● مقاله تحقیقی

# بررسی میزان بیان پروتئین‌های HSP70 و HSP90 ریوی در پاسخ به کاهش بار تمرین در شرایط هیپوکسی

* مهدی یادگاری[1]، شادمهر میردار[2]، غلامرضا حمیدیان[3]، حسین برنجیان تبریزی[4]

## چکیده

**مقدمه:** با وجود شناخت کاهش بار تمرین ورزشی به‌عنوان الگویی برای افزایش عملکرد ورزشی در شرایط طبیعی، اطلاعاتی در ارتباط با تأثیر این الگوی تمرینی بر اندام‌های داخلی در شرایط هیپوکسی وجود ندارد. هدف پژوهش حاضر بررسی پاسخ‌دهی پروتئین‌های HSP70 و HSP90 ریوی به کاهش بار تمرین در شرایط هیپوکسی بود.

**روش بررسی:** نمونه‌های پژوهش حاضر شامل ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار (۸ سر کنترل، ۱۶ سر تجربی)، کاملاً سالم و بدون سابقه بیماری (سن ۴ هفته و میانگین وزنی ۹±۷۲ گرم) بود. گروه تجربی پس از شش هفته تمرین تناوبی، به مدت سه هفته در محیط هیپوکسی نگهداری شدند. نیمی از رت‌های تجربی در طی سه هفته قرارگیری در هیپوکسی، به اجرای تمرینات تناوبی با شدت کمتر (تیپر) پرداختند. جهت اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین‌های HSP70 و HSP90، بافت ریه خارج شده و مورد سنجش قرار گرفت. جهت تحلیل داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه استفاده و $p\leq ۰/۰۵$ سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** بیان پروتئین‌های HSP70 و HSP90 در گروه هیپوکسی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p\leq ۰/۰۵$). در گروه هیپوکسی تیپر نیز نسبت به گروه هیپوکسی، بیان پروتئین‌های ذکرشده کاهش معنی‌دار نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$).

**بحث و نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد هیپوکسی سبب تنش بیولوژیکی ریه می‌شود که پاسخ محافظتی ریه از طریق افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی را در پی دارد و احتمالاً اجرای تمرینات تناوبی با شدت کمتر در شرایط هیپوکسی به حفظ هموستاز ریه کمک می‌کند.

**کلمات کلیدی:** هیپوکسی، پروتئین شوک حرارتی، ریه

فصلنامه علمی پژوهشی ابن‌سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال بیست و یکم، شماره اول، بهار ۱۳۹۸، مسلسل ۶۶)

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲۲

۱. دکتری تخصصی، دانشگاه مازندران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، بابلسر، ایران (*مؤلف مسئول)
mehdi.sport313@yahoo.com
۲. استاد، دانشگاه مازندران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، بابلسر، ایران
۳. استادیار، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، تبریز، ایران
۴. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه تربیت بدنی، کازرون، ایران

**مقدمه**

پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs) [1] اولین بار در سال ۱۹۶۲ کشف شده و به‌عنوان مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی که در اثر شوک گرمایی و استرس‌های دیگر ترشح می‌شوند، شناخته می‌گردند. این پروتئین‌ها در هر دو نوع سلول یوکاریوت و پروکاریوت وجود دارند که شاخص محافظتی بالای آنها را نشان می‌دهد [۱]. پروتئین‌های شوک گرمایی همچنین در فرایندهای اساسی سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها به‌عنوان یک سیگنال خطر در پاسخ به تنش اکسایش، عدم تعادل کلسیم، تخلیهٔ گلوکز و گلیکوژن، عناصر سنگین، کاهش pH خون، استرس سرمایی، هایپرترمی، ورزش و فعالیت بدنی، برخی از هورمون‌های استرس نظیر کورتیزول و کاتکولامین‌ها تولید و در وهلهٔ اول نقش حفاظت از سلول را به عهده دارند [۲].

با توجه به عوارض ناشی از قرارگیری طولانی‌مدت در معرض هیپوکسی از جمله اختلال در متابولیسم سلولی، افزایش استرس اکسایشی، تولید رادیکال‌های آزاد مهار نشده و همچنین بیان اینترلوکین‌های پیش التهابی در بافت ریه [۵-۳]، به‌نظر می‌رسد بیان پروتئین‌های محافظتی ریه از جمله HSP70 و HSP90 دستخوش تغییر گردد اما تاکنون اطلاعات قابل استنادی مشاهده نشده است. همچنین کاهش فشار نسبی اکسیژن در دسترس، فعالیت زیستی سلول را به خطر خواهد انداخت [۸-۶]. در سال‌های اخیر گام‌های قابل توجهی در درک محققان از مسیرهای مهم مولکولی التهاب ناشی از هیپوکسی در ریه برداشته شده است. همان‌گونه که در هیپوکسی ناشی از بیماری‌های مزمن دیده شده است، قرارگیری در شرایط هیپوباریک، هیپوکسی مصنوعی و بروز هیپوکسی آلوئولی، توسعه التهاب و اثرات آپوپتوزی ریه را درپی دارد [۹].

