافت، مخصوصاً بافت ریه با سؤالات بسیاری روبه‌رو است که پاسخ به آن‌ها مطالعات بیشتر را می‌طلبد. با توجه به خلأ دانشی در ارتباط با اثر تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف در کنار تنش هایپوکسی بر آپوپتوز بافت ریه، پژوهش حاضر بر آن شد تا به

جدول ۱- برنامه ۶ هفته‌ای تمرین 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 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

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 نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود.

پس از پایان مرحله اول پژوهش (تمرین تناوبی شدید ۶ هفته‌ای)، مرحله دوم پژوهش که القای هایپوکسی و تیپر بود اجرا شد. این مرحله سه هفته طول کشید به گونه‌ای که ۸ سر از نمونه‌های گروه تمرین پس از ۶ هفته تمرین بی‌هوازی، وارد محیط هایپوکسی شدند و در اتاقک کم‌فشار (Hypoxic chamber) در ارتفاع شبیه‌سازی شده معادل ۲۷۵۰ متر (فشار جو: $mmHg: 550$, $PCO_2: 0.14$, $PO_2: 115.13$, $PN_2: 434.71$ mmHg) به مدت ۳ هفته به‌طور شبانه‌روز زندگی کردند و جز در موارد تمیز کردن و جایگزینی آب و غذا از اتاقک خارج نشدند. ۸ سر باقیمانده گروه تمرین نیز به همان شکل گروه هایپوکسی در شرایط هایپوکسی زندگی کردند و علاوه بر این در طول این ۳ هفته، برنامه تمرینی خود را با شدت کمتر از برنامه انتهای ۶ هفته تمرین (تیپر شدت معادل ۳۰ درصد) اجرا کردند. در این گروه شدت دویدن از ۷۰ متر در دقیقه به ۵۰ متر در دقیقه (تمرین شدید، ۱۴۰ درصد Vo_{2max}) رسید و بقیه شرایط اجرای پروتکل تمرین مانند گروه تمرین ۶ هفته بود. شدت تمرینات با توجه به مقاله مروری Howley و همکاران (۱۹۹۵) تخمین زده شد (۲۱). همچنین ۸ سر گروه کنترل باقیمانده نیز به مدت ۳ هفته دیگر در همان شرایط کنترلی خود زندگی کردند. در پایان نمونه‌ها کشته و بافت ریه چپ همگی آن‌ها جداسازی شد.

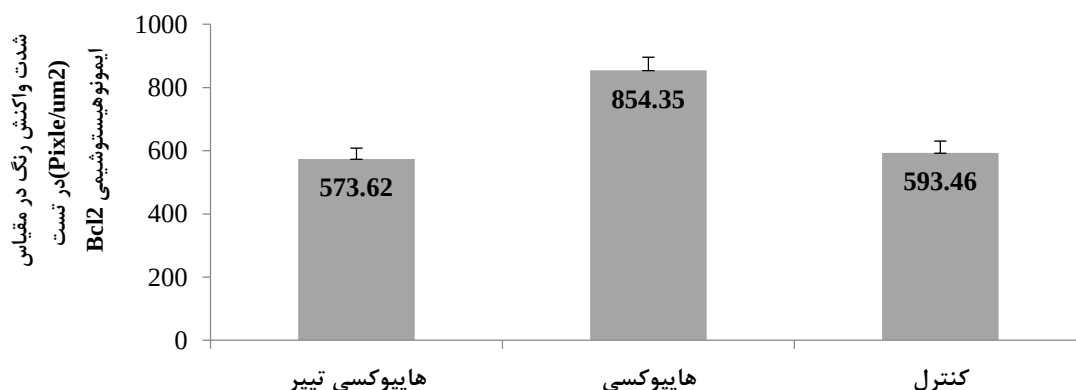
نمونه‌گیری بافتی از ریه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره تمرین ورزشی (گروه تیپر در هایپوکسی) و هایپوکسی (گروه هایپوکسی) انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین (Ketamine) (۵۰-۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۵-۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بی‌هوش و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد (۱۰). پس از سپری شدن ۵ روز از زمان فیکس بافتی، ابتدا با استفاده از تکنیک اورینتاتور 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 آلمان) و آماده‌سازی قالب‌های پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم دورانی مدل ۸۲۰، برش‌های متوالی به ضخامت ۵ میکرومتر جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. به‌منظور تعیین اولین مقطع و حداقل فواصل بین مقاطع از نتایج مطالعه پایلوت استفاده گردید (۲۲).

