DOI: 10.22100/jkh.v10i2.672

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

اثر پیش آماده‌سازی تمرین استقامتی بر مرگ سلولی و بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 هیپوکمپ به‌دنبال ایسکمی- جریان مجدد مغزی در موش صحرایی نر

نبی شمسائی[۱]، حمید رجبی[۱]، ناهید ابوطالب*[۲]، فرناز نیکبخت[۲]، پژمان معتمدی[۱]، مهدی خاکساری[۳]، سهیلا عرفانی[۴]

۱- دانشگاه خوارزمی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی.
۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات فیزیولوژی- گروه فیزیولوژی.
۳- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی.
۴- دانشگاه خوارزمی- دانشکده علوم زیستی- گروه فیزیولوژی جانوری.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۲، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۶/۲۹

چکیده

مقدمه: *ایسکمی- جریان مجدد مغزی موجب از دست دادن سلول‌های عصبی آسیب دیده از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده در مناطق خاصی از مغز به‌ویژه هیپوکمپ می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که ورزش آثار حفاظتی بر نورون‌ها دارد و ممکن است آسیب نورونی ناشی از ایسکمی- جریان مجدد در موش‌ها را کاهش دهد. هدف از این مطالعه بررسی پیش‌آماده‌سازی فعالیت ورزشی بر بیان پروتئین‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از القای ایسکمی بود.*

مواد و روش‌ها: *تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۶۰ گرم به‌طور تصادفی به سه گروه هفت تایی تقسیم شدند: گروه کنترل کاذب، گروه ایسکمی و گروه ورزش+ایسکمی. در گروه ایسکمی، حیوانات تحت ایسکمی تنها با استفاده از روش بستن دو شریان کاروتید مشترک قرار گرفتند. در گروه ورزش+ایسکمی، حیوانات قبل از القاء ایسکمی، به‌مدت ۴ هفته روی تردمیل دویدند وگروه کنترل کاذب که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند تحت عمل جراحی مشابه قرار گرفتند با این تفاوت که شریان کاروتید مشترک در آنها مسدود نمی‌شد. چهار روز بعد از ایسکمی سطوح بیان پروتئین‌های کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 با تکنیک رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی تعیین شد.*

نتایج: *تعداد نورون‌های کاسپاز-۳ مثبت در ناحیه CA1 گروه ایسکمی، در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۱$)، ورزش به‌طور قابل توجهی تعداد نورون‌های کاسپاز-۳ مثبت ناشی از ایسکمی- جریان مجدد را در مقایسه با گروه ایسکمی کاهش داد ($P<۰/۰۵$). همچنین، نتایج افزایش قابل توجهی را نسبت Bax/Bcl-2 در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P<۰/۰۱$). به‌علاوه، ورزش قبل از ایسکمی به‌طور قابل توجهی افزایش نسبت Bax/Bcl-2 ناشی از ایسکمی- جریان مجدد را کاهش داد ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داده است ورزش، زمانی که به‌عنوان پیش‌آماده‌سازی استفاده می‌شود، موجب آثار حفاظتی در برابر ایسکمی خواهد شد و ممکن است ورزش پیش استقامتی، یک استراتژی مفید برای کاهش عوارض مغزی ناشی از آسیب ایسکمیک مغزی باشد.*

واژه‌های کلیدی: ورزش، پیش‌آماده‌سازی، هیپوکمپ، ایسکمی، جریان مجدد مغزی.

***نویسنده مسئول:** تهران- دانشگاه علوم پزشکی ایران- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، **تلفن:** ۸۸۶۲۲۷۰۹-۰۲۱، **نمابر:** ۸۸۶۲۲۷۰۹-۰۲۱،
Email: aboutalebn8@gmail.com

ارجاع: شمسائی نبی، رجبی حمید، ابوطالب ناهید، نیکبخت فرناز، معتمدی پژمان، خاکساری مهدی، عرفانی سهیلا. اثر پیش آماده‌سازی تمرین استقامتی بر مرگ سلولی و بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 هیپوکمپ به‌دنبال ایسکمی- جریان مجدد مغزی در موش صحرایی نر. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛۱۰(۲):۲۴-۳۲.

مقدمه

ایسکمی مغزی با کاهش جریان خون به مغز به‌علت انسداد شریان مغزی ایجاد می‌شود (۱). ایسکمی پاتوفیزیولوژی بسیار پیچیده‌ای دارد. به‌خوبی مشخص شده است که ایسکمی مغزی موجب تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های عصبی می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی خواهد شد. به علاوه، برقراری مجدد جریان خون موجب تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و یا رادیکال‌های آزاد خواهد شد که آسیب‌های جریان مجدد را به‌دنبال دارد (۲).

آسیب‌های بافتی به‌دنبال ایسکمی مغزی به‌وسیله تعامل فرآیندهای پیچیده پاتوفیزیولوژیک مانندالتهاب و مرگ برنامه‌ریزی شده ایجاد می‌شوند (۱). مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) پس از ایسکمی–جریان مجدد (IR) مغزی یکی از مسیرهای اصلی است که منجر به فرآیند مرگ سلولی خواهد شد (۳).