پژوهش‌ها نشان می‌دهد تمرینات ورزشی با شدت بالا نیز منجر به اختلال در هموستاز بدن شده و با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است [۱۰، ۱۱]. فیشر [2] و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول را در پی دارد که می‌تواند در بافت ریه منجر به بروز مرگ سلولی شود [۱۲]. همچنین یادگاری و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند یک دوره تمرین تناوبی شدید منجر به بروز التهاب مزمن در ریه و افزایش سطح IL-6 بافتی می‌شود [۵]. در گزارشی دیگر یادگاری و همکاران (۱۳۹۵) تأیید کردند یک دوره تمرین تناوبی شدید منجر به تغییرات تخریبی در ساختار بافتی ریه می‌شود که از نظر پاتولوژیکی حائز اهمیت است [۱۳].

در علوم ورزشی هرگونه کاهش بار تمرین که می‌تواند در حجم یا شدت باشد «تیپر» گفته می‌شود [۱۴]. مطالعات نشان می‌دهد راهبرد تیپر در بهبود عملکرد مؤثر بوده و این بهبود در حدود ۳٪ است [۱۷-۱۵]. از سال ۱۹۸۰ برخی 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 [۱۸، ۱۹]. مطالعات متعددی وجود دارد که بهبود قابل توجهی را در عملکرد ریوی به‌عنوان نتیجه ورزش نشان می‌دهند اما برخی دیگر از مطالعات این موضوع را نقض می‌کنند [۲۰]. مطالعه چمنتی [3] و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند تمرین استقامتی تداومی با شدت متوسط، 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 مژک‌دار [4]، افزایش آپوپتوز و ترمیم فعال راه‌های هوایی کوچک اپیتلیال برونشیال [5] می‌شود [۲۱]. در ادامه میردار و همکاران (۱۳۹۴) اظهار داشتند تیپر به مدت سه هفته عوارض ناشی از ورزش شدید در مجاری تنفسی

1. Heat – shok proteins

2. Fisher
3. Chimenti
4. Ciliated epithelial cells
5. Bronchial epithelium

تحتانی رت‌ها را کاهش می‌دهد [۲۲].

مطالعات نشان می‌دهد کاهش دوره‌ای در شدت تمرین، از جمله راهکارهای کاهش عوارض التهابی-اکسایشی و متابولیسمی تمرین شدید در دوره آمادگی ورزشکار است که احتمالاً از این طریق بر بیان فاکتورهای محافظتی بافت ریه نیز مؤثر باشد [۲۲]. تاکنون تأثیر مثبت کاهش شدت تمرین بر عملکرد ورزشی در شرایط نورموکسی به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است [۱۶]. همچنین در پژوهش‌های محدودی، تأثیر مثبت تیپر در شرایط نورموکسی بر فاکتورهای سلولی و مولکولی [۲۳] تأیید شده ولی اطلاعاتی در ارتباط با تأثیر این الگوی تمرینی در شرایط هیپوکسی بر فاکتورهای محافظتی بافت ریه منتشر نشده است. از این‌رو در پژوهش حاضر نویسندگان به بررسی این موضوع پرداخته‌اند که یک دوره کاهش شدت تمرین در نمونه‌های قرار گرفته در معرض هیپوکسی چه تأثیری بر بیان فاکتورهای محافظتی ریه شامل HSP70 و HSP90 داشته است.

## روش بررسی

نمونه‌های پژوهش تجربی حاضر را ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزنی ۹±۷۲ گرم) تشکیل داده بودند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران انتقال یافته و به‌صورت تصادفی به دو گروه کنترل (۸ سر) و تجربی (۱۶ سر) تقسیم شدند. حیوانات کاملاً سالم و فاقد هیچ‌گونه سابقه بیماری بودند. 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٪ و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند، سپس به‌مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. طی پژوهش، غذای استاندارد پلت (ساخت شرکت به پرور) و آب به‌صورت آزاد در اختیار نمونه‌ها قرار گرفت.

