Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2021 / Vol 23 / No 3

OPEN ACCESS

Original Paper

Protective Effect of Aerobic Exercise and Adenosine on Changes in Inflammation Mediators after Transient Ischemia of Common Carotid Arteries in Male Wistar Rats

Zahra Eslami [1], Zeinab Mohammadi [2], Shohreh Sharifian (Ph.D)[3]
Masoumeh Rezaei Ghomi (M.Sc)[4], Seyedeh Vafa Mousavi (M.Sc)[4], Mahboubeh Farhadi (M.Sc)[4]
Najmeh Sheikh Robati (M.Sc)[4], Zeinab Faghfoori (Ph.D)[5], Seyed Javad Mirghani (Ph.D)*[6]

1 Ph.D Candidate in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. 2 Ph.D Candidate in Clinical Biochemistry, Metabolic Disorders Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 3 Ph.D in Exercise Physiology, Central Organization of Islamic Azad University, Tehran, Iran. 4 M.Sc in Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 5 Ph.D in Nutrition, Department of Nutrition, Aradan School of Nutrition and Food Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Aradan, Iran. 6 Ph.D in Exercise Physiology, Shahid Mirghani Research Institute, Golestan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Stroke and cerebral ischemia are the second leading causes of death in the world. Currently, there are limited therapeutic interventions for patients with ischemia / reperfusion. This study was performed to determine the protective effect of aerobic exercise and adenosine on changes in inflammation mediators after transient ischemia of common carotid arteries in male Wistar rats.

Methods: In this experimental study, fifty male Wistar rats were randomly allocated into to 5 groups: control, cerebral ischemic control, aerobic exercise + cerebral ischemia, adenosine + cerebral ischemia and aerobic exercise + adenosine + cerebral ischemia. Ischemia was performed by blocking the common carotid artery for 45 minutes after a period of exercise and injection of adenosine. Neuronal structure was examined by Nissel tissue staining. The expression of NGF and Glutamate genes were measured in CA1 region of hippocampal tissue samples.

Results: Cell death was increased in neurons in the CA1 region of the hippocampus in the ischemia / reperfusion group, While a significant reduction in cell death in the adenosine + ischemia / reperfusion and aerobic exercise + ischemia /reperfusion groups was due to adenosine administration and aerobic exercise ($P<0.05$). NGF and glutamate gene expression in the adenosine + ischemia/reperfusion and adenosine + aerobic exersice + ischemia/reperfusion groups significantly increased and reduced compared to the ischemia/reperfusion control, respectively ($P<0.05$).

Conclusion: Co-administration of adenosine combined with aerobic exercise increase the protective effect of aerobic exercise on improving the neuronal damage after ischemic / reperfusion.

Keywords: Ischemia, Aerobic Exercise, Adenosine, Inflammation Mediators

***Corresponding Author:** Seyed Javad Mirghani (Ph.D), E-mail: seyedgavadmirghani@yahoo.com

Received 28 Sep 2020 **Revised** 12 May 2021 **Accepted** 15 May 2021

Cite this article as: Eslami Z, Mohammadi Z, Sharifian Sh, Rezaei Ghomi M, Mousavi SV, Farhadi M, Sheikh Robati N, Faghfoori Z, Mirghani SJ. [Protective Effect of Aerobic Exercise and Adenosine on Changes in Inflammation Mediators after Transient Ischemia of Common Carotid Arteries in Male Wistar Rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021; 23(3): 32-39. [Article in Persian]

Article ID: Vol23-37

© The author(s)

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

پاییز ۱۴۰۰ / دوره ۲۳ / شماره ۳ (پی در پی ۷۹)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

اثر محافظتی تمرین هوازی و آدنوزین بر تغییرات واسطه‌های التهابی پس از ایسکمی گذرا شریان‌های مشترک کاروتید مغز موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

زهرا اسلامی[۱]، زینب محمدی[۲]، دکتر شهره شریفیان[۳]، معصومه رضائی قمی[۴]، سیده وفا موسوی[۴]، محبوبه فرهادی[۴]، نجمه شیخ رباطی[۴]، دکتر زینب فغفوری[۵]، دکتر سیدجواد میرغنی*[۶]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. [۲] دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران. [۳] دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزش، سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۴] کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۵] دکتری تخصصی تغذیه، گروه تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی آرادان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، آرادان، ایران. [۶] دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزش گرایش بیوشیمی و متابولیسم، مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی، گلستان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *سکته مغزی به عنوان یکی از پیامدهای ایسکمی مغزی، دومین علت مرگ و میر در جهان است. با این وجود، مداخلات درمانی محدودی برای بیماران ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی در دسترس است. این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی تمرین هوازی و آدنوزین بر تغییرات واسطه‌های التهابی پس از ایسکمی گذرا شریان‌های مشترک کاروتید مغز موش‌های صحرایی نر انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی در ۵ گروه شامل کنترل، کنترل ایسکمی، ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + آدنوزین، ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + تمرین هوازی و ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + آدنوزین + تمرین هوازی تقسیم شدند. ایسکمی با انسداد شریان کاروتید مشترک پس از یک دوره تمرین هوازی و تزریق ادنوزین به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. بررسی ساختاری نورون‌ها به روش رنگ‌آمیزی بافت نیسل صورت گرفت. مقادیر بیان ژن NGF و Glutamate در ناحیه CA1 نمونه‌های بافت هیپوکمپ از طریق روش RT-qPCR اندازه‌گیری شدند.*