مشخص شده است که میتوکندری نقش مهمی را در بسیاری از موارد مرگ برنامه‌ریزی شده ایفا می‌کند (۴). پس از دریافت یک سیگنال مرگ برنامه‌ریزی شده، نفوذپذیری غشای بیرونی میتوکندری افزایش می‌یابد و موجب کاهش پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود، به‌دنبال آن سیتوکروم C از فضای غشاء داخلی میتوکندری به سیتوزول منتقل می‌شود. انتشار سیتوکروم C به سیتوزول منجر به تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم خواهد شد (۵). آپوپتوزوم موجب فعال شدن کاسپاز–۹ و در نهایت کاسپاز–۳ خواهد شد. فعال شدن کاسپاز–۳ موجب قطعه قطعه شدن DNA و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول خواهد شد (۶). مهار کاسپاز–۳ به‌طور قابل توجهی مرگ سلولی ناشی از ایسکمی را کاهش می‌دهد (۷).

پروتئین‌های خانواده Bcl-2، با تنظیم نفوذپذیری غشای میتوکندری، نقش بسیار مهمی را در انتقال سیگنال‌های داخل سلولی مرگ برنامه‌ریزی شده ایفا می‌کنند. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 شامل دو دسته هستند: پروتئین‌های ضد مرگ برنامه‌ریزی شده، مانند Bcl-2 و پروتئین‌های پیش مرگ برنامه‌ریزی شده، مانند Bax (۸). Bcl-2 به غشای خارجی میتوکندری متصل است و می‌تواند انتشار سیتوکروم C به سیتوزول را مهار کند (۹). پروتئین Bax ممکن است مسئول آسیب به غشای خارجی میتوکندری و در نهایت انتشار سیتوکروم C به سیتوزول باشد. همچنین، به خوبی شناخته شده است که Bax به Bcl-2 متصل می‌شود و مانع از ایفای نقش ضد مرگ برنامه‌ریزی شده آن می‌شود (۱۰).

پس از ایسکمی، در بافت‌های آسیب‌پذیر تنظیم کاهشی Bcl-2 و تنظیم افزایشی Bax روی می‌دهد (۱۱). نسبت بین پروتئین‌های پیش مرگ برنامه‌ریزی شده و ضد مرگ برنامه‌ریزی شده، از جمله نسبت Bax/Bcl-2، تعیین‌کننده میزان حساسیت سلول‌ها به سیگنال‌های مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد (۱۲).

مشخص شده است که هیپوکامپ که نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد، از دیگر مناطق مغز نسبت‌به حملات ایسکمیک حساس‌تر است. آسیب به هیپوکامپ باعث فراموشی و کاهش حافظه خواهد شد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ نسبت‌به ایسکمی بسیار حساس هستند و ۷–۳ روز بعد از ایسکمی‌گذرا، می‌میرند (۱۴). همچنین، ایسکمی گلوبال موقت به‌مدت ۱۵ دقیقه موجب آسیب به سلول‌های آسیب‌پذیر، به‌ویژه در ناحیه CA1 هیپوکامپ خواهد شد (۱۵).

مطالعات گذشته آثار مفید پیش آماده‌سازی فعالیت ورزشی بر آسیب مغزی ناشی از ایسکمی – جریان مجدد در مدل حیوانی سکته مغزی را نشان داده‌اند (۱۶ و ۱۷). شواهد نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی از طریق کاهش التهاب، از مغز در برابر آسیب ایسکمیک محافظت می‌کند (۱۸). با این حال، مکانیسم‌های حفاظتی ناشی از ورزش در برابر ایسکمی، به‌ویژه در ارتباط با مرگ سلول‌های عصبی، هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. بنابراین به تحقیقات بیشتر نیاز است تا آثار محافظتی پیش‌آماده‌سازی فعالیت ورزشی روی آسیب مغزی ناشی از ایسکمی مشخص شود.

در مطالعه حاضر، ما تغییرات پروتئین‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده (Bax، Bcl-2 و کاسپاز–۳) را در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی به‌دنبال ایسکمی‌گذرای مغزی با به‌کارگیری روش ایمونوهیستوشیمی بررسی کردیم. به‌علاوه، ما اثر پیش‌آماده‌سازی فعالیت ورزشی بر پروتئین‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده را در ناحیه CA1 پس از ایسکمی‌گذرای مغزی مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (با وزن ۲۶۰–۳۰۰گرم) از انستیتو پاستور تهران خریداری و در قفس‌های استاندارد و محیط کنترل شده (دمای ۲۴c°–۲۲، رطوبت۵۰–۴۵٪ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی)، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به سه گروه (۷ موش در هر گروه) تقسیم شدند: گروه کنترل کاذب (شم)، گروه ایسکمی و گروه ورزش+ایسکمی (ایسکمی با ۴ هفته ورزش قبل از آن) در گروه ایسکمی، حیوانات تحت ایسکمی تنها با استفاده از روش VO2 قرار گرفتند. در گروه ورزش+ایسکمی، حیوانات قبل از القاء ایسکمی، به‌مدت ۴ هفته روی تردمیل دویدند. حیوانات گروه کنترل کاذب که

به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند تحت عمل جراحی مشابه قرار گرفتند با این تفاوت که شریان کاروتید مشترک در آنها مسدود نمی‌شد.