نمونه‌های گروه تجربی پس از مرحله آشناسازی با دویدن روی تردمیل، وارد برنامه تمرین تناوبی شدند. مرحله آشناسازی شامل ۴ روز برنامه تمرین تناوبی با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر بر دقیقه مطابق الگوی برنامه تمرین تناوبی فزاینده اجرا شد. برنامه تمرین تناوبی 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 می‌کشید. تمرین نمونه‌ها به صورت چهار جلسه در هفته مرحله آماده‌سازی و پنج جلسه برنامه اصلی ورزشی انجام شد. برنامه تمرین تناوبی فزاینده با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه (۶۶٪ $VO_2max$) شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه (۱۸۵٪ $VO_2max$) در پایان هفته ششم پایان پذیرفت (جدول ۱). به غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن در نظرگرفته شد [۵]. 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 نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود.

پس از پایان مرحله اول پژوهش (تمرین تناوبی شدید شش هفته‌ای)، مرحله دوم پژوهش که القای هیپوکسی و کاهش بار تمرین بود، اجرا شد. این مرحله، ۳ هفته طول کشید به‌گونه‌ای که ۸ سر از نمونه‌های گروه تمرین پس از ۶ هفته تمرین وارد محیط هیپوکسی شدند (گروه هیپوکسی) و در اتاقک کم فشار[1] در ارتفاع شبیه‌سازی شده معادل ۲۷۵۰ متر (فشار جو: ۵۵۰mmHg :$PO_2$، ۱۱۵/۱۳mmHg :$PCO_2$، ۱mmHg :$PN_2$، ۴۳۴/۷۱mmHg) به مدت ۳ هفته به‌طور شبانه‌روز زندگی کردند و به جز مواقع تمیز کردن و جایگزینی آب و غذا از اتاقک خارج نشدند. تعداد باقی‌مانده گروه تمرین (۸ سر) نیز به همان شکل گروه هیپوکسی در شرایط هیپوکسی زندگی کردند و علاوه بر این در طول این ۳ هفته، برنامه تمرینی خود

1. Hypoxic chamber

جدول ۱-برنامه شش هفته‌ای تمرین تناوبی

| هفته | آشنایی | اول | دوم | سوم | چهارم | پنجم | ششم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| سرعت‌به‌متردردقیقه | ۱۰-۲۵ | ۲۵-۳۵ | ۳۵-۴۵ | ۴۵-۵۵ | ۵۵-۶۵ | ۶۵-۷۰ | ۶۵-۷۰ |
| مدت به دقیقه | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| استراحت‌بین‌تکرارها | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ |
| تعداد تکرار | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ |
| تعداد جلسه درهفته | ۴ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ |

را با شدت کمتر از برنامه انتهای ۶ هفته تمرین (تیپر شدت معادل ۳۰٪) اجرا کردند (گروه هیپوکسی تیپر). در این گروه شدت دویدن از ۷۰ متر در دقیقه به ۵۰ متر در دقیقه رسید و بقیه شرایط اجرای پروتکل تمرین مانند گروه تمرین ۶ هفته بود (جدول ۱). شدت تمرینات با توجه به مقاله مروری هاولی و همکاران (۱۹۹۵) تخمین زده شد [۲۴]. در پایان دوره، نمونه‌ها کشته و بافت ریه چپ آنها جداسازی شد.

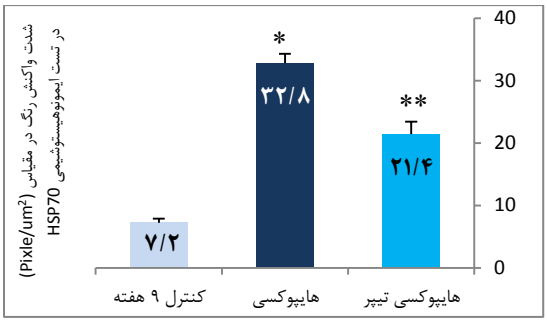
نمونه‌گیری بافتی از ریه رت‌ها، ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره پژوهش انجام شد [۵]. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین[1] (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین[2] (۵-۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد [۲۵]. پس از سپری شدن 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) 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 شد [۲۶].

