تأثیر عصاره پرسیاوش در تعدیل شاخص‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 ریوی رت‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض تنش هایپوکسی

مهدی یادگاری[1]*، سیمین ریاحی[2]، شادمهر میردار[3]، غلامرضا حمیدیان[4]، پریناز مصدق زوارق[5]

۱- دکتری 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- دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۴- استادیار، دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: مازندران، بابلسر، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، کدپستی: ۶۸۱۵۱۱۸۵۱۶
تلفن: ۰۹۳۸۷۶۷۷۵۰۱
پست الکترونیک: mehdi.sport313@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۴ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۴/۷

چکیده

مقدمه: آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که توسط مجموعه‌ای از پیام‌های بین سلولی و تحت شرایط مشخص رخ می‌دهد.

هدف: هدف پژوهش حاضر بررسی نقش عصاره پرسیاوش در تعدیل شاخص‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 ریوی رت‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هایپوکسی بود.

روش بررسی: نمونه‌های پژوهش حاضر را ۱۴ سر رت نر نژاد ویستار، کاملاً سالم و بدون سابقه بیماری (سن ۴ هفته و میانگین وزنی ۹±۷۲ گرم) تشکیل داده بودند که پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، ۳ هفته وارد محیط هایپوکسی شدند. نصف رت‌ها در طی ۳ هفته قرارگیری در هایپوکسی، روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره پرسیاوش دریافت کردند. در پایان، جهت انجام آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمی، بافت ریه خارج شد.

نتایج: تحلیل آماری نشان داد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه‌های قرار گرفته در معرض هایپوکسی، بیان پروتئینی Bax حبابچه‌های ریوی را به طور معنادار کاهش داد ($P\leq۰/۰۵$). همچنین دیده شد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هایپوکسی سبب افزایش غیرمعنادار بیان پروتئین Bcl2 حبابچه‌های ریوی می‌شود ($P>۰/۰۵$). علاوه بر این ملاحظه شد مکمل پرسیاوش سبب کاهش معنادار نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه هایپوکسی شد ($P\leq۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره پرسیاوش احتمالاً می‌تواند بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی حبابچه‌های ریوی قرار گرفته در معرض هایپوکسی را تعدیل نماید که احتمالاً تأثیری قابل ملاحظه در مهار واکنش‌های پروآپوپتوتیک ناشی از هایپوکسی در ریه دارد.

گل‌واژگان: پرسیاوش، تمرین تناوبی شدید، هایپوکسی، Bax، Bcl2

مقدمه

آپوپتوز نوعی از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده سلول است که بوسیله مجموعه‌ای از پیام‌های بین سلولی و تحت شرایط مشخص رخ می‌دهد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، منجربه بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌شود. بالعکس افزایش غیرطبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو (Neurodegenerative) و ایدز دیده می‌شود [۱]. اگرچه آبشارهای پروتئولیتیک (Proteolytic) فعال شده توسط کاسپاس‌ها (Caspase) نقش محوری را در فرآیند آپوپتوز ایفا می‌کنند، اما آغاز این فرایند توسط عوامل دیگری تنظیم و کنترل می‌شود. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به عنوان یک نقطه کنترلی بین سطح سلول و سیگنال‌های درونی جهت شکل‌گیری آپوپتوز و فعال‌سازی آبشار کاسپاسی، نقشی حیاتی را بر عهده دارند. بیش از ۱۲ عضو از اعضاء خانواده Bcl-2 کشف و شناسایی شده است که به دو زیر رده اصلی شامل اعضاء ضدآپوپتوزی یا مهارکننده‌ها (از قبیل Bcl-2، Mcl-1، Bcl-XL، Bcl-W و Bag-1) و اعضاء پیش آپوپتوزی یا پیش برنده‌ها (Promoters) (از قبیل Bax، Bad، Bak، Bid) تقسیم‌بندی می‌شوند [۲].