موش‌های صحرایی در گروه مداخله ورزشی به‌مدت ۴ هفته، ۵ روز در هفته بر روی تردمیل (تردمیل ۴ کاناله، ساخت شرکت IITC آمریکا) دویدند. در ابتدا، قبل از تمرینات اصلی و به‌منظور عادت کردن، موش‌ها به‌مدت ۱۵–۱۰ دقیقه با سرعت ۷–۵ متر در دقیقه با شیب صفر درجه برای ۲ روز متوالی روی تردمیل دویدند. ۲ روز پس از تمرینات سازشی، تمرینات اصلی آغاز شد و موش‌ها به‌مدت ۴ هفته به اجرای فعالیت روی تردمیل پرداختند. تمرین در هفته اول با سرعت ۱۸ متر در دقیقه برای ۳۵ دقیقه با شیب صفر در جهبه مدت ۵ روز در هفته اجرا شد. پس از آن، مدت زمان و شیب تردمیل به تدریج افزایش یافت به‌طوری که حیوانات در هفته دوم با سرعت ۱۸ متر در دقیقه با شیب ۵ در جهبه مدت ۴۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۸ متر در دقیقه با شیب ۱۰ درجه به‌مدت ۴۵ دقیقه و در هفته آخر با سرعت ۱۸ متر در دقیقه با شیب ۱۵ درجه به‌مدت ۵۰ دقیقه روی تردمیل دویدند.

برای القای ایسکمی‌گذرای مغزی (۱۹)، موش‌های صحرایی باکتامین/زایلازین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، به‌صورت درون صفاقی) بی‌هوش شدند. سپس هر دو شریان کاروتید مشترک از صفحه کاروتید خود آزاد شدند، پس از آن عصب واگ به دقت از شریان کاروتید جدا شد. سپس هر دو شریان کاروتید مشترک به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره های جراحی مسدود شدند. پس از آن، شریان‌های کاروتید آزاد شد و بلافاصله جریان خون برقرار گردید. چرخه جریان خون با برداشتن گیره ها و برقراری مجدد جریان خون در شریان‌های کاروتید با مشاهده تأیید شد. در طول عمل جراحی، درجه حرارت مقعدی موش‌های صحرایی با استفاده ازیک سیستم گرمایش تنظیم بازخوردی در ۰/۵±۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. حیوانات پس از عمل جراحی با دسترسی آزاد به آب و غذا به قفس خود بازگردانده شدند و به‌طور جداگانه به‌مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) نگه داشته شدند.

۴ روز (۹۶ ساعت) بعد از ایسکمی، موش‌ها بی‌هوش شدند و پرفیوژن ترانس کاردیاک باسالین ۰/۹٪ و به‌دنبال آن محلول پارافرمالدهید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH۴/۷) به‌عنوان فیکساتیو انجام شد (۲۰). سپس مغز موش‌های صحرایی برداشته شد و به‌مدت یک شبانه روز در فیکساتیو مشابه قرار گرفت. سپس از مغزها بلوک‌های پارافینه تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرومتر برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. مقاطع براساس اطلس پاکسینوس بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی‌متر پشت برگما تهیه شد.

روی برش‌های بافتی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام شد (۲۱). به‌طور خلاصه، برش‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰ درجه انکوبه شدند، سپس به کمک الکل، به طور سری با غلظت نزولی آب‌دهی شدند و پس از آن به‌منظور کاهش فعالیت آنزیم درون‌زا، در پراکسید هیدروژن ۱۰٪ در متانول به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس در بافر تریس (pH ۴/۷ ،H2NC (CH2OH)3) شسته شده و آنتی‌ژن‌ها با اتوکلاوو بافر سیترات (pH۶ ،C6H5Na3O7·2H2O) به‌مدت ۱۱ دقیقه بازیابی شد. برش‌ها سپس باآنتی‌بادی اولیه (Biorbyt، UK) برای یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. رقت مطلوب برای آنتی‌بادی اولیه ۱ به ۱۰۰ بود. پس از آن برش‌های بافتی درآنتی‌بادی ثانویه (HRP) (Biorbyt، UK) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول DAB (3,3'diaminobenzidine، سیگما، USA) بر روی برش‌ها اضافه شد. در پایان، برش‌ها با هماتوکسیلین رنگ شدند، در سری‌ها الکل صعودی آب‌گیری شدند، با زایلن شفاف شدند و برای مشاهده با انتالن مونته شدند. تعداد سلول‌های مثبت در امتداد خطی با طول ۴۰۰ میکرومتر (مساحتی حدود ۰/۱۶۰ میلی‌متر مربع) از ناحیه CA1 هیپوکامپ راست موش‌ها شمارش شد.

نتایج به‌دست آمده براساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شدند. به‌منظور بررسی نرمال بودن توزیع از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. هنگامی که تفاوت معنی‌داری وجود داشت، پس آزمون شفه یا دانت تی–۳ برای تعیین اینکه تفاوت در کدام گروه‌ها رخ داده است مورد استفاده قرار گرفت. هنگامی که همگنی واریانس برقرار بود، پس آزمون شفه استفاده شد. در غیر این صورت، از آزمون تعقیبی دانت تی–۳ استفاده شد. سطح معنی‌داری (P≤۰/۰۵) تعیین شد. همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