از هر ریه به‌طور تصادفی پنج برش به ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئین HSP70 و پنج برش دیگر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئین HSP90 انتخاب شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش انویژن[3] و با استفاده از آنتی بادی اختصاصی HSP70 کد ab45133 و HSP90 کد ab59459 ساخت شرکت ابکم[4] انجام شد. به‌طور خلاصه پس از تهیه برش‌های پارافینی و قرار دادن آنها بر روی لام‌های سیالینه شده[5] کدS3003 شرکت داکو[6] طی مراحل پارافین زدایی با گزیلول و آبدهی با غلظت‌های نزولی الکل، مرحله بازیابی آنتی‌ژن[7] با استفاده از بافر تریس-ادتآ[8] و مایکروویو انجام شد. بعد از شستشو و پیش‌تیمار با محلول ۳٪ پراکسید هیدروژنه در متانول و شستشو با محلول بافر فسفات و تعیین محدوده برش با قلم داکو، آنتی‌بادی اولیه به بافت اضافه شد و پس از تیمار با پلیمر نشان‌دار شده با پراکسیداز، سطح برش با محلول کروموژن دی‌آمینو بنزیدین[9] و سوبسترای آن پوشانده شد. بعد از شستشوی کامل و رنگ‌آمیزی افتراقی با هماتوکسیلین، اسلایدها مونته شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند [۲۷]. از هر اسلاید میکروسکوپیک پنج بخش مختلف انتخاب و تصویربرداری صورت گرفت و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش، با نرم افزار ImageJ (نسخه ۱/۴۹) مورد آنالیز قرار گرفته و به‌صورت داده‌های عددی توصیف شدند [۲۸].

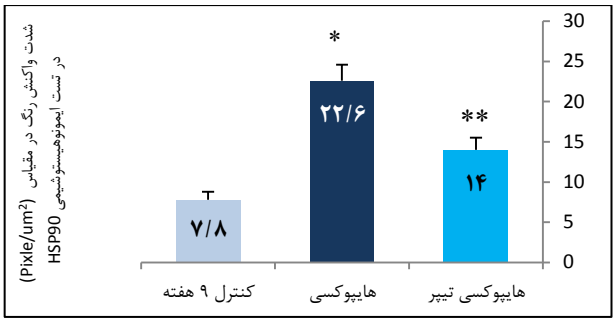
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف معیار گروه‌ها، از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیه محاسبات با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ در سطح معناداری $p\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

1. Ketamine
2. Xylazine

3. Envision
4. ABCAM
5. silanized
6. Dako
7. antigen retrival
8. Tris/EDTA
9. DAB




**نمودار ۱- میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین HSP70 پارانشیم ریوی**
**داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um²) گزارش شده است.**
*** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. ** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه هیپوکسی**

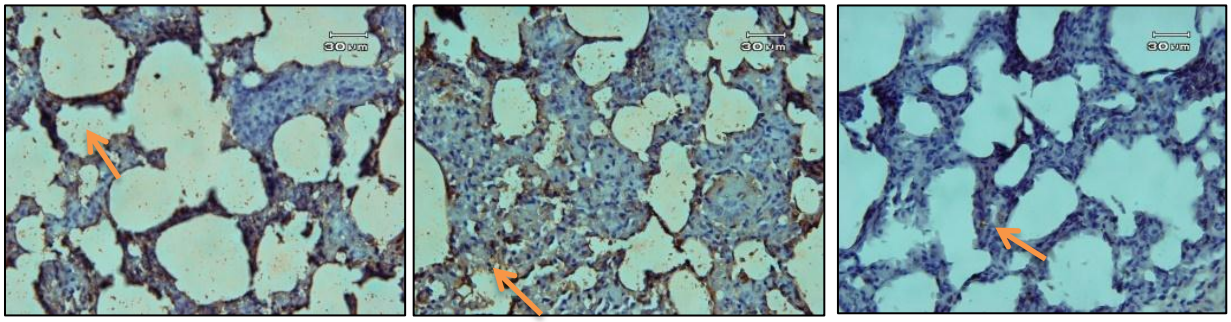



**نمودار ۲. میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین HSP90 پارانشیم ریوی**
**داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um²) گزارش شده است.**
*** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. ** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه هیپوکسی**