یافته‌ها: *مرگ سلولی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ در گروه ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی افزایش داشت. مرگ سلولی در گروه‌های ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + آدنوزین و ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + تمرین هوازی، کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بیان ژن‌های NGF و Glutamate در گروه ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی + آدنوزین و در گروه ایسکمیِ مغزی با آدنوزین + تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل ایسکمی به ترتیب افزایش و کاهش آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که تجویز همزمان داروی آدنوزین به همراه تمرین هوازی در موش‌های صحرایی منجر به بهبود ترمیم آسیب ناشی از تجمع گلوتامات به دنبال ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی، از طریق افزایش بیان mRNA NGF می‌گردد.*

واژه‌های کلیدی: *ایسکمی ، تمرین هوازی ، آدنوزین ، شاخص های التهابی*

* نویسنده مسؤول: دکتر سیدجواد میرغنی ، پست الکترونیکی seyedgavadmirghani@yahoo.com

نشانی: گرگان، خیابان شهید بهشتی، جنب بهشت ۲۰ ، مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی، تلفن و نمابر -۰۱۷۳۲۱۷۴۸۳۶

وصول مقاله ۱۳۹۹/۷/۷، اصلاح نهایی ۱۴۰۰/۲/۲۲، پذیرش مقاله ۱۴۰۰/۲/۲۵

مقدمه

سکته مغزی، دومین عامل مرگ و میر در جهان است.[۱] مطالعات بالینی و آزمایشگاهی اثرات حفاظتی تمرین بدنی را بر سلامت نورون‌ها نشان داده‌اند.[۲] عامل مهم دیگری که در تعدیل نورون‌ها حین ایسکمی / ریپرفیوژن در برابر اثرات تحریکی سمیت گلوتامات حفاظت می‌کند؛ آدنوزین است.[۳] نواحی اصلی آسیب‌پذیر مغزی طی ایسکمی / ریپرفیون استراتیوم و کورتکس است. این دو ناحیه دارای تعداد بسیار زیادی گیرنده‌های آدنوزینی A1 و A2 است. یکی از عوارض ناشی از ایسکمی کاهش و افزایش گیرنده‌های A1 و A2 به ترتیب و نیز کاهش فرایندهای مهاری ناشی از گیرنده A1 و پیشرفت فرایندهای تحریکی ناشی از گیرنده‌های A2 است.[۴] بنابراین تجویز آدنوزین پس از سکته مغزی می‌تواند آسیب‌های ناشی از آن را بهبود بخشد.[۵] تمرین هوازی در ترمیم آسیب‌های نورون‌ها پس از ایسکمی نقش مهمی دارد. تمرین هوازی به‌واسطه کاهش آپوپتوز و آزاد

شدن گلوتامات، سبب افزایش مقاومت نورون‌ها در برابر ایسکمی می‌شود. همچنین، عوارض ناشی از نبود دسترسی کافی به اکسیژن و گلوکز را در بخش‌هایی از هیپوکمپ بهبود می‌بخشد.[۶] شروع تمرین هوازی ملایم پس از بهبود اولیه از آسیب مغزی، می‌تواند منجر به کاهش گلوتامات خارج سلولی، و افزایش بیان mRNA NGF (Neural Growth Factor)، آدنوزین و متعاقباً افزایش نوروژنز، تقویت شبکه پیام عصبی و بازسازی مجدد پاسخ‌های عصبی به تحریکات شود.[۷] همچنین در سیستم عصبی مرکزی افزایش فاکتورهای NGF و BDNF، نقش حفاظتی مهمی در بهبود فعالیت‌های مغزی پس از حمله ایسکمی دارند.[۴] در مطالعات مدل حیوانی سکته مغزی تجویز NGF به بهبود رشد نورون‌ها و بهبود عملکردی منجر شده است.[۵] این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی تمرین هوازی و آدنوزین بر تغییرات واسطه‌های التهابی پس از ایسکمی گذرا شریان‌های مشترک کاروتید مغز موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم در مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی سمنان (IR.SEMUMS.REC.1397.057) قرار گرفت و پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

موش‌های صحرایی برای ارزیابی اثر همزمانی تمرین هوازی و داروی آدنوزین به طور تصادفی در پنج گروه ده تایی تقسیم‌بندی شدند. همچنین طبق دستورالعمل مدل ایسکمی مغزی القا شد. بازه زمانی مطالعه ۸ هفته در نظر گرفته شد و تغییر بیان NGF و Glutamate به عنوان متغیرهای اصلی مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای القای ایسکمی از روش انسداد شریان کاروتید مشترک استفاده گردید. تمرین هوازی طبق پروتکل مورد نظر اجرا و تزریق داروی آدنوزین براساس هدف آزمایش تجویز شد.