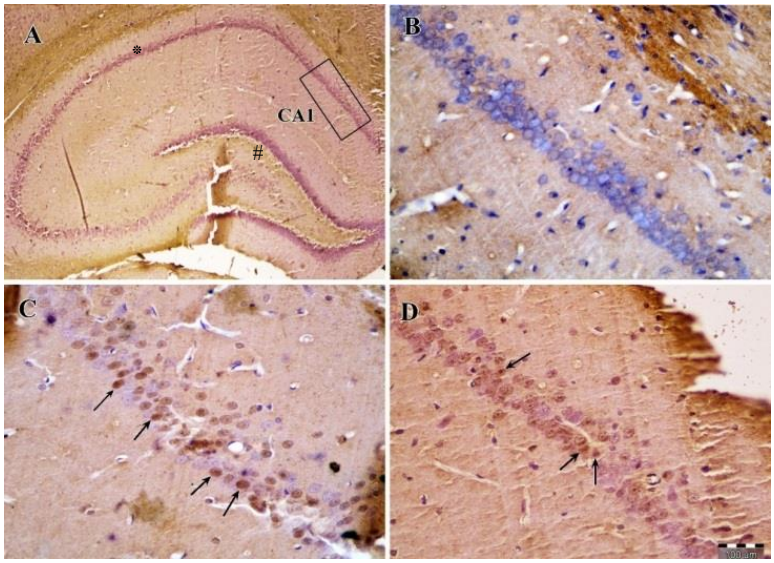
نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که پیش‌آماده‌سازی با ورزش فعال‌سازی کاسپاز–۳ ناشی از ایسکمی–جریان مجدد را کاهش می‌دهد.

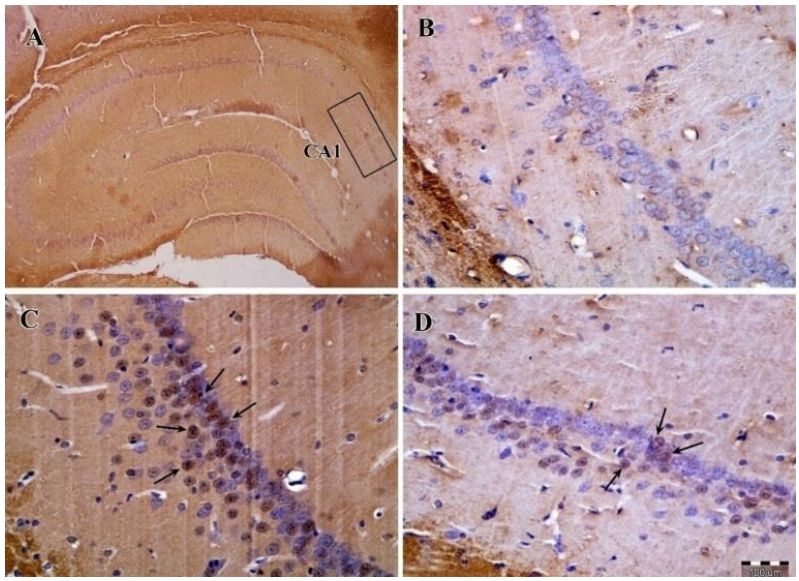
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کاسپاز–۳ نیز نشان داد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ طرف راست موش‌ها، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌های کاسپاز–۳ فعال مثبت در میان گروه‌های مختلف وجود دارد (P<۰/۰۰۱، F=۱۸/۰۴۶). تعداد سلول‌های کاسپاز–۳ فعال مثبت در گروه ایسکمی (۸/۴۷۷±۳۱/۳۳) در مقایسه با گروه شاهد (۰/۸۱۶±۱۰) به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (P<۰/۰۰۱). در موش‌های ایسکمیک پیش‌آماده‌سازی شده با ورزش، تعداد سلول‌های کاسپاز–۳ فعال مثبت در CA1 (۱/۳۴۲±۲۰/۶)

به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از موش‌های ایسکمیک بود (P<۰/۰۵) (شکل ۱ و نمودار ۱).

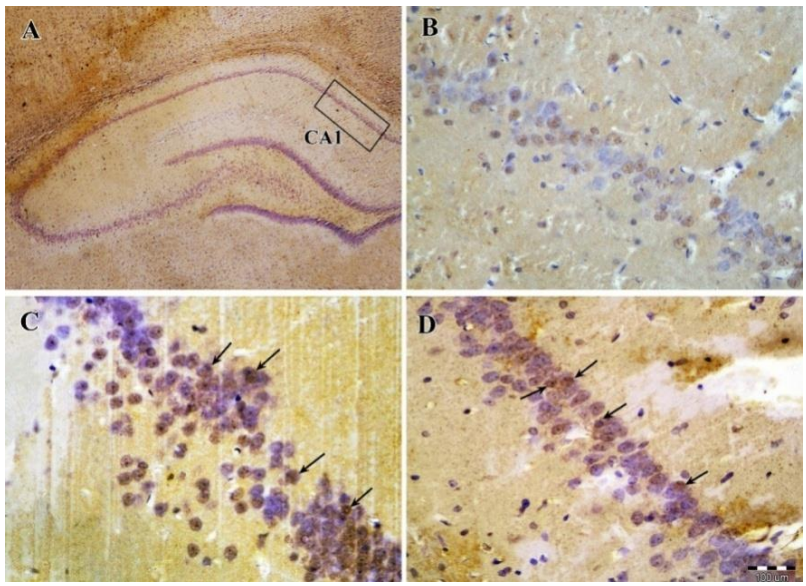
پیش‌آماده‌سازی با ورزش سطح پروتئین Bax پس از ایسکمی را کاهش می‌دهد.