## یافته‌ها

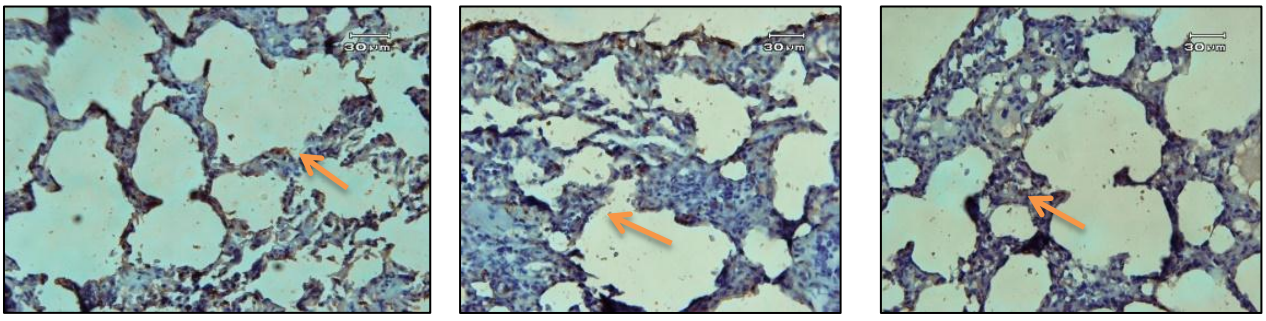
تحلیل آماری نشان داد در گروه هیپوکسی، بیان پروتئین HSP70 پارانشیم ریوی به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (۳۵۵/۵۵٪، p≤۰/۰۵). در گروه هیپوکسی تیپر نسبت به گروه هیپوکسی، بیان پروتئین HSP70 به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (۳۴/۷۵٪، p≤۰/۰۵)، (نمودار ۱ و تصویر ۱). در گروه هیپوکسی نسبت به گروه کنترل، بیان پروتئین HSP90 پارانشیم ریوی به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (۱۸۹٪، p≤۰/۰۵). در گروه هیپوکسی تیپر نسبت به گروه هیپوکسی، بیان پروتئین HSP90 به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (۳۸/۰۵ ٪، p≤۰/۰۵)، (نمودار ۲ و تصویر ۲).

همچنین اندازه اثر در گروه‌ها برای هر یک از متغیرهای HSP70 و HSP90 به روش دی کوهن سنجیده شدند که به ترتیب ۰/۲۸ و ۰/۶۲ محاسبه شد.




کنترل　　هیپوکسی　　هیپوکسی تیپر

**تصویر ۱- میکروگراف از بافت ریه گروه‌های پژوهش: آنتی بادی ثانویه HSP70 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 40× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر (واکنش رنگ قهوه‌ای) نشانه واکنش مثبت برای حضور آنتی‌بادی است.**




کنترل　　هیپوکسی　　هیپوکسی تیپر

**تصویر ۲- میکروگراف از بافت ریه گروه‌های پژوهش: آنتی بادی ثانویه HSP90 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 40× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر (واکنش رنگ قهوه‌ای) نشانه واکنش مثبت برای حضور آنتی‌بادی است.**

## بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نخستین مطالعه‌ای است که به بررسی تأثیر کاهش بار تمرین بر سطوح پروتئین‌های حفاظتی ریه (HSP70 و HSP90) نمونه‌های قرار گرفته در معرض هیپوکسی پرداخته است. یافته‌ها نشان داد سطح پروتئین‌های HSP70 وHSP90 در نمونه‌های گروه هیپوکسی به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. همچنین نتایج مشخص کرد که سه هفته کاهش بار تمرین در هیپوکسی (گروه هیپوکسی تیپر) سطح پروتئین‌های HSP70 و HSP90 را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه هیپوکسی کاهش می‌دهد. اما تاکنون به بررسی تأثیر کاهش بار تمرین بر پروتئین‌های HSP70 وHSP90 بافت ریه نمونه‌های قرار گرفته در معرض هیپوکسی مزمن پرداخته نشده است.

پژوهش‌ها نشان داده‌اند هیپوکسی سبب اختلال در هموستاز سلول شده و احتمال می‌رود با افزایش استرس اکسیداتیو سلولی، واکنش‌های پیش آپوپتوزی را تسریع نماید [۲۹]. استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد استخلاف‌های واکنش‌پذیر اکسیژن[1] در هیپوکسی می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به بافت وارد نماید [۳۰]. بنابراین اگر هیپوکسی مزمن همراه با فعالیت ورزشی شدید باشد و از طرفی فرصت بازسازی و ریکاوری مطلوب به سلول‌ها داده نشود، تولید زیاد رادیکال‌های آزاد، تضعیف دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی، آسیب به چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و قطعه قطعه شدن DNA را در پی دارد. این شرایط که به حضور عوامل التهابی منجر می‌شود و از طرف دیگر سلول با افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی همچون HSP70 و HSP90 احتمالاً در جهت محافظت از خود عمل می‌کند [۳، ۵].