برای بررسی مرگ سلولی رنگ‌آمیزی نیسل به‌کار گرفته شد. تغیرات بیان NGF و Glutamate با استفاده از روش RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ترکیبات کتامین و زایلازین از مؤسسه مرک آلمان تهیه شدند. کیت استخراج RNA و سنتز cDNA (Complementary DNA) به ترتیب از شرکت Kiagene کشور آلمان و Fermentas کشور امریکا، خریداری شدند.

حیوانات: موش‌های صحرایی بر اساس پروتکل استاندارد حفاظت حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفتند. پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۸ تا ۵۵ درصد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. دسترسی آزاد به آب و غذا برای حیوانات فراهم بود.

حیوانات به شرح زیر گروه بندی شدند.

گروه کنترل سالم (n=۸)

گروه کنترل ایسکمی (n=۱۰)

گروه تجربی اول: ایسکمی + تمرین هوازی (n=۱۰)

گروه تجربی دوم: ایسکمی + آدنوزین (n=۱۰)

گروه تجربی سوم: ایسکمی + آدنوزین + تمرین هوازی (n=۱۲)

پروتکل تمرین هوازی: برای آشنایی و تمرین‌پذیری موش‌های صحرایی قبل از شروع جلسات تمرین اصلی، ۳ جلسه تمرین پیش‌آزمون با پروتکل ۱۵-۱۰ دقیقه، سرعت ۱۵ m/min و شیب صفر درجه با دویدن بر روی تردمیل اجرا شد. سپس دوره تمرین اصلی پیش از القاء ایسکمی، با برنامه ۸ هفته‌ای تمرین هوازی روی تردمیل ۱۰ مسیر ویژه حیوانات به مدت ۵ جلسه در هفته انجام شد. برنامه تمرینی با سرعت ۱۸ m/min به مدت ۲۰ دقیقه با شیب صفر درجه در هفته یک آغاز شد. مدت، شدت تمرین و نیز شیب تردمیل به تدریج افزایش یافت. در هفته هشت تمرین، حیوانات به مدت ۵۰ دقیقه با سرعت ۳۰ m/min و شیب ۱۰ درجه، تمرین را به پایان رساندند.[۸]

پروتکل تزریق آدنوزین: داروی تزریقی آدنوزین به مقدار 3mg/mL از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری و به گروه‌های تمرینی در هفته هشتم تمرین (۳ ساعت قبل از تمرین) و همچنین به گروه‌های کنترل به مدت یک هفته با دوز ۰/۱ Mg/ml/Kg به روش داخل صفاقی[۹] و روزانه یک بار تزریق گردید.

القای ایسکمی مغزی گذرا: برای القا ایسکمی مغزی گذرا، حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند.[۱۰] سپس هر دو شریان کاروتید مشترک از غلاف کاروتید آزاد و عصب واگ به دقت از شریان کاروتید جدا شد. پس از ۸ هفته تمرین، گروه‌های ایسکمی + تمرین هوازی، ایسکمی + تمرین هوازی + آدنوزین، ایسکمی + آدنوزین و گروه کنترل + ایسکمی و پس از ۲۴ ساعت استراحت، هر دو شریان کاروتید مشترک به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از گیره‌های جراحی مسدود شدند. در نهایت با برداشتن گیره‌ها شریان‌های کاروتید آزاد و بلافاصله جریان خون برقرار شد. برقراری مجدد جریان خون در شریان‌های کاروتید با مشاهده تأیید شد. در طول عمل جراحی، درجه حرارت مقعدی موش‌های صحرایی با استفاده از سیستم گرمایش معمول ۳±۳۶/۵

درجه سانتی‌گراد حفظ شد. پس از جراحی حیوانات با دسترسی آزاد به آب و غذا به مدت ۴۸ ساعت به طور جداگانه نگهداری شدند.[۱۱]

آماده‌سازی بافت: ۴۸ ساعت پس از القای ایسکمی موش‌های صحرایی توسط مخلوطی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. مغز حیوانات از طریق کرانیوتومی از جمجمه خارج گردید و برای فیکساسیون داخل محلول فرمالین ۱۰درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد.[۱۲] بافت مغز بلافاصله پس از جراحی روی یخ گذاشته شد و با نیتروژن مایع منجمد گردید. از مغزها بلوک‌های پارافینه تهیه شد. مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم به منظور رنگ‌آمیزی برش داده شد. سپس نمونه‌های بافتی تا زمان بررسی بیان ژن در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (نیسل): از رنگ‌آمیزی نیسل برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های طبیعی از نورون‌های نکروتیک در بافت مغز و طناب عصبی استفاده می‌شود. بدین منظور برش‌های ۷میکرومتر (سه برش در هر نمونه حیوانی) روی لام‌های سیلانه انتقال داده شدند. سپس، با استفاده از محلول کرزیل ویوله استات ۰/۱درصد نمونه‌ها رنگ آمیزی شدند. لام‌ها پس از خشک شدن با انتالن پوشانده شدند. با میکروسکوپ نوری مدل AX-70 Olympus و بزرگ‌نمایی 40x از برش‌ها تصویر تهیه شد. شمارش سلولی با نرم افزار Imag j در امتداد خط با طول ۴۰۰ میکرومتر از ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های صحرایی انجام شد. سلول‌های نامنظم و تیره با هسته و هستک نامشخص به عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته و شمارش شدند.