از هر ریه به‌طور تصادفی پنج برش به ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bcl-2 و پنج برش دیگر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی Bax انتخاب شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش انویشن (Envision) و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی Bcl-2 کد ۰۴۴-۴۳۶ ساخت شرکت milli pore آمریکا و آنتی‌بادی اختصاصی Bax کد ۶۹۶۴۳ ساخت شرکت Abcam انگلستان انجام شد. در ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند.

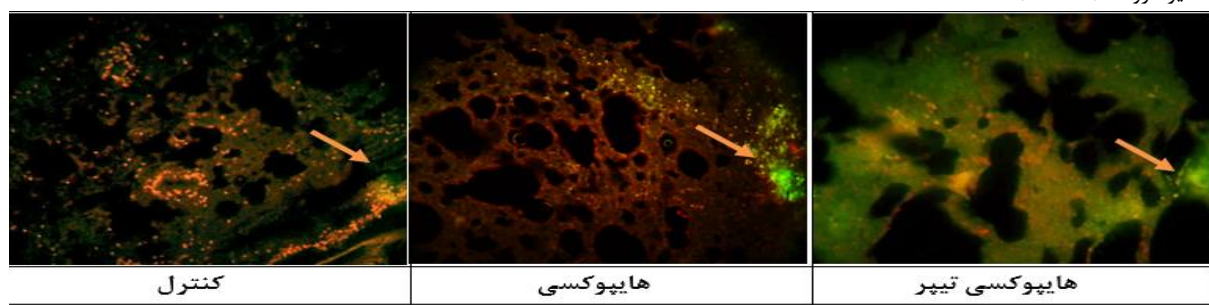
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه‌ها، از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کلوموگروف اسمیرنوف (k-s) استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.21 در سطح معناداری $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج

تحلیل آماری نشان داد ۶ هفته تمرین ورزشی بی‌هوای و پس‌از آن ۳ هفته قرارگیری در محیط هایپوکسی، بیان پروتئینی Bcl2 نسبت به گروه کنترل را به‌طور غیر معنادار افزایش داد (۴۴ درصد). همچنین دیده شد ۳ هفته اجرای تیپر در محیط هایپوکسی سبب کاهش زیاد اما غیر معنادار (۴۹/۰۴ درصد) بیان پروتئینی Bcl2 نسبت به گروه هایپوکسی شد و تقریباً در سطحی معادل گروه کنترل قرار گرفت ($P > 0.05$ ، نمودار ۱، شکل ۱).



نمودار ۱- بیان پروتئین Bcl2 حبابچه ریوی در گروه‌های پژوهش. داده‌ها برحسب میانگین $\pm$ خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pxl/um2) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند. * تفاوت معنادار نسبت به سایر گروه‌ها ($P \leq 0.05$).



شکل ۱- بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl-2 در گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه Bcl-2 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس $\times 200$ صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی‌بادی پروتئین Bcl-2 را نشان می‌دهد.

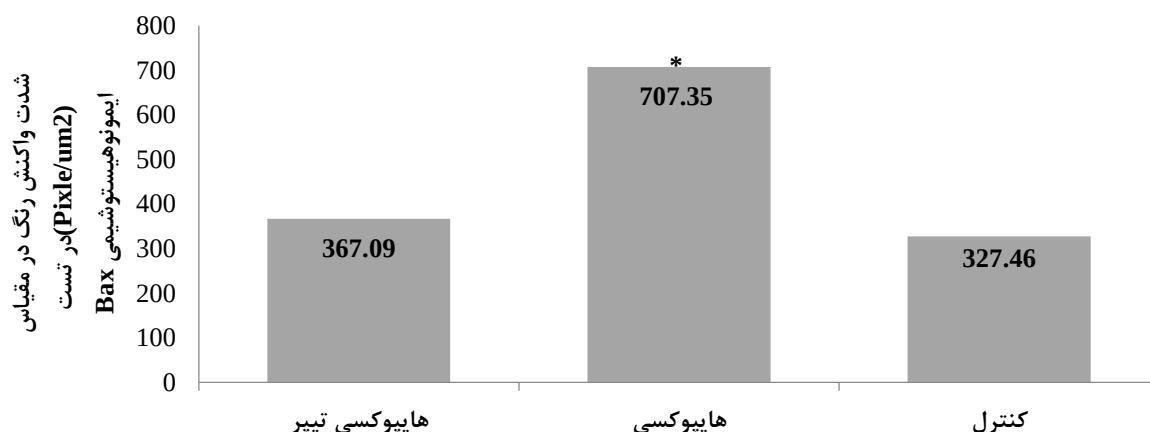
هایپوکسی)، بیان Bcl2 را افزایش و ۳ هفته تمرین با الگوی تیپر (کاهش بار) در محیط هایپوکسی آن را کاهش داد که این تغییرات نسبت به گروه کنترل غیر معنادار بودند؛ اما در ارتباط با متغیر Bax، افزایش معنادار در گروه هایپوکسی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که اجرای تیپر در محیط هایپوکسی (گروه هایپوکسی تیپر) منجر به کاهش آن شد به نحوی که در سطحی با تفاوت غیر معنادار نسبت به گروه کنترل قرار گرفت.