از جمله عواملی که می‌تواند نقش قوی در تسریع مرگ سلولی یا بروز آپوپتوز پاتولوژیایی آلوئول‌های ریه داشته باشد، تنش اکسیژن یا هایپوکسی است [۳]. افراد زیادی همچون نیروهای نظامی و ورزشکاران نخبه، به دلایل مختلف مجبور به اقامت و یا تمرین در محیط‌های مرتفع و دارای فشار سهمی اکسیژن پایین هستند. بهترین مثال کوهنوردان و یا ورزشکاران رشته‌های هوازی هستند که به منظور توسعه سازگاری‌های متابولیسمی به تمرین و یا زندگی در محیط‌های مرتفع روی می‌آورند. ارتفاعات ۱۵۰۰ متر یا بیشتر اثرات فیزیولوژیکی قابل توجهی بر بدن انسان وارد می‌آورد که شناخت آنها ضروری به نظر می‌رسد. بیشتر تحقیقات در مورد تأثیر ارتفاع بر بدن، به ارتباط بین ارتفاع و کاهش مقدار اکسیژن متمرکز شده است. نشان داده شده قرارگیری طولانی مدت در معرض هایپوکسی ممکن است اثرات تخریبی و مرتبط با مرگ سلولی روی سلول‌ها اعمال کند [۴]. حذف و یا به حداقل رساندن این مشکلات با مداخله‌های دارویی و تغذیه‌ای ممکن به نظر می‌رسد [۵]. مطالعات گیاه‌شناسی نشان می‌دهد پرسیاوش با دارا بودن عناصر ضدالتهابی و ضداکسایشی مهمی همچون فلاونوئیدها (Flavonoids) و ساپونین‌ها (Saponins) نقش مؤثری در مهار واکنش‌های التهابی بازی می‌کند و از این نظر ممکن است در مهار آپوپتوز یا تخریب سلولی مؤثر باشد [۶]. با وجود مصارف سنتی گیاه پرسیاوش، هنوز تحقیقات بالینی و ورزشی کاملی روی این گیاه ارزشمند صورت نگرفته. لذا لازم است با توجه به اثرات گوناگون بیولوژیک و درمانی گزارش شده از گیاه پرسیاوش با ایجاد الگوی بالینی ورزشی مناسب، از لحاظ بودن در نقش یک مکمل محافظتی ریه در برابر آپوپتوز احتمالی ناشی از تنش هایپوکسی بیشتر مورد بررسی قرارگیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش حاضر را ۱۴ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزنی ۸ gr ±۷۲) تشکیل داده بودند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند و به صورت تصادفی به گروه‌های تمرین + هایپوکسی (۷ سر) و گروه تمرین + هایپوکسی + مکمل (۷ 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 ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی- روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند، سپس به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. در طی پژوهش غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار نمونه‌ها قرار گرفت.

برنامه تمرین تناوبی شدید به صورت ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای انجام شد، به گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود وکل تمرین روزانه برای هر رت ۳۰ دقیقه طول می‌کشید. نمونه‌ها ۵ جلسه در هفته تمرین کردند. برنامه تمرین تناوبی شدید با سرعت ۲۵ متر بر

دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه در پایان هفته ششم پایان پذیرفت (جدول شماره ۱) [۷]. پس از پایان مرحله اول پژوهش (فعالیت تناوبی شدید ۶ هفته‌ای)، مرحله دوم پژوهش آغاز شد که ۳ هفته ادامه داشت. در طی این ۳ هفته نمونه‌های تمرین کرده پس از ۶ هفته تمرین تناوبی وارد محیط هایپوکسی (اتاقک کم فشار (Hypoxic chamber) اکسیژن در محیط شبیه‌سازی شده مصنوعی معادل ۲۸۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا) شدند و به مدت ۳ هفته در آنجا نگهداری شدند. نصف نمونه‌ها در طی ۳ هفته هایپوکسی، عصاره پرسیاوش را به صورت گاواژ دریافت کردند. میزان مصرف عصاره پرسیاوش به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز بود [۸].

تهیه عصاره پرسیاوش

برای تهیه عصاره گیاه پرسیاوش از روش خیساندن استفاده شد. بدین‌ترتیب که ۵۵ گرم پودر پرسیاوش با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد و در محلول ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. در طول این مدت درب ظرف حاوی خیسانده با پارافین به خوبی پوشانده شد و در دمای محیط ۲۰ تا۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مخلوط هر ۶ ساعت یکبار توسط میله شیشه‌ای هم‌زده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و توسط روتاری با دمای ملایم (زیر ۶۰ درجه سانتی‌گراد) حلال آن حذف شد. با وزن کردن عصاره غلیظ شده بازده آن ۷۵/۰۶ گرم به دست آمد (جدول شماره ۲).