استخراج RNA: ابتدا RNA تام همه گروه‌ها از نمونه‌های بافتی بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. به طور خلاصه، به نمونه‌های بافتی هیپوکمپ λ ۳۰۰-۲۰۰ کیازول اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای لیز سلول‌ها، λ ۱۰۰ کلروفرم، به مدت یک دقیقه به نمونه‌ها افزوده شد. محلول به دست آمده در سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر محلول ایزوپروپانول به نمونه استخراج RNA تام افزوده و به مدت یک دقیقه مخلوط شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و یک میلی لیتر الکل ۷۰ درصد به رسوب اضافه و ورتکس شد. مخلوط به دست آمده مجدد، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا و رسوب باقی مانده خشک شد. λ ۲۰ آب مقطر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای حل کردن RNA تام استخراج شده، بر روی رسوب ریخته شد. نمونه کاملاً مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر روی هیتر قرار گرفت. RNA استخراج شده تا زمان آنالیز در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مراحل سنتز cDNA: طبق پروتکل کیت شرکت سازنده انجام شد. یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌های موردنظر با نرم‌افزار آنلاین پرایمر بلاست طراحی و از نظر ویژگی و اختصاصیت ارزیابی شدند. از RNA تام نمونه‌های بافتی، براساس توالی پرایمرهای NGF، Glutamate، cDNA به روش رونویسی معکوس سنتز شد (جدول یک). بیان ژن‌ها به روش کمی RT-qPCR و تغییرات بیان ژن با فرمول تفاضل تغییرات بیان ژن مورد نظر نسبت به تغییرات بیان ژن خانه‌زاد با مقایسه چرخه آستانه Cycle threshold (CT) ارزیابی شد.[۱۳]

جدول ۱: توالی پرایمرهای Glutamate و NGF

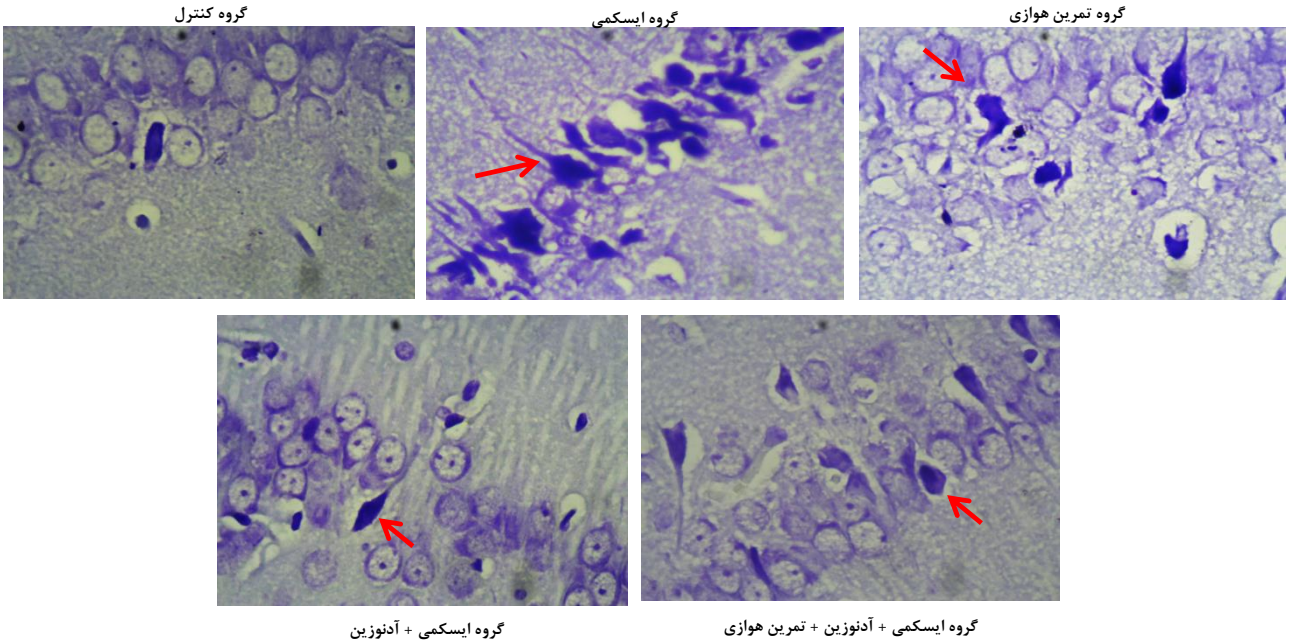
Genes	Primer sequence
Glutamate	For: TCCTCCCTCTCATCATTTCCA Rev: CAGGATGACCCCCATCACA
NGF	For: GCC TGT TTG TCG TCT GTT GT Rev: GCC CCG AAT CCT GTA GAG AG
GAPDH	For: CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C Rev: AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف از استاندارد گزارش شد. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapirowilk و برای بررسی فرضیه همگنی واریانس‌ها از آزمون لون و پس از مشاهده عدم معنی‌داری به منظور مقایسه معنی‌داری تفاوت گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه استفاده شد. متعاقب تایید تفاوت معنی‌داری میان گروه‌ها، از آزمون تعقیبی Bonferoni برای مقایسه میانگین استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