در سال‌های اخیر مطالعه در زمینه آپوپتوز توجه بسیاری از پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کرده است، زیرا شواهد نشان می‌دهد که علاوه بر مرگ سلولی به شکل نکروز، مرگ سلولی به صورت آپوپتوز نیز با تنش‌های ورزشی و محیطی رخ می‌دهد. فعالیت ورزشی شدید ممکن است سبب آسیب‌های مکانیکی

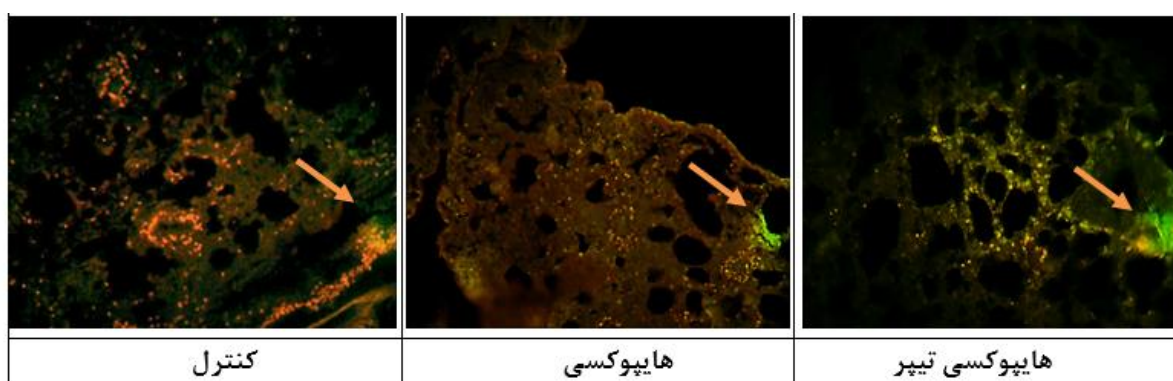
در ارتباط با متغیر Bax دیده شد که ۶ هفته تمرین بی‌هوازی و پس از آن ۳ هفته قرارگیری در محیط هایپوکسی سبب افزایش معنادار بیان پروتئینی Bax (۱۱۶/۲۰ درصد، $P \leq 0.05$) نسبت به گروه کنترل شد و اجرای ۳ هفته تیپر در محیط هایپوکسی سبب کاهش غیر معنادار (۱۹ درصد، $P > 0.05$) آن نسبت به گروه هایپوکسی شد، به گونه‌ای که در سطحی با اختلاف غیر معنادار نسبت به گروه کنترل قرار گرفت (نمودار ۲، شکل ۲).

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات هایپوکسی و تیپر شدت بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک Bax و Bcl2 ریوی بود. به طور خلاصه در این پژوهش مشاهده شد ۶ هفته تمرین تناوبی شدید و پس از آن ۳ هفته قرارگیری در محیط هایپوکسی (گروه



نمودار ۲- بیان پروتئین Bax حبابچه ریوی در گروه‌های پژوهش. داده‌ها برحسب میانگین $\pm$ خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixel/um2) گزارش شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بیان Bax در گروه هایپوکسی نسبت به گروه کنترل به طور معنادار افزایش یافته است و تفاوت معناداری بین گروه هایپوکسی تیپر با گروه کنترل وجود ندارد. * تفاوت معنادار نسبت به سایر گروه‌ها ($P \leq 0.05$).