نمونه‌گیری بافتی از ریه رت‌ها، ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره پژوهش (اتمام مرحله دوم) انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین (Ketamine) (۵۰ – ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از سپری شدن ۵ روز از زمان فیکس بافتی، 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 ۵ میکرومتر جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. به منظور تعیین اولین مقطع و حداقل فواصل بین مقاطع از نتایج مطالعه پایلوت استفاده شد [۹].

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 شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش انویژن (Envision) و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی Bcl-2 کد ۴۳۶-۰۴۴ ساخت شرکت milli pore و Bax کد ۶۹۶۴۳ ساخت شرکت Abcam انجام شد. برای این منظور در ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. پس از آن محلول پارا فرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه به بافت اضافه و در ادامه اسیدکلریدریک نرمال نیز به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. در ادامه بافر بورات به منظور خنثی‌سازی اسید به مدت ۵ دقیقه اضافه شد و سپس

جدول شماره ۱- برنامه ۶ هفته تمرین تناوبی شدید

هفته	آشنایی	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
سن	۶ هفته						
سرعت تردمیل(متر به دقیقه)	۱۰-۲۵	۲۵-۳۵	۳۵-۴۵	۴۵- ۵۵	۵۵-۶۵	۶۵-۷۰	۶۵-۷۰
زمان ست شدید(دقیقه)	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
استراحت بین ست ها (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

جدول شماره ۲- عصاره‌گیری پرسیاوش

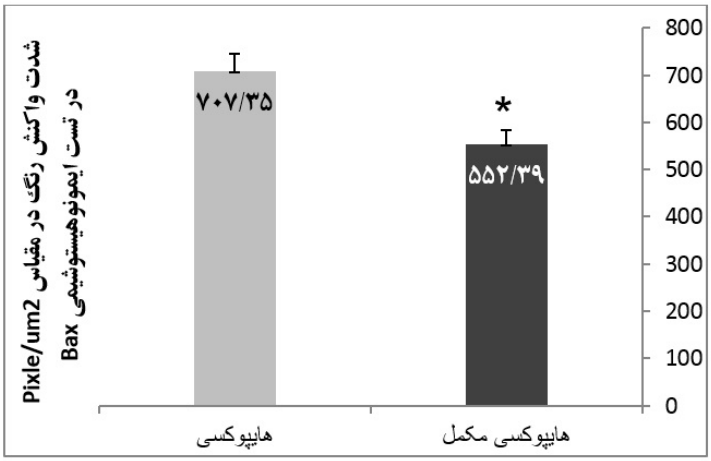
وزن پرسیاوش کوبیده شده	قبل خواباندن	۵۵گرم
	بعد خواباندن	۶۲/۳۷ گرم
الکل (اتانول ۷۰ درصد)		۱۵۰ میلی‌لیتر
محلول الکلی		۷۵/۰۶ گرم
عصاره پرسیاوش		۶/۵۳ گرم
ترکیب عصاره پرسیاوش با آب آشامیدنی		۱ گرم در۱۰ میلی‌لیتر

سلول‌ها با PBS شسته شدند. در این مرحله تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور پاره کردن غشای سلول‌ها اضافه و پس از آن مجدداً بافت‌ها با PBS شستشو داده شدند. در ادامه سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. آنتی‌بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به بافت اضافه شد و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت، به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. روز بعد ظرف حاوی بافت از یخچال خارج شد و سپس ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. درنهایت به بافت‌ها آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) با رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه شد و سپس درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از آن نمونه‌ها از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل شد و بعد از ۴ بار شستشو، به آنها PI اضافه شد و پس از ۵ دقیقه روی نمونه‌ها PBS ریخته شد [۱۰]. درنهایت با میکروسکوپ فلورسانت سلول‌ها ارزیابی و شمارش شدند. با استفاده از دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک ۵ فیلد مختلف انتخاب و تصویربرداری صورت گرفت و درنهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش، با نسخه ۱/۴۹ نرم‌افزار ImageJ مورد آنالیز قرار گرفته و به صورت داده‌های رتبه‌ای توصیف شدند [۱۱].