آماده سازی اولیه با تمرین هوازی سبب کاهش مرگ سلولی ناشی از ایسکمی / ریپرفیوژن در ناحیه CA1 هیپوکمپ شد. در رنگ‌آمیزی به روش نیسل سلول‌های عصبی آسیب‌دیده از ایسکمی / ریپرفیوژن در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های صحرایی به شکل نامنظم، تیره با هسته و هستک نامشخص مشاهده شد (شکل یک).

ایسکمی گذرای مغزی سبب مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در نورون‌های ناحیه هیپوکمپ شد. میزان مرگ سلولی در گروه کنترل ایسکمی (۹۳ درصد تعداد سلول‌های نکروز شده) در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی‌دار افزایش یافت (P<۰/۰۵). تعداد نورون‌های آپوپتوتیک در سه گروه تجربی اول، دوم و سوم نسبت به گروه کنترل ایسکمی کاهش آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) (نمودار یک).

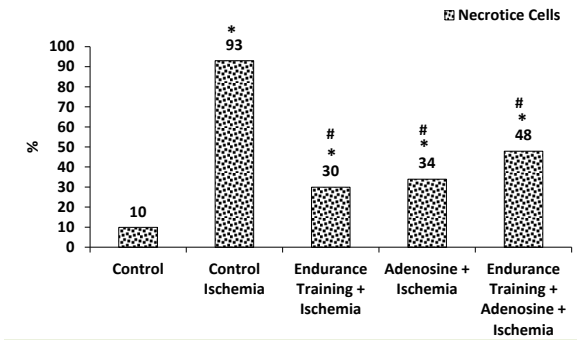


شکل ۱: رنگ‌آمیزی نیسل ناحیه CA1 هیپوکمپ (بزرگ نمایی 40X) فلش قرمز رنگ: سلول های مرده

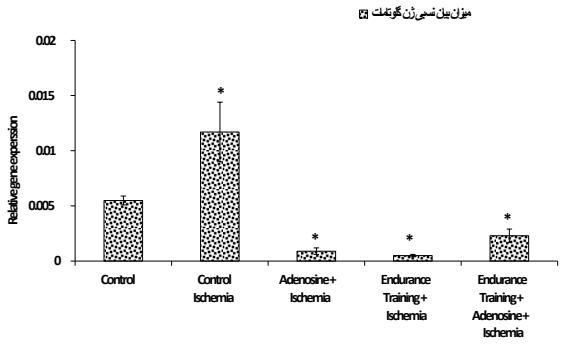
جدول ۲ : نتایج آزمون تقیبی بونفرونی در گروه‌های مورد مطالعه

متغیرها	گروه‌ها	کنترل ایسکمی	ایسکمی + آدنوزین	ایسکمی + تمرین هوازی	ایسکمی + آدنوزین + تمرین هوازی
گلوتامات	کنترل	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *
	کنترل ایسکمی	–	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *
	ایسکمی + آدنوزین	–	–	–	<۰/۰۰۱ *
	ایسکمی + تمرین هوازی	–	–	–	<۰/۰۰۱ *
NGF	کنترل	–	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *
	کنترل ایسکمی	–	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۳۰ **
	ایسکمی + آدنوزین	–	–	<۰/۰۰۱ *	<۰/۰۰۱ *
	ایسکمی + تمرین هوازی	–	–	–	<۰/۰۰۱ *

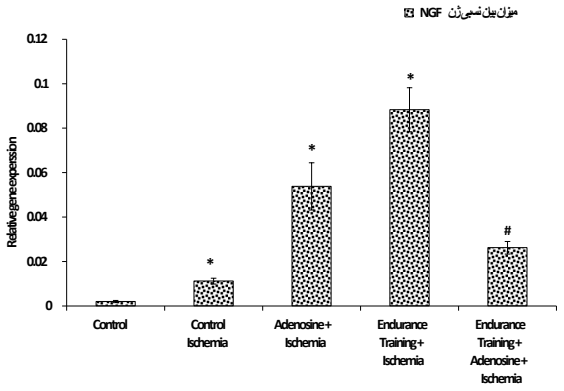
* تفاوت معنی دار در کمتر از ۰/۰۰۱، ** تفاوت معنی دار در کمتر از ۰/۰۵