شکل ۲- بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bax در گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه Bax به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس $200\times$ صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر (نقاط سبز رنگ) واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی‌بادی پروتئین Bax را نشان می‌دهد.

سلول شده و احتمال می‌رود با افزایش استرس اکسیداتیو سلولی، واکنش‌های پیش آپوپتوزی را تسریع نماید (۳۳).

تائید شده که شدت هایپوکسی تعیین می‌کند که آیا سلول با هایپوکسی سازگار می‌شود و زنده می‌ماند و یا دچار مرگ می‌گردد. در شرایط هایپوکسی یک توازن پیچیده بین عواملی که موجب آپوپتوز می‌شوند و عواملی که با آپوپتوز مقابله می‌کنند وجود دارد (۳۴). با توجه به اینکه نمونه‌های پژوهش حاضر قبل از ورود به هایپوکسی ابتدا به مدت ۶ هفته تحت اجرای تمرینات بی‌هوای شدید قرار گرفته بودند و در ادامه وارد محیط هایپوکسی شدند، این احتمال وجود دارد تنش مکانیکی-شیمیایی-اکسایشی ناشی از تمرینات شدید، پارانشیم ریه را مستعد پذیرش شرایط پیش آپوپتوزی در محیط هایپوکسی کرده باشد و از این طریق توانایی آن را جهت سازگاری با ارتفاع (مصنوعی) متوسط ۲۷۵۰ متر کاهش داده باشد (۳۴).

همسو با نتایج پژوهش حاضر Shin-Da lee و همکاران (۲۰۰۷) اثرات هایپوکسی متناوب بلندمدت روی میتوکندری و مسیر آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ قلب را بررسی کردند. نتایج نشان داد مسیر آپوپتوزی وابسته به میتوکندری $BNIP_3$ ، کاسپاس ۳، کاسپاس ۸، کاسپاس ۹ و مسیر آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ Fas به‌طور معنی‌داری بعد از ۴ هفته افزایش یافت. علاوه بر این Bcl2 مرتبط به میتوکندری و سیتوکروم C اکسیداز بعد از ۴ هفته کاهش یافت. محققان در نهایت گزارش کردند که مسیرهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری و مسیرهای آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ در قلب در شرایط هایپوکسی بلندمدت فعال می‌شوند (۳۶). کمبود اکسیژن حمل‌ونقل پروتون را مهار می‌کند که کاهش پتانسیل غشاء را در پی دارد. کاهش ATP به‌دست‌آمده از میتوکندری، سبب فعال شدن پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مثل Bax و Bad می‌شود و در نهایت منجر به انتشار سیتوکروم C به داخل سیتوزول می‌گردد (۳۷).

با توجه به اینکه تمرین ورزشی شدید و هایپوکسی می‌توانند سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و التهاب شده و باعث آپوپتوز ریوی گردد (۳۸)، و از طرفی میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز مهره‌داران دارد و در طی فعالیت ورزشی شدید، افزایش تولید اکسیدانت منجر به آسیب DNA و پروتئین‌ها می‌شود، مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای از آسیب DNA می‌تواند بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی و پیش‌آپوپتوزی را تغییر دهد و فرایند آپوپتوز را آغاز کند. افزایش تولید اکسیدانت می‌تواند میتوکندری را تحریک

قابل‌ملاحظه‌ای شود که به پاسخ‌های التهابی، آپوپتوز و نکروز منجر می‌شود (۲۴).

همسو با نتایج این پژوهش Phaneuf و Leeuwenburgh (۲۰۰۱) دریافتند تمرین ورزشی سبب القای آپوپتوز می‌شود که یک‌روند طبیعی برای از بین بردن سلول‌های آسیب‌دیده است (۲۵). همچنین Kwak و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند ۱۲ هفته تمرین ورزشی روی نوار گردان، پروتئین ضدآپوپتوزی BCL-2 را افزایش می‌دهد (۲۶). علاوه بر این در تائید یافته‌های این پژوهش Kruger و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند ۳ ساعت پس از اجرای جلسه ورزشی شدید، افزایش معنی‌داری در آپوپتوز لنفوسیت به وجود می‌آید که با کاهش معنی‌دار در نیروی غشاء میتوکندریایی، کاهش بیان BCL-2 و افزایش CD95 همراه است (۲۷).