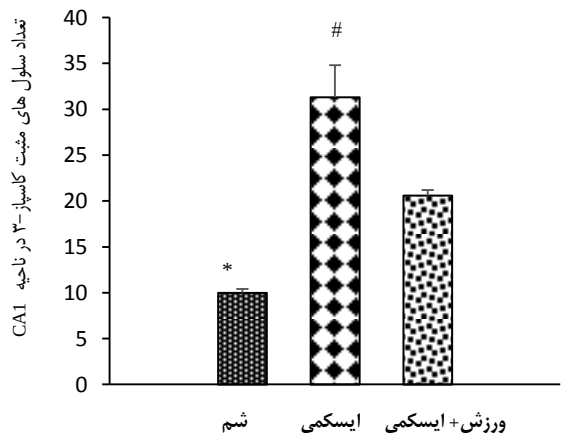
شکل ۱- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کاسپاز-۳ در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی. (A) ناحیه CA1 هیپوکامپ، (B) گروه شم، (C) گروه ایسکمی، (D) گروه ورزش+ایسکمی، (فلش‌های سیاه سلول‌های کاسپاز-۳ فعال مثبت را نشان می‌دهد، بزرگنمایی x٤٠٠).



شکل ۲- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bax در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی. (A) ناحیه CA1 هیپوکامپ، (B) گروه شم، (C) گروه ایسکمی، (D) گروه ورزش+ایسکمی، (فلش‌های سیاه سلول‌های Bax مثبت را نشان می‌دهد، بزرگنمایی x٤٠٠).



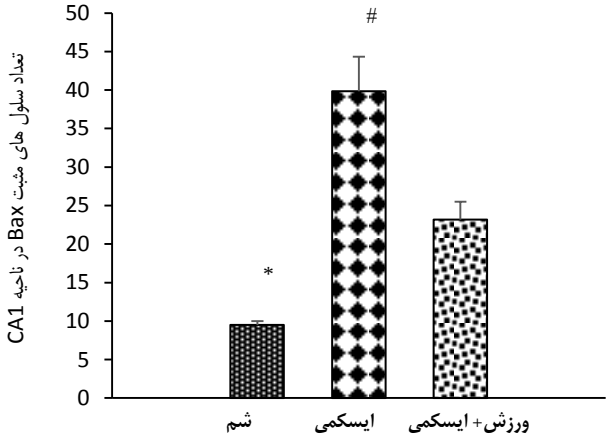
شکل ۳- فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bcl-2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی. (A) ناحیه CA1 هیپوکامپ، (B) گروه شم، (C) گروه ایسکمی، (D) گروه ورزش+ ایسکمی، (فلش‌های سیاه سلول‌های Bcl-2 مثبت را نشان می‌دهد، بزرگنمایی x٤٠٠).



نمودار ۱- مقایسه میانگین سطوح کاسپاز-۳ در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف.

* وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (P<۰/۰۰۱).

وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (P<۰/۰۵) و گروه ایسکمی (P<۰/۰۵).



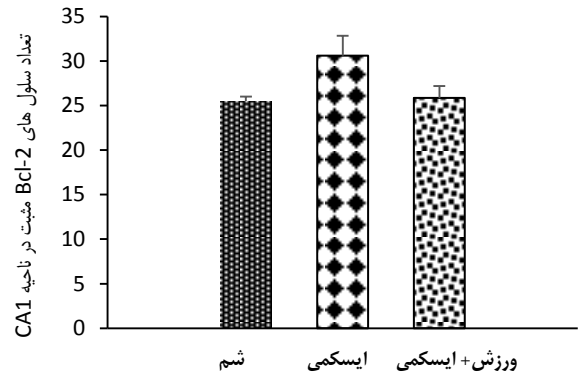
نمودار ۲- مقایسه میانگین سطوح Bax در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف.

* وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (P<۰/۰۱).

وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه ایسکمی (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bax نشان داد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در تعداد سلول‌های Bax مثبت در بین گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد (P<۰/۰۱). پروتئین Bax در گروه شاهد به‌طور ضعیفی بیان شد (۹/۵±۰/۷۰۷)، همچنین، تعداد سلول‌های Bax مثبت در گروه ایسکمی (۱۱/۸۵۲±۳۹/۸۶) به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۱). درموش‌های ایسکمیک پیش‌آماده‌سازی شده با ورزش، تعداد سلول‌های Bax مثبت (۵/۷۰۷±۲۳/۱۷) نسبت‌به گروه ایسکمی کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، (شکل ۲ و نمودار ۲).

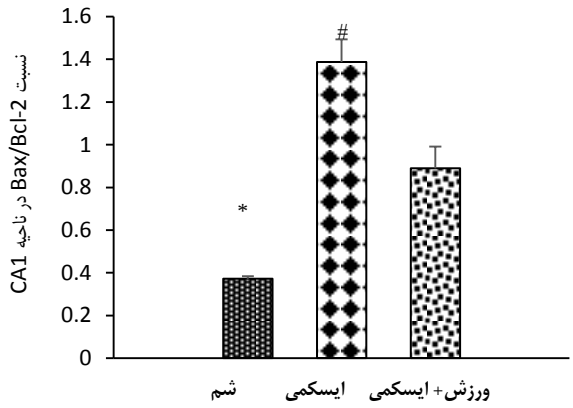
نتایج Bcl-2 با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی، هیچ تفاوت قابل‌توجهی در تعداد سلول‌های Bcl-2 مثبت میان گروه‌ها وجود ندارد (P>۰/۰۵،). سطوح Bcl-2 در گروه ایسکمی (۴/۹۸±۳۰/۶) در مقایسه با گروه شاهد (۵/۲۵±۷۰۷/۰) تفاوت قابل‌توجهی نداشت (P<۰/۰۵)، همچنین سطوح Bcl-2 در گروه ورزش (۳/۵۳۲±۲۵/۸۶) در مقایسه



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطوح Bcl-2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف.