نمودار ۱ : مقایسه میانگین مرگ سلولی نکروتیک در ناحیه CA1 هیپوکمپ در گروه‌های مورد مطالعه (* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم، # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی)



نمودار ۲ : میزان بیان نسبی ژن گلوتامات در مرحله پیش آماده‌سازی با تمرین هوازی پس از القای ایسکمی در گروه‌های مورد مطالعه (* P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی)



نمودار ۳ : میزان بیان نسبی ژن NGF در مرحله پیش آماده‌سازی با تمرین هوازی پس از القای ایسکمی در گروه‌های مورد مطالعه (* P<۰/۰۱ و # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی)

بیان نسبی ژن گلوتامات در سه گروه تجربی اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی به ترتیب ۱۹≥ ، ۱۲ و ۴≥ بودند (P<۰/۰۵) (نمودار ۲، جدول ۲). با این حال، بیان نسبی ژن گلوتامات در گروه تجربی سوم نسبت به گروه‌های تجربی اول و دوم افزایش ۱/۵ برابری داشت.

بیان نسبی ژن NGF در گروه‌های تجربی اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی به ترتیب بیش از ۷ برابر، ۴ برابر و ۲ برابر افزایش آماری معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) (نمودار۳، جدول ۲). با این حال، بیان نسبی ژن NGF در گروه تجربی سوم نسبت به گروه تجربی دوم بیشتر افزایش داشت.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، پس از ایجاد ایسکمی / ریپرفیوژن به مدت ۴۵ دقیقه، ۹۳ درصد سلول‌های عصبی دچار مرگ سلولی شدند. میزان مرگ سلولی در گروه ایسکمی با تیمار آدنوزین+تمرین هوازی، گروه ایسکمی تیمار با آدنوزین در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی کاهش آماری معنی‌داری نشان داد. در مطالعه Zhao و همکاران تجویز آدنوزین در سگ‌های گروه ایسکمی / ریپرفیوژن در مقایسه با گروه کنترل، از طریق تغییر پروتئین‌های پیش آپوپتوزی Bax و آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 سبب کاهش معنی‌دار میزان آپوپتوز در سلول‌های عصبی گردید.[۱۴] جوزائی و همکاران نتیجه‌گیری کردند که تجویز داروی آدنوزین به موش‌های صحرایی با ایسکمی / ریپرفیوژن از طریق مهار اثر استرس اکسیداتیو و دخالت در کاهش بیان گیرنده آدنوزینی A1 می‌تواند به کاهش آپوپتوز در سلول‌های مغزی منجر شود.[۱۵] هرچند مکانیسم اثر NGF همچنان ناشناخته است؛ اما مطالعه Zhang و همکاران نشان داد تیمار با NGF سبب افزایش معنی‌دار بیان mRNA CREB و پروتئین آن در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های ویستار گروه ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل شده است.[۱۶] نتایج مطالعه حاضر نیز با توجه به یافته‌های گذشته[۱۷] اثر آدنوزین بر افزایش بیان mRNA NGF و کاهش آپوپتوز سلول‌های نورونی را در گروه ایسکمی+آدنوزین معنی‌دار نشان داد. از سوی دیگر داروی آدنوزین از طریق مهار کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ و به دنبال آن، کاهش غلظت کلسیم درون سلول‌های گلیا عملکرد آنزیم نیتریک اکسید سنتاز نورونی را کاهش می‌دهد. نیتروکسید و کلسیم برای خروج گلوتامات به فضای سیناپسی ضروری است. بنابراین تجویز آدنوزین در گروه ایسکمی+آدنوزین از طریق مهار فعالیت آنزیم نیتروکسید سنتاز و کاهش کلسیم درون سلولی از آزاد شدن گلوتامات و متعاقباً اثرات سیتوتوکسیسیته آن بر سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند.[۱۸]

در مطالعه انجام شده Gao و همکاران بر روی نمونه‌های مغزی ایسکمی، نتیجه‌گیری شد که احتمالاً تمرین هوازی از طریق مهار اثرات سیتوتوکسیسیته افزایش گلوتامات خارج سلولی در بهبود و حفظ نورون‌ها پس از آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن موثر است.[۱۹] Zhang و همکاران در مدل موشی ایسکمی با تمرین تردمیل در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند که تمرین هوازی پیش از ایسکمی می‌تواند سبب کاهش آزاد شدن گلوتامات شود.[۲] همچنین Feng و همکاران نشان دادند در موش‌هایی که پیش از القای ایسکمی تحت تاثیر تمرین بدنی با استفاده از تردمیل قرار گرفته بودند؛ برداشت گلوتامات از فضای سیناپسی افزایش یافته است.[۲۰] نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر در گروه ایسکمی توام با تمرین در مقایسه با گروه ایسکمی با نتایج دیگر مطالعات[۲۱و۲۲] مطابقت داشته و کاهش بیان معنی‌دار بوده است.