همراستا با نتایج مطالعه حاضر، در پژوهشی بر روی افراد سالمی که به‌صورت داوطلبانه سه شب را در ارتفاع بالای۳۴۰۰ متر سپری کرده بودند، سطوح سرمی IL-6 التهابی افزایش یافت. علاوه براین، در موش‌هایی که در محیط هیپوکسیک قرار گرفتند، نشت عروقی، تجمع سلول‌های التهابی در اندام‌ها و افزایش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی سرمی دیده شده است. تشدید التهاب در واکنش به هیپوکسی یک اختلال بالینی محسوب می‌شود [۳۱]. گزارش شده قرارگیری انسان در معرض هیپوکسی، سبب افزایش ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله IL-1b، IL-6، IL-8 وTNF-α در مایع لاواژ برونش آلوئولی[2] می‌شود [۳، ۳۲]. هیپوکسی موجب بروز اثرات تخریبی–التهابی در ریه می‌گردد. این اثرات در فشار سهمی اکسیژن بالاتری در ریه نسبت به سایر اندام‌ها رخ می‌دهند. به عبارتی می‌توان گفت بافت ریه نسبت به کاهش اکسیژن در دسترس حساس‌تر است [۳۳]. کمبود اکسیژن با اختلال در انتقال یون هیدروژن سبب کاهش پتانسیل استراحت غشاء شده و با کاهش ATP تولیدی موجب فعال شدن پروتئین‌های پیش آپوپتوزی التهابی مثلBax و Bad و IL-17 می‌شود و در نهایت منجر به انتشار سیتوکروم C به داخل سیتوزول و بازآرایی معیوب می‌گردد [۳۴، ۳۵].

محققان گزارش کرده‌اند افزایش سطوح HSP70 و HSP90 نقش مهمی در ترمیم سلولی، بازآرایی بافتی و محافظت از ساختار پروتئینی بافت بر عهده دارد [۳۶]. از طرفی مشخص شده است پروتئین‌های شوک حرارتی به‌طور مستقیم در فعالیت‌های زیستی همچون تسهیل یکپارچگی پروتئین‌های غشاء، انتقال پروتئین‌ها از عرض غشاء سلول، اتصال به پروتئین‌های تخریب شده و کمک به ساخت مجدد پروتئین‌ها[3]، پروتئین‌ها[3]، ترمیم و طراحی کمپلکس‌های پروتئینی، سرعت بخشیدن به حذف پروتئین‌های تخریب شده و تسریع در بهبود سلول‌هایی که در معرض استرس‌هایی نظیر گرما و استرس اکسیداتیو قرار گرفته‌اند، دخالت دارند [۳۷]. در تأیید این

1. ROS

2. bronchoalveolar
3. turnover

گزارشات، نشان داده شده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل و خارج سلولی، کلسیم آزاد داخل سلولی، فعال شدن پروتئازها و فعال شدن کمپلمان در تحریک بیان پروتئین‌های شوک حرارتی مؤثر هستند [۲].

از جمله یافته‌های دیگر پژوهش حاضر، کاهش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی ریه در گروهی بود که حین قرارگیری در محیط هیپوکسی، به اجرای تمرینات تناوبی با شدت کمتر پرداختند. این احتمال وجود دارد که در این گروه به واسطه اجرای تمرین ورزشی از عوارض التهابی-اکسایشی قرارگیری در محیط هیپوکسی کاسته شده باشد و از این رهگذر با کاهش نسبی شرایط استرسی در ریه، بیان پروتئین‌های HSP70 و HSP90 کاهش یافته باشد. در ارتباط با کاهش شرایط اکسایشی در ریه همگام با اجرای تمرین با شدت کم یا تیپر در محیط هیپوکسی، به سازوکارهای مختلفی می‌توان اشاره کرد.

شاید بتوان بخشی از اثرات تعدیل کنندگی تیپر در بیان پروتئین‌های شوک حرارتی را با نقش‌های ضد اکسایشی و ضد التهابی تیپر توجیه کرد. در این راستا، فراهانی و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی تأثیر دو مدت زمان مختلف تیپر بر غلظت پلاسمایی IL-6،IL-1B، TNF-a و عملکرد دوچرخه سواران مرد نخبه پرداختند. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار غلظت سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-1B، IL-6 و TNF-α پس از یک دوره تیپر در ورزشکاران بود [۲۳]. همچنین گلایسون[1] و همکاران (۲۰۱۳) در مقاله 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 [۳۸].