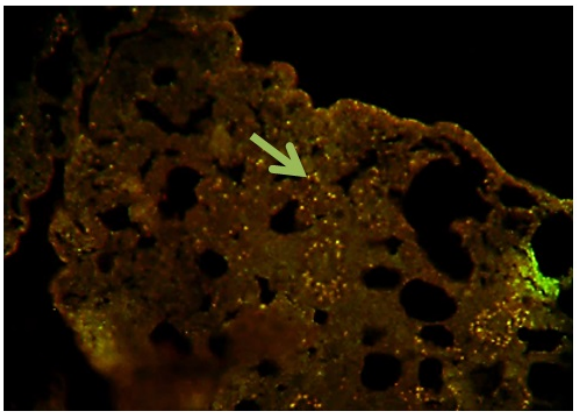
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه‌ها از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کلوموگروف اسمیرنوف (k-s) استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی t مستقل نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.21 و در سطح معناداری $P \leq ۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

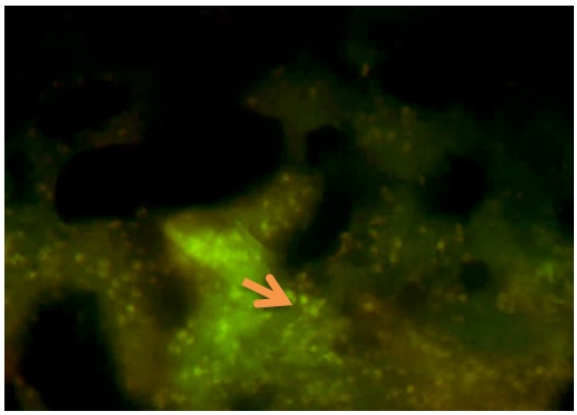
تحلیل آماری نشان داد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه‌های قرار گرفته در معرض هایپوکسی، بیان پروتئین Bax حبابچه‌های ریوی را به طور معنادار کاهش می‌دهد (۲۱ درصد کاهش، $P \leq ۰/۰۵$، نمودار شماره ۱، تصویر شماره ۱). همچنین دیده شد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هایپوکسی سبب افزایش غیرمعنادار بیان پروتئین Bcl2 حبابچه‌های ریوی شد (۳/۰۴ درصد افزایش، $P > ۰/۰۵$، نمودار شماره ۲، تصویر شماره ۲). علاوه بر این ملاحظه شد استفاده از مکمل پرسیاوش در محیط هایپوکسی سبب کاهش نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه هایپوکسی می‌شود (۲۴/۲۷ درصد کاهش، نمودار شماره ۳) (جدول شماره ۳).



نمودار شماره ۱- میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین Bax حبابچه ریوی در گروه های پژوهش. داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود میزان Bax در گروه هایپوکسی مکمل به طور معناداری نسبت به گروه هایپوکسی کاهش یافته است. * تفاوت معنادار نسبت به گروه هایپوکسی (P≤۰/۰۵).

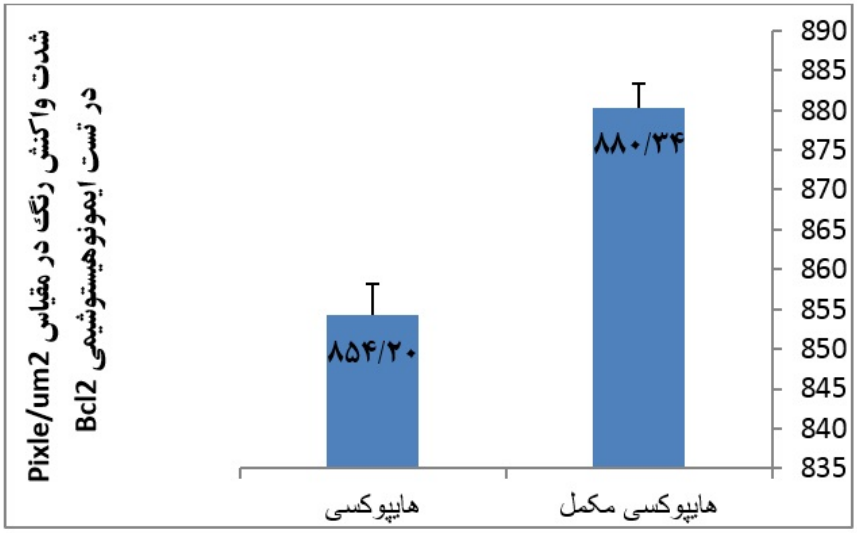


(هایپوکسی)