فعالیت بدنی به عنوان محرک ملایم می‌تواند از طریق افزایش خونرسانی، افزایش القای بیان نوروتروفین‌ها، حفاظت از عروق سیستم عصبی، کاهش التهاب مغزی، نوروژنز و مهار آپوپتوز نورون‌ها، از اثرات مخرب پس از ایسکمی / ریپرفیوژن پیشگیری نماید.[۲۳] از سوی دیگر فعالیت بدنی می‌تواند سبب افزایش بیان فاکتورهای حفاظت کننده نورونی از قبیل NGF شود. مطالعات Ding و همکاران نشان داد که تمرین بدنی منظم در هفته سبب افزایش بیان ژن NGF شده و می‌تواند منجر به افزایش پتانسیل تحمل نورون‌ها در برابر آسیب ناشی از ایسکمی شود.[۲۴و۲۵] مطالعه Mizutani و همکاران که بر روی نمونه‌های مغز موش‌های ایسکمی انجام شد؛ نشان داد که فعالیت بدنی باعث افزایش فاکتور رشد عصبی گشته که سبب شده تا نورون‌ها قادر به دریافت مواد غذایی، برقراری ارتباط سیناپسی و تنظیم مجدد نورونی شوند.[۲۶] از این رو، یافته‌های به دست آمده از مطالعه حاضر در گروه ایسکمی+تمرین هوازی در مقایسه با گروه ایسکمی که افزایش معنی‌دار بیان ژنی NGF را نشان داد؛ با مطالعات پیشین[۲۵و۲۷] مطابقت دارد.

با این که نتایج حاصل از همزمانی اثر داروی آدنوزین و تمرین هوازی کاهش کمتری نسبت به تجویز هر یک به تنهایی در موش‌های ویستار ایسکمی داشت؛ اما همزمانی هر دو نیز به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌دار گلوتامات و NGF را نشان داد.

تمرین هوازی سبب مهار مسیرهای پیام رسانی مرگ سلولی و مهار آپوپتوز سلول‌های عصبی در مدل موشی ایسکمی / ریپرفیوژن در مطالعه ابوطالب و همکاران شد.[۸] به علاوه، نتایج مطالعه Zhang و همکاران با مداخله اولیه ورزش هوازی در آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن در موش‌ها، مهار مرگ سلول‌های عصبی را نشان داد.[۲۸] از سوی دیگر، مطالعه Terashi و همکاران نشان داد که تمرین هوازی منظم از طریق کاهش پروتئین پیس آپوپتوزی Bax و افزایش پروتئین مهارکننده آپوپتوز Bcl-2 به طور معنی‌دار از مرگ سلولی نورون‌ها پس از ایسکمی / ریپرفیوژن حفاظت می‌کند.[۲۹] علاوه بر این، در مطالعه جوزائی و همکاران در آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن موش‌ها، با تزریق آدنوزین میزان استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از ایسکمی / ریپرفیوژن کاهش یافت که احتمالاً در نتیجه کاهش فاکتورهای التهابی میزان مرگ سلولی نورون‌ها نیز کاهش یافت.[۱۶] یافته‌های رنگ‌آمیزی نیسل ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های صحرایی با آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن در مطالعه حاضر، از اثر حفاظتی همزمان تمرین هوازی و تجویز داروی آدنوزین بر نورون‌ها حمایت می‌نماید. با این حال، تایید نتایج حاصله، نیازمند تحقیقات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین هوازی پیش از وقوع ایسکمی / ریپرفیوژن می‌تواند در بهبود رشد نورون‌ها و کاهش آپوپتوز از طریق افزایش و کاهش بیان ژن NGF و گلوتامات موثر باشند. بنابراین تجویز همزمان تمرین هوازی و داروی آدنوزین می‌تواند رویکرد نوینی در بهبود سلامت و رشد نورون‌ها پس از آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی (کد A-10377-2 مورخ ۱۳۹۶/۳/۲۱) دانشگاه علوم پزشکی سمنان بود. بدین‌وسیله از همکاران مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهیدمیرغنی و کلیه عزیزانی که در روند اجرای این مطالعه ما را یاری رساندند؛ صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References

1. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, et al. Ischaemic stroke. Nat Rev Dis Primers. 2019 Oct; 5(1): 70. DOI: 10.1038/s41572-019-0118-8

2. Zhang F, Jia J, Wu Y, Hu Y, Wang Y. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia. Int J Mol Sci. 2010 Jul; 11(7): 2658-69. DOI: 10.3390/ijms11072658

3. Ganesana M, Venton BJ. Early changes in transient adenosine during cerebral ischemia and reperfusion injury. PLoS One. 2018 May; 13(5): e0196932. DOI: 10.1371/journal.pone.0196932