اکثر مطالعاتی که تیپر یک تا سه هفته‌ای را روی پاسخ‌های ایمنی و آندوکرین ورزشکارانِ 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 [۳۸]. در این راستا میردار و همکاران (۱۳۹۴) اثرات دو و سه هفته تیپر متعاقب شش هفته تمرین تناوبی شدید، بر تغییر شکل مجاری تنفسی تحتانی رت‌های صحرایی در حال رشد را بررسی کردند. نتایج نشان داد تیپر سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع بافت پوششی برونشیول و قطر طبقه ادوانتیس نسبت به تمرین اینتروال فزاینده شد که این کاهش در هفته سوم تیپر بیشتر از هفته دوم بود. محققان اظهار داشتند تیپر به مدت سه هفته موجب کاهش عوارض ناشی از ورزش شدید در مجاری تنفسی تحتانی رت‌ها می‌شود [۲۲]. گزارش شده است تمرین با شدت کم و متوسط، بیان سایتوکین‌های $Th_2$ را کاهش می‌دهد. علاوه بر این تمرینات کم شدت قادرند بیان NF-KB و MCP-1 را کاهش و بیان IL-10 را که یک سایتوکین ضد التهابی است، افزایش دهد [۳۹].

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی به نظر می‌رسد در این پژوهش نیز الگوی کاهش بار تمرین توانسته است اختلالات سیستم ایمنی در بیان فاکتورهای پیش التهابی مختلف را متعادل کند و احتمالاً با مهار بیان بیش از حد آنها در شرایط هیپوکسی، به کاهش سازوکارهای جبرانی یعنی کاهش نیاز به پروتئین‌های محافظتی HSP70 و HSP90 کمک کرده باشد [۴۰].

## تشکر و قدردانی

این مطالعه در تاریخ ۱۳۹۶/۱۰/۱۸ با کد اخلاق ۵۹۶۳۹۰ تصویب شده است. بدین وسیله از مساعدت اساتید و کارشناسان محترم دانشگاه‌های مازندران و تبریز تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

1. Gleeson

## References


1. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovascular research. 2001; 51(4):637-646.
2. Asea AAA, Pedersen BK. Heat shock proteins and whole body physiology. Dordrecht, London: Springer science & business media; 2010. ( vol 5).
3. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. The New England journal of medicine. 2011; 364(7):656-665.
4. Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, et al. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. Respiratory research. 2009; 10:1-13.
5. Yadegari M, Riahy S, Mirdar S, Hamidian G, Mosadegh P. Assessment of interleukin-6 level and lung inflammatory cells after high-intensity interval training and stay in hypoxic conditions. Ebnesina. 2016; 18(3):26-36. [Persian]
6. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012; 148(3):399-408.
7. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Molecular cell. 2010; 40(2):294-309.
8. Richalet J-P, Larmignat P, Poitrine E, Letournel M, Canouï-Poitrine F. Physiological risk factors for severe high-altitude illness: a prospective cohort study. American journal of respiratory and critical care medicine. 2012; 185(2):192-198.
9. Gilany K, Vafakhah M. Hypoxia: a review. Journal of paramedical sciences. 2010; 1(2):43-60.
10. 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. Exercise immunology review. 2010; 16:138-162.
11. Dastbarhagh H, Hovanloo F, Agha Alinejad H, Bazgir B. The effect continuous high-intensity interval training in hypoxia-normobaric and normoxi condition on serum cytokines in response to exhaustion exercise. Ebnesina. 2015; 16(4):20-25. [Persian]
12. 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. Histology and histopathology. 2006; 21(5):459-466.
13. Yadegari M, Mirdar S, Hamidian G. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. Daneshvar Medicine Journal. 2016; 23(124):1-11. [Persian]
14. 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):431-434.
15. Le Meur Y, Hausswirth C, Mujika I. Tapering for competition: a review. Science & sports. 2012; 27(2):77-87.
16. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2010; 20 Suppl 2:24-31.
17. Bosquet L, Montpetit J, Arvisais D, Mujika I. Effects of tapering on performance: a meta-analysis. Medicine and science in sports and exercise. 2007; 39(8):1358-1365.
18. Banister EW, Carter JB, Zarkadas PC. Training theory and taper: validation in triathlon athletes. European journal of applied physiology and occupational physiology. 1999; 79(2):182-191.
19. Mujika I, Padilla S. Scientific bases for precompetition tapering strategies. Medicine and science in sports and exercise. 2003; 35(7):1182-1187.
20. Thaman RG, Arora A, Bachhel R. Effect of physical training on pulmonary function tests in border security force trainees of India. Journal of life sciences. 2010; 2(1):11-15.
21. Chimenti L, Morici G, Paternò A, Bonanno A, Siena L, Licciardi A, et al. Endurance training damages small airway epithelium in mice. American journal of respiratory and critical care medicine. 2007; 175(5):442-449.
22. Mirdar S, Arabzadeh, E., Hamidian G. Effects of two and three weeks of tapering on lower respiratory tract in the maturing rat. Koomesh. 2015; 16(3):366-375. [Persian]
23. Farhangimaleki N, Zehsaz F, Tiidus PM. The effect of tapering period on plasma pro-inflammatory cytokine levels and performance in elite male cyclists. Journal of sports science & medicine. 2009; 8(4):600-606.
24. Howley ET, Bassett DR, Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. Medicine and science in sports and exercise. 1995; 27(9):1292-1301.
25. Yadegari M, Riahy S, Mirdar S, Hamidiyan G, Yousefpour M, Riyahi F. Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli following six weeks of high intensity exercise training. Daneshvar Medicine Journal. 2017; 24(129):31-40. [Persian]
26. Yadegari M, Riahy 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. Journal of medicinal plants. 2018; 4(64, S11):162-171. [Persian]
27. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. The journal of clinical investigation. 2000; 106(11):1311-1319.