با گروه ایسکمی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵) (شکل۳ و نمودار ۳).

پیش‌آماده‌سازی با ورزش نسبت Bax/Bcl-2 پس از ایسکمی را تعدیل می‌کند.



نمودار ٤- مقایسه نسبت Bax/Bcl-2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف

* وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم (P<۰/۰۰۱).

وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه ایسکمی (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از نسبت Bax/Bcl-2 نشان داد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد (P<۰/۰۰۱). نسبت Bax/Bcl-2 در گروه ایسکمی (۱/۳۸۷±۰/۲۳۹) نسبت‌به گروه شاهد (۰/۳۷۲±۰/۰۱۶) افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). همچنین در موش‌های ایسکمیک پیش‌آماده‌سازی شده با ورزش، نسبت Bax/Bcl-2 (۰/۸۸۹±۰/۲۵۱) نسبت‌به گروه ایسکمی کاهش یافت (P<۰/۰۵) (نمودار ۴).

بحث

برای ارزیابی دیگر آثار حفاظتی پیش درمانی فعالیت ورزشی، در این مطالعه ما تاثیر ورزش قبل از ایسکمی بر روی پروتئین‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی را مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کاسپاز-۳ نشان داد که تعداد سلول‌های کاسپاز-۳ مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ به‌دنبال ایسکمی فراگیر مغزی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. این مسأله نشان می‌دهد که ایسکمی موجب مرگ برنامه‌ریزی شده نورون‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌شود. همچنین پیش‌آماده‌سازی با ورزش به‌طور قابل‌توجهی موجب کاهش فعال‌سازی کاسپاز-۳ ناشی از ایسکمی- جریان مجدد خواهد شد.

نتایج حاصل از نسبت Bax/Bcl-2 نشان می‌دهد که ایسکمی نسبت Bax/Bcl-2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ را افزایش می‌دهد و پیش‌آماده‌سازی با ورزش، افزایش در نسبت Bax/Bcl-2 ناشی از ایسکمی- جریان مجدد در ناحیه CA1 را به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد (با کاهش سطوح Bax، بدون تغییر در سطوح Bcl-2).

یافته‌های ما مطابق با این فرضیه است که تغییرات تنظیمی در نسبت Bax/Bcl-2 با ورزش موجب تنظیم پایین دستی مرگ برنامه‌ریزی شده وابسته به کاسپاز در سلول‌های ناحیه هیپوکامپ ناحیه CA1 بعد از ایسکمی فراگیرگذرا می‌شود. مکانیسم‌های اساسی این عمل هنوز ناشناخته مانده است. مشخص شده است که فعالیت ورزشی از طریق کاهش عوامل خطر موجب حفاظت از نورون‌ها در برابر آسیب ایسکمی- جریان مجدد خواهد شد. همچنین نشان داده شده است که ورزش یک مکانیسم حفاضتی درون‌زا ایجاد می‌کند که موجب زنده ماندن نورون‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از ایسکمی-جریان مجدد خواهد شد (۲۲-۲۴). جیا و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که تمرین روی تردمیل می‌تواند از انشعابات نورون‌های جسم مخطط در برابر آسیب ایسکمیک محافظت کند. آنها پیشنهاد کردند که این اثر حفاظتی از طریق جلوگیری از سمیت سلولی ناشی از NMDA صورت می‌گیرد (۲۵). افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی (Ca^{2+}) با واسطه گیرنده NMDA و متعاقب آن افزایش سطوح Ca^{2+} درون میتوکندری نقش مهمی در دپلاریزاسیون غشای میتوکندری و تنظیم نفوذپذیری آن دارد (۲۶). این مسأله یک گام مهم در روند مرگ برنامه‌ریزی شده است. کینازهای تنظیم شونده با سیگنال خارج سلولی (ERK1/2) در مسیرهای پروتئین کیناز فعال شده بامیتوژن (MAPK) درگیر هستند (۲۷ و ۲۸). مسیرهای تنظیمی ERK1/2 در هدایت سیگنالی و محافظت از سیستم عصبی در برابر آسیب‌های ایسکمی- جریان مجدد

حیاتی هستند. نشان داده شده است که فعال‌سازی این کینازهای تنظیمی می‌تواند موجب ترمیم بافت آسیب‌دیده ناشی از آسیب ایسکمی- جریان مجدد و در نتیجه کاهش مرگ سلولی شود (۲۹ و ۳۰). به علاوه، به‌نظر می‌رسد پیش‌آماده‌سازی با ورزش موجب تنظیم افزایشی ERK1/2 و درنتیجه افزایش میزان تحمل نورون‌ها در شرایط ایسکمی و هیپوکسی خواهد شد (۳۱ و ۳۲).

مکانیسم احتمالی دیگر در زمینه قابلیت حفاظتی فعالیت ورزشی می‌تواند ظرفیت مسدود کردن تشکیل رادیکال‌های آزاد باشد. گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری به‌عنوان یک محصول طبیعی تولید می‌شوند، اما زمانی که سطح آنها بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول باشد می‌توانند منجر به مرگ سلول شوند. استرس اکسیداتیو ناشی از ROS نقش بسیار مهمی در آبشار ایسکمی بازی می‌کند (۳۳ و ۳۴). باتوجه به مطالعات قبلی، شناخته شده است که ورزش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد، همچنین موجب افزایش بیان پروتئین CuZn-SOD در موش‌ها خواهد شد (۳۵ و ۳۶).