در پژوهش حاضر پروتئین Bax حبابچه ریوی پس از ۶ هفته تمرین بی‌هوای شدید و قرارگیری در محیط هایپوکسی افزایش پیدا کرد که احتمالاً نشانگر تشدید فرایندهای پیش برنده مرگ سلولی در ریه است. همسو با این موضوع، بیان پروتئین مهارگر آپوپتوز Bcl-2 نیز افزایش غیر معنادار یافت که احتمالاً دلیلی بر بروز واکنش‌های جبرانی ضد آپوپتوزی است. با توجه به اینکه Bcl-2 مانع افزایش Bax می‌شود، به نظر می‌رسد افزایش Bcl-2 یکی از مکانیسم‌های سرکوب‌کننده Bax بوده است (۲۸). افزایش Bcl-2 با تحکیم دیواره میتوکندری، سرکوب Bax، جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c، تنظیم کلسیم رهاشده از سارکوپلاسمیک و کاهش اثر Reactive oxygen species (ROS) ناشی از فعالیت ورزشی، ایمنی سلول را بالا می‌برد و از آپوپتوز ناشی از استرس جلوگیری می‌کند (۲۹، ۳۰).

شاید استرس ایجادشده ناشی از تمرین بی‌هوای و کاهش فشار اکسیژن در محیط هایپوکسی، با افزایش فاکتورهای پیش آپوپتوزی مثل سایتوکین‌های پیش التهابی، گلوکوکورتیکوئیدها، ROS، فاکتورهای التهابی و افزایش کنترل نشده کلسیم سیتوزولی همراه بوده است و سلول‌های حبابچه‌ای را به سمت آپوپتوز سوق داده است (۳۱، ۳۲). در تائید این فرضیه، yadegari و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند یک دوره تمرینات تناوبی شدید و قرارگیری در محیط هایپوکسی منجر به ظهور واکنش‌های پیش التهابی در ریه از جمله افزایش بیان IL-6 و فراخوانی سلول‌های ماکروفاژی به بافت ریه می‌شود (۶). پژوهش‌ها نشان داده‌اند هایپوکسی سبب اختلال در هموستاز

نشان دادند تمرینات ورزشی بی‌هوازی و شدید قادر هستند پارانشیم ریه را به سمت التهاب و رمدلینگ سوق دهند (۳۹). farhangi و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی تأثیر ۲ مدت زمان مختلف تیپر بر غلظت پلاسمایی IL-6, IL-1B, TNF-a و عملکرد دوچرخه‌سواران مرد نخبه پرداختند. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار غلظت سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-1B, IL-6 و TNF-a پس از یک دوره تیپر در ورزشکاران بود (۲۰). گزارش شده سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله عواملی هستند که منجر به القاء آپوپتوز می‌شوند (۴۰). همچنین Papacosta و Gleeson (۲۰۱۳) در مقاله‌ی مروری خود، تأثیر تیپر بر عملکرد سیستم ایمنی را بررسی کردند. آن‌ها تیپر را به‌عنوان یک راهکار مفید برای کاهش اختلالات سیستم ایمنی ناشی از ورزش شدید معرفی کردند (۴۱).

اکثر مطالعاتی که تیپر ۱ تا ۳ هفته‌ای را روی پاسخ‌های ایمنی و اندوکراین ورزشکاران تمرین کرده آزمایش کردند، عموماً افزایش عملکرد را گزارش داده‌اند که اغلب با افزایش فعالیت آنابولیکی، کاهش استرس فیزیولوژیکی و ترمیم ایمنی مخاطی و عملکرد سیستم ایمنی همراه بوده است (۴۱). لذا به نظر می‌رسد در این پژوهش نیز تیپر توانسته است اختلالات سیستم ایمنی در بیان فاکتورهای پیش التهابی مختلف را متعادل کند و احتمالاً با مهار بیش‌ازحد آن‌ها در شرایط تمرین و هایپوکسی، به مهار سازوکارهای مرتبط با آپوپتوز کمک کرده باشد (۴۲).

نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر چنین به نظر می‌رسد که محیط هایپوکسی بر روی نمونه‌هایی که تمرینات شدیدی را پشت سر گذاشته‌اند اثرات آپوپتوزی یا پایدارسازی آپوپتوز (حفظ آپوپتوز تشدید شده در شرایط تمرین) اعمال می‌کند. بالا بودن شاخص‌های آپوپتوز در نمونه‌هایی که ۳ هفته در استراحت مطلق زندگی کردند (زندگی در محیط هایپوکسی) قدری قابل‌تأمل است. این موضوع را احتمالاً می‌توان به‌عنوان ضعیف بودن مکانیسم‌های جبرانی آپوپتوز ریه در محیط هایپوکسی بعد از تمرین شدید یا واکنش آپوپتوتیک ریه به هایپوکسی متوسطی دانست که قبلاً در اثر تمرینات شدید درگیر واکنش‌های التهابی-اکسایشی شده است. سرعت ۵۰ متر در دقیقه دویدن روی تردمیل (تیپر) در نوع خود یک تمرین بی‌هوازی با شدت بالای متوسط به حساب می‌آید، اما به نظر می‌رسد با توجه باینکه این

کند تا پروتئین‌های فعال‌کننده کاسپاس را آزاد کند. همچنین آزادسازی سیتوکروم c و عوامل ایجادکننده آپوپتوز (AIF) در اثر عملکرد اکسیدانت‌ها رخ می‌دهد (۲۵).

مخالف با یافته‌های این پژوهش مشاهده شده یک دوره تمرین هوازی قطعه‌قطعه شدن DNA، فعالیت کاسپاس-۳، پروتئین BAX و نسبت BAX/BCL-2 در عضلات ساق پا را کاهش می‌دهد که نشان از کاهش شرایط پیش آپوپتوزی دارد. به نظر می‌رسد کم بودن شدت تمرین عامل مهمی در جهت سازگاری سلول عضلانی با الگوی تمرین بوده است و از این طریق با افزایش احتمالی فعالیت آنتی اکسیدانتی و کاهش اینترلوکین‌های پیش التهابی، سطح آپوپتوز در بافت را کاهش داده است (۲۶). همچنین در تضاد با یافته‌های این تحقیق Huang و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند یک دوره تمرین هوازی کم شدت فعالیت کاسپاس-۳، بیان Bad, Bak و میزان سیتوکروم c در گروه تمرینی مبتلا به فشارخون بالا را کاهش می‌دهد. محققان گزارش کردند تمرین ورزشی قادر است آپوپتوز قلبی در بیماران با فشارخون بالا را کاهش داده و افزایش طول عمر در مدل رت را در پی دارد. دیده شده است فعالیت‌های هوازی با کاهش فعالیت گیرنده‌های مرگ در سطح سلول و همچنین کاهش سطح گلوکوکورتیکوئیدها فعالیت پروتئین‌های پیش آپوپتوزی را کاهش می‌دهند (۱۰، ۳۵).

از نتایج مهم این پژوهش، تأثیرات مهارتی و کاهشی تیپر بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک پارانشیم ریوی در محیط هایپوکسی بود که به نظر می‌رسد منجر به تعدیل واکنش‌های پیش آپوپتوزی در ریه شده است. باوجوداینکه تنها ۳۰ درصد کاهش در شدت تمرین ورزشی بی‌هوازی (نسبت به انتهای ۶ هفته تمرین که سرعت تردمیل ۷۰ متر در دقیقه بود) رخ داده بود، این شدت تمرینی توانسته بود سطح Bax را به‌طور معنادار و سطح Bcl2 را به‌صورت غیر معنادار کاهش دهد. با توجه به نقش ثابت شده Bax در پیشبرد واکنش‌های پیش آپوپتوزی، کاهش آن با تیپر تا حدودی ساده‌تر قابل توصیف است (۳۶، ۳۷) اما در ارتباط با Bcl2 شاید بتوان کاهش ناشی از تیپر را به عدم نیاز به بیش جبرانی بیشتر ناشی از بیان Bax و تخفیف واکنش‌های آپوپتوتیک ارتباط داد (۳۸).