28. 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.
29. Song Z-C, Zhou W, Shu R, Ni J. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1α pathway. Cell proliferation. 2012; 45(3):239-248.
30. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dynamic medicine. 2009; 8:1-25.
31. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. Respiratory physiology & neurobiology. 2011; 178(3):439-448.
32. Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, et al. An intact canonical NF-κB pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. Journal of immunology. 2011; 186(2):1091-1096.
33. Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, et al. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. Chest. 2009; 136(3):678-687.
34. Dang EV, Barbi J, Yang H-Y, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell. 2011; 146(5):772-784.
35. Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. Cell death and differentiation. 2014; 21(2):196-205.
36. Paulsen G, Vissing K, Kalhovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F, et al. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 2007; 293(2):R844-R853.
37. Nixon B, Bromfield EG, Cui J, De Iuliis GN. Heat Shock Protein A2 (HSPA2): regulatory roles in germ cell development and sperm function. Advances in anatomy, embryology, and cell biology. 2017; 222:67-93.
38. Papacosta E, Gleeson M. Effects of intensified training and taper on immune function. Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. 2013; 27(1):159-176.
39. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte ACS, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, et al. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology. 2008; 295(4):L670-L679.
40. Izquierdo M, Ibañez J, González-Badillo JJ, Ratamess NA, Kraemer WJ, Häkkinen K, et al. Detraining and tapering effects on hormonal responses and strength performance. Journal of strength and conditioning research. 2007; 21(3):768-775.

# Evaluation of the expression levels of pulmonary HSP70 and HSP90 in response to taper in hypoxic conditions

*Yadegari M[1], Mirdar Sh[2], Hamidian Gh[3], Berenjeian Tabrizi H[4]

## Abstract

**Background:** Despite the recognition of reduced workload in exercise as a model to increase exercise performance in normal conditions, there is no information on the effect of this training pattern on internal organs in hypoxic conditions. The purpose of this study was to investigate the response of HSP70 and HSP90 proteins to taper in hypoxia.

**Materials and methods:** The samples were twenty-four healthy male Wistar rats (8 control and 16 experimental rats) with no history of disease (four-weeks old, 72±9 gr weight). The experimental group were participated in an interval training program for six weeks, and then remained in hypoxic conditions for three weeks. Half of the experimental samples performed taper technique during exposure to the hypoxic environment. At the end of experimental period, the lung tissues of all samples were removed and the expression level of HSP70 and HSP90 proteins were evaluated. One-way ANOVA method was used for data analysis and p≤0.05 was considered as significant.

**Results:** The expression levels of HSP70 and HSP90 were significantly increased in the hypoxia group in contrast to the control group (p≤0.05).In the hypoxia-taper group, also, the expression of HSP70 and HSP90 was decreased significantly compared to the hypoxia group (p≤0.05).

**Conclusion:** The results show that hypoxia can causes biological stress in lung tissue, leading to lung protective response by increasing the expression of heat-shock proteins, and performing of interval exercise training with less intense in hypoxic conditions may help to maintain lung hemostasis.

**Keywords: Hypoxia, Heat-Shock Proteins, Lung**

1. PhD, department of sport physiology, faculty of physical education and sport sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran (*Corresponding Author)
mehdi.sport313@yahoo.com

2. Professor, department of sport physiology, Faculty of physical education and sport sciences, university of Mazandaran, Babolsar, Iran

3. Assistant professor, department of basic sciences, faculty of veterinary medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4. Assistant professor, department of physical education, Islamic Azad University-Kazeroon branch, Kazeroon, Iran