عامل نکروز تومور آلفا (TNF-α)، یک سایتوکاین پیش التهابی آسیب‌رسان مهمی است که در سراسر جریان خون وجود دارد و به‌دنبال سکته و آسیب‌های مغزی تنظیم افزایشی می‌شود (۳۷ و ۳۸). با وجود آثار التهابی و مضر آن، شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد عامل نکروز تومور آلفا به‌عنوان یک عامل مفید در ترمیم بافت و محافظت از سلول‌های عصبی عمل می‌کند (۳۹ و ۴۰). به علاوه، پس از یک دوره طولانی پیش‌آماده‌سازی با فعالیت ورزشی، این سایتوکاین ممکن است به‌عنوان یک عامل حفاظتی درون‌زا عمل کند. اعتقاد بر این است که تمرین ورزشی موجب افزایش اندکی در غلظت عامل نکروز تومور آلفاخواهد شد که در نهایت افزایش تحمل سلول‌های عصبی و حفاظت از آنها در مقابل آسیب‌های ناشی از ایسکمی- جریان مجدد را به‌دنبال خواهد داشت. مکانیسم‌های اساسی این تصویر پیچیده از عامل نکروز تومور آلفا هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است، اما تصور می‌شود که بیان گیرنده‌های عامل نکروز تومور آلفاممکن است در این مسأله نقش داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سطوح این عامل ناشی از فعالیت ورزشی موجب کاهش بیان گیرنده عامل نکروز تومور آلفا پس از ایسکمی- جریان مجدد خواهد شد (۴۱).

به‌طور کلی، مطالعه ما نشان داد که تمرین ورزشی قبل از ایسکمی موجب کاهش نسبت Bax/Bcl-2 و کاهش فعال‌سازی کاسپاز-۳ در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ خواهد شد. به‌طور قابل‌توجهی این مطالعه نشان داده است که فعالیت ورزشی، زمانی که به‌عنوان محرک پیش‌آماده‌ساز استفاده می‌شود،آثار محافظتی را در برابر ایسکمی به‌دنبال خواهد شد. این مکانیسم‌های حفاظتی ورزش یک نقطه‌نظر درمانی را فراهم می‌کند و ممکن است یک استراتژی مفید برای کاهش عوارض مغزی ناشی از ایسکمی باشد. اگرچه انجام تحقیقات بیشتری برای بررسی اثر درمانی بالقوه فعالیت ورزشی در مقابل ایسکمی مغزی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (تحت قرارداد شماره ۹۱۰۵۲۱۵۹) انجام گرفت. نویسندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به خاطر حمایت مالی بسیار سپاسگزار هستند.

References

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in Neurosciences 1999;22:391-7.
2. Wang Y, Qin Z-h. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. Apoptosis 2010;15:1382-402.
3. Mattson M, Duan W, Pedersen W, Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. Apoptosis 2001;6:69-81.
4. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. The Journal of Experimental Medicine 1996;183:1533-44.
5. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997;91:479-89.
6. Benchoua A, Guégan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaïo N, Morin D, et al. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. The Journal of Neuroscience 2001;21:7127-34.
7. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. The Journal of Neuroscience 1998;18:4914-28.
8. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular Cell Biology 2008;9:47-59.
9. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997;275:1132-6.
10. Wattenberg B, Lithgow T. Targeting of C-terminal (tail) -anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. Traffic 2001;2:66-71.
11. Antonawich FJ, Krajewski S, Reed JC, Davis JN. Bcl-x1 Bax interaction after transient global ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 1998;18:882-6.
12. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998;281:1322-6.
13. Albasser MM, Amin E, Lin T-CE, Iordanova MD, Aggleton JP. Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. Behavioral Neuroscience 2012;126:659.

14. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Progress in Brain Research 1985;63:39-58.

15. Netto C, Hodges H, Sinden J, Le Peillet E, Kershaw T, Sowinski P, et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. Neuroscience 1993;54:69-92.

16. Chaudhry K, Rogers R, Guo M, Lai Q, Goel G, Liebelt B, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke. Neuroscience Letters 2010;474:109-14.

17. Ding Y-H, Ding Y, Li J, Bessert DA, Rafols JA. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. Neurological Research 2006;28:184-9.

18. Zhang P, Zhang Q, Pu H, Wu Y, Bai Y, Vosler P, et al. Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury. Frontiers in Bioscience (Elite edition) 2011;4:2476-89.

19. Sharifi ZN, Abolhassani F, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, Movassaghi S. Neuroprotective treatment with fk506 reduces hippocampal damage and prevents learning and memory deficits after transient global ischemia in rat. Archives of Neuroscience 2013;1:35-40.

20. Aboutaleb N, Kalalianmoghaddam H, Eftekhari S, Shahbazi A, Abbaspour H, Khaksari M. Apelin-13 inhibits apoptosis of cortical neurons following brain ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2014;20:127-32.

21. Gheibi S, Aboutaleb N, Khaksari M, Kalalian-Moghaddam H, Vakili A, Asadi Y, et al. Hydrogen Sulfide protects the brain against ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia. Journal of Molecular Neuroscience 2014:1-7.

22. Zwagerman N, Plumlee C, Guthikonda M, Ding Y. Toll-like receptor-4 and cytokine cascade in stroke after exercise. Neurological Research 2010;32:123-6.

23. Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, Guo M, Ji X, Peng C, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. Neuroscience 2010;166:1091-100.