شاید بتوان بخشی از اثرات تعدیل‌کنندگی تیپر در بیان پروتئین‌های آپوپتوزی را با نقش‌های ضد اکسایشی و ضدالتهابی تیپر توجیه کرد. در این راستا yadegari و همکاران (۱۳۹۵)

که پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی موردنظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از طرح پژوهشی موردنیاز ستاد کل نیروهای مسلح (شماره ثبت ۹۹۵۶۷۴، تاریخ تصویب ۱۳۹۵/۳/۱۷) است که زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی ارتش (آجا) و با حمایت دانشگاه‌های مازندران و تبریز به سرانجام رسید. بدین‌وسیله از مساعدت اساتید و کارشناسان محترم مراکز نام‌برده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سرعت در طی ۳ هفته به‌صورت ثابت (غیر پیش‌رونده) اجرا شده، نمونه‌ها توانسته بودند از نظر فیزیولوژیکی خود را با شدت تمرین سازگار نموده و احتمالاً از اثرات ضد آپوپتوزی-ضدالتهابی آن بهره برده‌اند. تمام این فرضیه‌ها در حد احتمال است و نتیجه-گیری‌های منطقی نیازمند غنی‌تر شدن ادبیات پژوهش در این حیطه است. ازجمله نقاط قوت این پژوهش استفاده از نمونه‌های تمرین کرده در محیط هایپوکسی بود که یک الگوی جدید در زمینه پژوهش‌های فیزیولوژی ورزشی بود. همچنین به وجود آوردن شرایط تمرین در نورموکسی و اقامت در هایپوکسی از روش‌های قابل استناد در تمرینات آمادگی ورزشکاران به شمار می‌رود که در این پژوهش پیاده شد. عدم شمارش مستقیم سلول‌های دچار آپوپتوز شده از نقاط ضعف پژوهش حاضر بود.

References

1. Friedmann B, Frese F, Menold E, Bärtsch P. Effects of acute moderate hypoxia on anaerobic capacity in endurance-trained runners. *EJAP*. 2007;101(1):67-73.
2. Hackett PH, Roach RC, Schoene RB, Harrison GL, Mills Jr W. Abnormal control of ventilation in high-altitude pulmonary edema. *JAP*. 1988;64(3):1268-72.
3. Baek KJ, Cho JY, Rosenthal P, Alexander LEC, Nizet V, Broide DH. Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 α , chemokines, airway inflammation, TGF- β 1, and airway remodeling in a mouse model. *CI*. 2013;147(1):27-37.
4. Heath AG. Water pollution and fish physiology: CRC; 1995.
5. Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *JCEM*. 2000;85(10):3874-81.
6. 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.
7. Tews D, Goebel H, Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss W. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *NAN*. 1997;23(2):141-9.
8. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *NRMCB*. 2008;9(1):47-59.
9. Sermeus A, Genin M, Maincent A, Fransolet M, Notte A, Leclerc L, et al. Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PEJ*. 2012;7(11):e47519.
10. Yadegari M, Riahy S, Mirdar S, Hamidian GR, Yousefpor M, Riahi F. Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli following six weeks of high intensity exercise training. *DMJ*. 2017. 24.(129):31-40
11. 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):431-4.
12. Le Meur Y, Hausswirth C, Mujika I. Tapering for competition: A review. *SS*. 2012;27(2):77-87.
13. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. *SJMCS*. 2010;20(s2):24-31.
14. Bosquet L, Montpetit J, Arvisais D, Mujika I. Effects of tapering on performance: a meta-analysis. *MSSE*. 2007;39(8):1358-65.
15. Banister E, Carter J, Zarkadas P. Training theory and taper: validation in triathlon athletes. *EjAPOP*. 1999;79(2):182-91.
16. Mujika I, Padilla S. Scientific bases for precompetition tapering strategies. *MSSE*. 2003;35(7):1182-7.