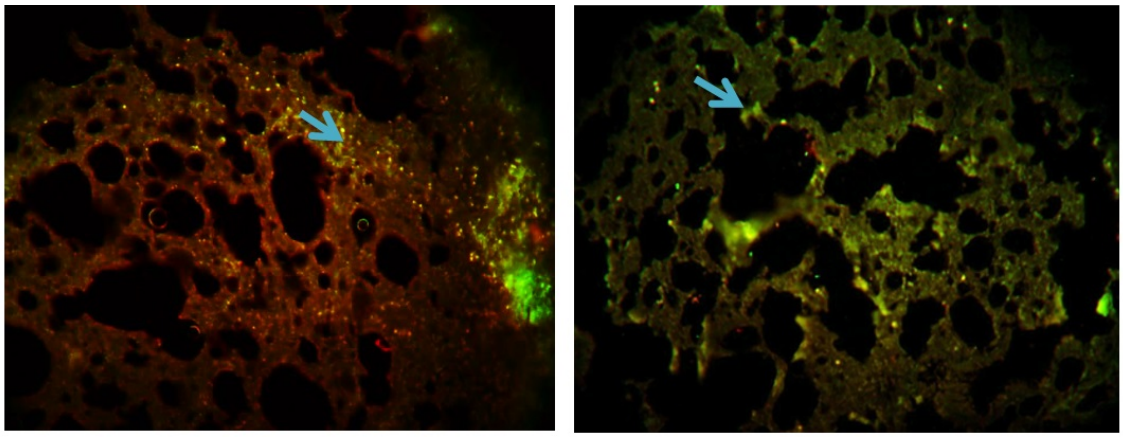


(هایپوکسی مکمل)

تصویر شماره ۱- تصاور مربوط به 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× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی‌بادی پروتئین Bax را نشان می‌دهد.

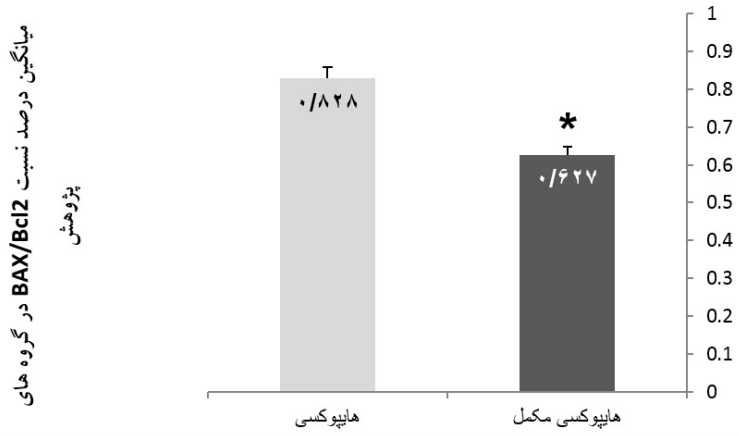


نمودار شماره ۲- میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین Bcl2 حبابچه ریوی در گروه‌های پژوهش. داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود میزان Bcl2 در گروه هایپوکسی مکمل نسبت به گروه هایپوکسی افزایش غیرمعنادار یافته است (P>۰/۰۵).



هایپوکسی مکمل) **(هایپوکسی)**

تصویر شماره ۲- تصاور مربوط به بررسی ایمونوهیستوشیمیایی شاخص پروتئینی Bcl2 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× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر واکنش مثبت سلول‌ها به آنتی‌بادی پروتئین Bcl2 را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۳- میانگین و خطای استاندارد نسبت Bax/Bcl2 حبابچه 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. همانطور که مشاهده می‌شود این شاخص در گروه هایپوکسی مکمل نسبت به گروه هایپوکسی به طور معنادار کاهش یافته است (P≤۰/۰۵).