24. Zwagerman N, Sprague S, Davis MD, Daniels B, Goel G, Ding Y. Pre-ischemic exercise preserves cerebral blood flow during reperfusion in stroke. Neurological Research 2010;32:523-9.

25. Jia J, Hu Y-S, Wu Y, Liu G, Yu H-X, Zheng Q-P, et al. Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia. Life Sciences 2009;84:505-11.

26. Khaksari M, Aboutaleb N, Nasirinezhad F, Vakili A, Madjd Z. Apelin-13 protects the brain against ischemic reperfusion injury and cerebral edema in a transient model of focal cerebral ischemia. Journal of Molecular Neuroscience 2012;48:201-8.

27. Fiore R, Bayer V, Pelech S, Posada J, Cooper J, Baraban J. p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. Neuroscience 1993;55:463-72.

28. Sharony R, Pintucci G, Saunders PC, Grossi EA, Baumann FG, Galloway AC, et al. Matrix metalloproteinase expression in vein grafts: role of inflammatory mediators and extracellular signal-regulated kinases-1 and-2. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2006;290:H1651-H9.

29. Cavanaugh JE. Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. European Journal of Biochemistry 2004;271:2056-9.

30. Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. European Journal of Biochemistry 2004;271:2050-5.

31. Jones NM, Bergeron M. Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. Journal of Neurochemistry 2004;89:157-67.

32. Shamloo M, Wieloch T. Changes in protein tyrosine phosphorylation in the rat brain after cerebral ischemia in a model of ischemic tolerance. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 1999;19:173-83.

33. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2001;21:2-14.

34. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. Proceedings of the National Academy of Sciences 1990;87:5144.

35. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Experimental Biology and Medicine 1999;222:283-92.

36. Hoffman-Goetz L, Spagnuolo P. Effect of repeated exercise stress on caspase 3, Bcl-2, HSP 70 and CuZn-SOD protein expression in mouse intestinal lymphocytes. Journal of Neuroimmunology 2007;187:94-101.

37. Botchkina GI, Meistrell 3rd M, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. Molecular Medicine 1997;3:765.

38. Sairanen T, Lindsberg P, Brenner M, Carpen O, Sirén A-L. Differential cellular expression of tumor necrosis factor-α and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. Journal of the Neurological Sciences 2001;186:87-99.

39. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. Nature Medicine 1996;2:788-94.

40. Wang R-Y, Yang Y-R, Yu S-M. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. Brain Research 2001;922:140-3.

41. Reyes Jr R, Wu Y, Lai Q, Mrizek M, Berger J, Jimenez DF, et al. Early inflammatory response in rat brain after peripheral thermal injury. Neuroscience Letters 2006;407:11-5.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 2
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v10i2.672

Original Article

Effects of Exercise Pre-Conditioning on Hippocampus Expression of Bcl-2 and Bax Protein and Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion Injury in Male Rats

Nabi Shamsaei (Ph.D.)[1], Hamid Rajabi (Ph.D.)[1], Nahid Aboutaleb (Ph.D.)[2]*, Farnaz Nikbakht (Ph.D.)[2], Pezhman Motamedi (Ph.D.) [1], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[3], Sohaila Erfani (M.Sc.)[4]

1- Dept. of Physical Education & Sports Science, School of Physical Education & Sports Science, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2- Dept. of Physiology, Physiology Research Center, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Dept. of Physiology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
4- Dept. of Animal Physiology, School of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received: 3 September 2014**, Accepted:** 20 September 2014

Abstract:

Introduction*: Cerebral ischemia/reperfusion leads to loss of vulnerable neurons by apoptosis in specific brain regions specially in the hippocampus. There is some evidence indicating that the neuroprotective effects of physical activity on the brain. Therefore,the main purpose of this study was to investigate the effect of exercise pre-conditioning on apoptosis-related proteins expression in hippocampal CA1 neurons after induction of ischemia.*

Methods: *21 Male rats weighing 260-300g were randomly allocated into three groups. Sham operated group, ischemia group and exercise+ischemia group. Ischemia was induced by the occlusion of both common carotid arteries (CCA) for 20 min, The rats in exercise group were trained to run on a treadmill for 4 weeks befor induction of ischemia and in sham operated group common carotid arteries do not occluded. The expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 proteins levels were determined by immunohistochemical staining.*

Results: *The number of caspase-3-positive neurons in the CA1 area were significantly increased in the ischemia group, compared with the sham-operated group. Exercise pre-conditioning significantly reduced the ischemia/reperfusion-induced caspase-3 activation, compared to the ischemia group. Moreover Bax/Bcl-2 ratio in ischemia group, significantly increased in comparision with sham-operated group. However, exercise pre-conditioning significantly attenuated the ischemia/reperfusion-induced increase in Bax/Bcl-2 ratio, as compared with the ischemia group.*

Conclusion: *The results indicated that exercise pre-conditioning has a neuroprotective effects on the brain ischemia. Moreover, exercise pre-conditioning may provide a useful strategy for reducing brain complications caused by hypoxic ischemia brain injury.*

Keywords: Exercise, Preconditioning, Hippocampus, Ischemia, Reperfusion.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** N. Aboutaleb**, Email:** dr.nabotaleb@gmail.com*

Citation: Shamsaei N, Rajabi H, Aboutaleb N, Nikbakht F, Motamedi P, Khaksari M, Erfani S. Effects of exercise pre-conditioning on hippocampus expression of Bcl-2 and bax protein and apoptosis following ischemia/reperfusion injury in male rats. Journal of Knowledge & Health 2015;10(2):24-32.