17. Thaman RG, Arora A, Bachhel R. Effect of physical training on pulmonary function tests in border security force trainees of India. *JLS*. 2010;2(1):11-5.
18. Chimenti L, Morici G, Paternò A, Bonanno A, Siena L, Licciardi A, et al. Endurance training damages small airway epithelium in mice. *AJRCCM*. 2007;175(5):442-9.
19. Mirdar S, Arabzadeh E, Hamidian G. Effects of two and three weeks of tapering on lower respiratory tract in the maturing rat. *KJ*. 2015;16(3): 125-37.
20. Farhangimaleki N, Zehsaz F, Tiidus PM. The effect of tapering period on plasma pro-inflammatory cytokine levels and performance in elite male cyclists. *JSSM*. 2009;8(4):600.
21. Howley ET, Bassett DR, Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *MSSE*. 1995;27(9):1292-301.
22. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidian G, Mosadegh zavaragh P. Effect of the Adiantum capillus Veneris Extract on Bax and Bcl2 Apoptotic Markers of Lung Modulation in Trained Rats and Exposed to Hypoxic Stress. *JMP*. 2018;4(64):162-71.
23. Di Cataldo S, Ficarra E, Acquaviva A, Macii E. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. *CMPB*. 2010;100(1):1-15.
24. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner K-H. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses. *Exerc Immunol Rev*. 2008;14(1):51-72.
25. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *MSSE*. 2001;33(3):393-6.
26. Kwak H-B, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEBJ*. 2006;20(6):791-3.
27. 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. *JAP*. 2011;110(5):1226-32.
28. 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.
29. Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A. Larger than life: mitochondria and the Bcl-2 family. *LR*. 2007;31(3):277-86.
30. Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *APNM*. 2011;36(5):608-17.
31. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2001;33(3):393-6.
32. Arslan S, Erdem S, Sivri A, Hasçelik Z, Tan E. Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam. *RI*. 2002;21(4):133-6.
33. Song ZC, Zhou W, Shu R, Ni J. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 α pathway. *Cell proliferation*. 2012;45(3):239-48.
34. Greijer A, Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *JCP*. 2004;57(10):1009-14.
35. Huang C-Y, Yang A-L, Lin Y-M, Wu F-N, Lin JA, Chan Y-S, et al. Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. *JAP*. 2012;112(5):883-91.
36. Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *C*. 2013;152(3):519-31.
37. Westphal D, Kluck R, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2014;21(2):196-205.
38. Yin Z, Qi H, Liu L, Jin Z. The optimal regulation mode of Bcl-2 apoptotic switch revealed by bistability analysis. *B*. 2017;162(4):44-52.
39. Yadegari M, Mirdar SH, Hamidian Gh. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. *DMJ*. 2016;23(124):56-60.
40. Souza KL, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *JE*. 2008;197(1):139-50.
41. Papacosta E, Gleeson M. Effects of intensified training and taper on immune function. *RBEFE*. 2013;27(1):159-76.
42. Izquierdo M, Ibañez J, Gonzalez-Badillo JJ, Ratamess NA. Detraining and tapering effects on hormonal responses and strength performance. *JSCR*. 2007;21(3):768.

Original Article

Evaluating the Effects of Hypoxia and Taper on Expression of Pulmonary Bax and Bcl2 Apoptotic Proteins

Yadegari M^{1*}, Riahy S², Mirdar SH¹, Hamidian GH³, Mosadegh P⁴, yahyavi F⁵

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

2. Faculty of Aerospace Medicine and subsurface, Army Medical University, Tehran, Iran

3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz

4. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mashhad, Mashhad, Iran

5. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 26 Aug 2017

Accepted: 14 Mar 2018

Abstract

Background & Objective: Due to The limitation of research literature, related to the effect of exercise training with different intensity, Along with Hypoxia Stress on Pulmonary Apoptosis, The purpose of this study was to investigate the effects of hypoxia and taper on expression of Bax and Bcl2 apoptotic proteins of lung.

Materials & Methods: In this experimental study Twenty-four rats (4-week old, 72±8 gr) were divided accidentally to control and training groups. The samples after 6 weeks anaerobic exercise training, were exposed to Environment hypoxia and lived three weeks over there. Another group Concurrent with exposure to hypoxic environment, implementation Taper (30% reduction in exercise intensity) technique. In lung tissue, the expression of Bax and Bcl2 was studied by the immunohistochemical methods. One-way Anova was performed to analyze data. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Expression of Bcl2 protein in trained rats and exposed to hypoxic stress was increased And reduced after a 3-week use of the taper ($P > 0.05$). Expression of Bax protein in trained rats and exposed to hypoxic stress was increased ($P \leq 0.05$), and reduced after a 3-week use of the taper ($P > 0.05$).

Conclusion: It seems that, Medium hypoxia is able to apply Apoptotic effects in lung of rats that underwent intensive exercise and likely the use of intensity taper reduces these effects.

Keywords: Apoptosis, Bax, Bcl2, Hypoxia, Taper

***Corresponding Author:** Mehdi Yadegari, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

Email: mehdi.sport313@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0001-6442-4863>