جدول شماره ۳- سطوح شاخص اندازه اثر d کوهن برای سه متغیر Bax، Bcl2 و Bax/Bcl2

متغیر	Bax	Bcl2	نسبت Bax به Bcl2
شاخص d کوهن	۰/۶۳۵	۰/۳۷	۰/۷۱۰

بحث

هدف از اجرای پژوهش حاضر بررسی تأثیر عصاره پرسیاوش در تعدیل پروتئین‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 ریوی رت‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض تنش هایپوکسی بود. به طور خلاصه یافته‌های این پژوهش نشان داد متعاقب ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه‌های تمرین کرده و قرار گرفته شده در معرض هایپوکسی، بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax به طور معناداری کاهش می‌یابد. همچنین دیده شد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه‌های مذکور، بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 را افزایش می‌دهد. هرچند این افزایش به صورت معنادار نبود. در ادامه مشاهده شد نسبت Bax/Bcl2 در اثر ۳ هفته مصرف عصاره پر سیاوش به طور معنادار کاهش یافت.

از آنجایی که Bax از قوی‌ترین پروتئین‌های پیش برنده آپوپتوز و Bcl2 از قوی‌ترین پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز به شمار می‌روند، به طور کلی چنین به نظر می‌رسد عصاره پرسیاوش توانسته است در نمونه‌هایی که یک دوره تمرینات شدید ورزشی را تجربه کرده بودند و پس از آن در محیط تنش‌زای هایپوکسی قرار گرفته بودند، شرایط را به سمت کاهش رخداد فرآیندهای آپوپتوزی و تقویت فرآیندهای ضدآپوپتوزی تغییر دهد [۲]. Bax سبب القای نفوذپذیری غشای میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود. در پاسخ به سیگنال‌های مرگ سلولی از جمله هایپوکسی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری سبب آزاد شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز ((apoptosis-inducing factor (AIF)، سیتوکروم C، Smac/DIABLO و آندونوکلئاز G از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می‌شوند. Smac/DIABLO اثر انتاگونیستی روی مهارکنندگان آپوپتوز دارد. همچنین آزادسازی سیتوکروم C به داخل سیتوپلاسم و اتصال آن به Apaf-1 باعث تشکیل ترکیبی به نام dATP می‌شود. این ترکیب پروکاسپازها را فعال کرده که باعث فعالسازی کاسپاز ۹ و سرانجام کاسپاز ۶ و ۳ می‌شود [۱۲].

از یافته‌های دیگر پژوهش حاضر، کاهش معنادار نسبت Bax/Bcl-2 در گروه هایپوکسی مکمل نسبت به گروه هایپوکسی بود. این یافته تأییدی دیگر بر نقش مؤثر عصاره پرسیاوش در مهار شرایط پیش آپوپتوتیک و پروتئین‌های مرتبط با آن است. شاخصی که سطح آن از اهمیت بالایی در تشخیص شرایط آپوپتوزی بافت برخوردار است، نسبت Bax/Bcl-2 است که اگر افزایش یابد حاکی از پیشبرد آپوپتوز و اگر کاهش یابد نشان از کاهش رخداد آپوپتوز دارد. این نسبت نزدیکترین ارتباط به تعیین ادامه حیات یا مرگ آپوپتوزی سلول‌ها را دارد [۱۴-۱۲]. در این راستا سونگ (Song) و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند ۱۲ هفته تمرین ورزشی روی نوارگردان، پروتئین ضدآپوپتوزی BCL-2 را افزایش می‌دهد، درحالی که قطعه قطعه شدن DNA، فعالیت کاسپاس-۳، پروتئین Bax و نسبت Bax/BCL-2 در عضلات ساق پا را کاهش می‌دهد [۱۵].

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند تمرینات ورزشی با شدت بالا و هایپوکسی منجر به اختلال در هموستاز بدن شده و با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است [۱۶]. فیشر (Fisher) و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول را در پی دارد. 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 [۱۷]. ممکن است میتوکندری هدف مهمی برای فرآیند آپوپتوز ناشی از ROS باشد. ROS باعث کاهش پتانسیل اکسیدانتی سلولی می‌شود و نفوذپذیری غشای میتوکندری را افزایش می‌دهد که باعث رهاسازی سیتوکروم c و در نهایت فعالیت کاسپاس-۳ می‌شود.

چندین سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی وجود دارد که به غیرفعال شدن واکنش رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند عصاره برگ گیاه پرسیاوش می‌تواند به عنوان یک فاکتور قوی در مهار رادیکال‌های آزاد عمل کند. گزارش شده به عنوان یک راهکار، مکمل‌های گیاهی نظیر پرسیاوش که دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و همچنین ضدالتهابی بالا روی دستگاه تنفسی هستند، می‌توانند در مواقع کنترل بیماری مورد استفاده قرار گیرند [۱۸]. در این راستا گزارش شده که پرسیاوش رادیکال‌های آزاد را مهار نموده و سبب بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۱۸]. همچنین رادیکال‌های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی سبب آسیب به غشای سلول و DNA می‌شود. عصاره برگ پرسیاوش می‌تواند مانع از پراکسیداسیون لیپیدی شود و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود ببخشد. بنابراین پرسیاوش می‌تواند، رادیکال‌های آزاد را مهار نموده و سبب بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شود [۱۹].

ارزیابی فیتوشیمیایی پرسیاوش نشان از حضور مجموعه‌ای از ترکیبات از جمله فلانوئیدها (flavonoids)، تری‌ترپنوئیدها (triterpenoids)، فنیل پروپانوئیدها (phenylpropanoids)، اولی آنس‌ها (oleananes)، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها (carotenoids) و آلاسایکلیس‌ها (alicyclics) در این گیاه دارویی دارد. همچنین برگ پرسیاوش دارای موسیلاژ (Mucilage)، قند، اسید گالیک (Gallic acid)، تانن (tannin)، اسانس و ماده‌ای تلخ به نام کاپیلارین (Capillarine) است. بسیاری از ترکیبات یاد شده توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش التهاب را دار هستند. در این راستا گزارش شد عصاره پرسیاوش توانایی مهار پر اکسیداسیون چربی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها و همچنین افزایش محتوای گلوتاتیونی تام را دارد. این محققان خاطر نشان کردند پرسیاوش احتمالاً از طریق مهار مستقیم رادیکال‌های آزاد و در نتیجه ارتقای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی سبب این رخدادها می‌شود. TNF-α یکی از سایتوکاین‌های قوی در بروز آپوپتوز مرتبط با گیرنده‌های مرگ سلولی است. در تأیید این فرضیات، مشاهده شد عصاره پرسیاوش توانایی مهار تولید PGE2 ناشی از عملکرد LPS Lipopolysaccharides و همچنین مهار تولید TNF-α و IL-6 در مونوسیت/ماکروفاژ را دارد. گزارش شده که بخش مهمی از این تأثیرات مهاری ناشی از غیر فعال سازی NF-κB است [۲۰]. مطالعات نشان می‌دهد mitogen-activated protein kinases p38 برای نسخه‌برداری NF-κB ناشی از تحریک TNF ضروری است. در همین راستا نتایج گزارش می‌کنند که عصاره پرسیاوش

ممکن است بـه طـور انتخـابی بـر فسفریلاسـیون p38 MAPK اثرگذار باشد و تأثیر مهاری بر آن داشته باشد [۲۰].

نتیجه‌گیری

به عنوان نتیجه‌گیری نهایی از پژوهش حاضر می‌توان عنوان نمود، عصاره پرسیاوش احتمالاً از طریق عناصری چون فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، پروپانوئیدها و سایر عناصر ضدالتهابی خود می‌تواند بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی حبابچه‌های ریوی قرار گرفته در معرض هایپوکسی را تعدیل نماید، که احتمالاً تأثیری قابل ملاحضه در مهار واکنش‌های پروآپوپتوتیک ناشی از هایپوکسی در ریه دارد.

منابع

1. Tews D and Goebel H, Schneider I, Gunkel A, Stennert E and Neiss W. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *Neuropathology and Applied Neurobiol*. 1997; 23 (2): 141-9.

2. Youle RJ and Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9 (1): 47 - 59.

3. Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. American *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011; 183 (2): 152 - 6.

4. Jain M and Sznajder JI. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005; 2 (3): 202 - 5.

5. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 2010; 20 (s2): 24-31.

6. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J and et al. Ethanol extract of Adiantum capillus-veneris L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 147 (3): 603-11.

7. Mehdi YA SM and GholamReza HA. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. *Daneshvar Medicine* 2016; 23 (124): 51-60.

8. Nilforoushzadeh MA, Javanmard SH, Ghanadian M, Asghari G, Jaffary F, Yakhdani AF and et al. The effects of Adiantum capillus-veneris on wound healing: An experimental in vitro evaluation. *International Journal of Preventive Medicine* 2014; 5 (10): 1261.

9. Schneider JP and Ochs M. Stereology of the lung. *Methods in Cell Biol*. 2012; 113: 257-94.

10. Hofman F. Immunohistochemistry. *Current Protocols in Immunol*. 2002; 21: 4. 1- 4. 3.

11. Di Cataldo S, Ficarra E, Acquaviva A and Macii E. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2010; 100 (1): 1-15.

12. Van Cruchten S and Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. Anatomia, histologia, *Embryologia* 2002; 31 (4): 214-23.

13. Quadrilatero J, Alway SE and Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2011; 36 (5): 608-17.

14. Krüger K and Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc. Immunol. Rev*. 2014; 20 (20): 117-34.

15. Kwak H-B, Song W and Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in

Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB J*. 2006; 20 (6): 791-3.

16. Packer N, Pervaiz N and 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.

17. Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Gomulkiewicz A, Kisiela D, Dolinska-Krajewska B, Jethon Z and et al. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors. 2006.

18. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T and Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chem*. 2002; 277 (37): 34287-94.

19. Kumar A. Antioxidant effect of Adiantum capillus veneris Linn. on human lymphocyte: an in vitro study. *Journal of Cell and Tissue Res*. 2009; 9 (2): 1899.

20. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J and et al. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. *Journal of Ethnopharmacol*. 2013; 147 (3): 603-11.

Effect of the Adiantum capillus Veneris Extract on Bax and Bcl2 Apoptotic Markers of Lung Modulation in Trained Rats and Exposed to Hypoxic Stress

Yadegari M (Ph.D.)[1*], Riahy S (Ph.D.)[2], Mirdar Sh (Ph.D.)[3], Hamidian GhR (Ph.D.)[4], Mosadegh zavaragh P (M.A.)[5]

1- Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
2- Researcher of Research Center of Epidemiology Science and Technology, Medical Sciences Army University, Tehran, Iran
3- Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
4- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5- Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
Tel: +98- -938-7677501
Email: mehdi.sport313@yahoo.com

Abstract

Background: Apoptosis is a type of programmed cell death that occurs by a series of Intercellular messages under Specific conditions.

Objective: The aim of present study was investigat role of the Adiantum capillus veneris extract on modulation of Bax and Bcl2 Apoptotic markers of lung in trained rats and exposed to hypoxic stress.

Methods: 14 male Wistar rats were sampels of This study, that were Quite healthy and had no disease history (4 weeks old, 72±9 gr weight) that exposed to hypoxic Environment for 3 weeks after 6 weeks high intensity interval training. Half of the samples were taken 500 ml Adiantum capillus veneris extract Per kilogram of body weight in During exposure to hypoxia environment. Finally, lung tissue was extracted for Immunohistochemical Measurements.

Results: Statistical analysis showed that Adiantum capillus veneris extract Consumption for 3 veeks in samples that exposed to hypoxia, Significantly reduced Bax protein Expression of Pulmonary alveolar ($P \leq 0.05$). also was observed Adiantum capillus veneris extract Consumption for 3 veeks non Significantly increased Bcl2 protein expression ($P > 0.05$) and Significantly reduced Bax /Bcl2 Ratio($P \leq 0.05$).

Conclusion: It seems that Adiantum capillus veneris extract, Could possibly modulat Pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins expression in pulmonary alveolars that exposed to hypoxic Environment that likely has Considerable effects to Inhibition of lung Pro-apoptotic reactions Due hypoxia.

Keywords: Adiantum capillus veneris, Bax ،Bcl2, High intensity interval training, Hypoxia