4. Gomes C, Ferreira R, George J, Sanches R, Rodrigues DI, Gonçalves N, et al. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. J Neuroinflammation. 2013 Jan; 10: 16. DOI: 10.1186/1742-2094-10-16

5. Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. Int J Mol Sci. 2017 Mar; 18(3): 548. DOI: 10.3390/ijms18030548

6. Gonçalves Mourão FA, Leite HR, de Carvalho LED, Vieira TH FE, Pinto MCX, de Castro Medeiros D, et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. J Neurochem. 2014 Oct; 131(1): 65-73. DOI: 10.1111/jnc.12786

7. Cobianchi S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, Navarro X. Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. Curr Neuropharmacol. 2017; 15(4): 495-518. DOI: 10.2174/1570159X14666160330105132

8. Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, Khaksari M, Erfani S, Nikbakht F, et al. Protection of Hippocampal CA1 Neurons Against Ischemia/Reperfusion Injury by Exercise Preconditioning via Modulation of Bax/Bcl-2 Ratio and Prevention of Caspase-3 Activation. Basic Clin Neurosci. 2016 Jan; 7(1): 21-9.

9. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr. 2000 Apr; 130(4S Suppl): 1007S-15S. DOI: 10.1093/jn/130.4.1007S

10. Rabiei Z, Bigdeli M, Mohagheghi F, Rasolian B. Relationship between dietary virgin Olive oil on brain Cholesterol, Cholesteryl ester and Triglyceride levels and Blood Brain Barrier (BBB) permeability in a rat stroke model. Physiol Pharmacol. 2012; 16(3): 245-54.

11. Erfani S, Khaksari M, Oryan S, Shamsaei N, Aboutaleb N, Nikbakht F. Nampt/PBEF/visfatin exerts neuroprotective effects against ischemia/reperfusion injury via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. J Mol Neurosci. 2015 May; 56(1): 237-43. DOI: 10.1007/s12031-014-0486-1

12. Faghani M, Jafari Z, Molladost H, Nadia Sharifi Z. [Effects of verapamil on CA1 pyramidal cells of hippocampus following ischemia reperfusion in rats]. Med Sci J Islam Azad Univ Tehran Med Branch. 2015; 25(1): 33-38. [Article in Persian]

13. Mirghani SJ, Peeri M, Yaghoobpour Yekani O, Zamani M, Feizolahi F, Nikbin S, et al. Role or Synergistic Interaction of Adenosine and Vitamin D3 Alongside High-Intensity Interval Training and Isocaloric Moderate Intensity Training on Metabolic Parameters: Protocol for an Experimental Study. JMIR Res Protoc. 2019 Jan; 8(1): e10753. DOI: 10.2196/10753

14. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. J Mol Cell Cardiol. 2001 Jan; 33(1): 57-68. DOI: 10.1006/jmcc.2000.1275

15. Jozaie A, Movahedi M, Khosravi M, Golab F. [The effects of

adenosine injection after of brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF-kB/p65 and activity level of ROS in male Wistar rats]. Razi j Med Sci. 2019; 26(2): 74-84. [Article in Persian]

16. Zhang ZH, Xi GM, Li WC, Ling HY, Qu P, Fang XB. Cyclic-AMP response element binding protein and tau are involved in the neuroprotective mechanisms of nerve growth factor during focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. J Clin Neurosci. 2010 Mar; 17(3): 353-56. DOI: 10.1016/j.jocn.2009.07.086

17. Muroi Y, Ishii T, Teramoto K, Hori M, Nishimura M. Calcineurin contributes to the enhancing effect of adenosine on nerve growth factor-induced neurite outgrowth via the decreased duration of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. J Pharmacol Sci. 2004 May; 95(1): 124-31. DOI: 10.1254/jphs.95.124

18. Liu YJ, Chen J, Li X, Zhou X, Hu YM, Chu SF, et al. Research progress on adenosine in central nervous system diseases. CNS Neurosci Ther. 2019 Sep; 25(9): 899-910. DOI: 10.1111/cns.13190

19. Gao X, Xu X, Pang J, Zhang C, Ding JM, Peng X, et al. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Physiol Res. 2007; 56(5): 559-69. DOI: 10.33549/physiolres.931053

20. Feng R, Zhang M, Wang X, Li WB, Ren SQ, Zhang F. Pre-ischemic exercise alleviates oxidative damage following ischemic stroke in rats. Exp Ther Med. 2014 Oct; 8(4): 1325-29. DOI: 10.3892/etm.2014.1874

21. Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. Neuroscience. 2011 Mar; 177: 170-76. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.01.018

22. Jia J, Hu YS, Wu Y, Yu HX, Liu G, Zhu DN, et al. Treadmill pre-training suppresses the release of glutamate resulting from cerebral ischemia in rats. Exp Brain Res. 2010 Jul; 204(2): 173-79. DOI: 10.1007/s00221-010-2320-5

23. Rashedul Islam M, Young MF, Wrann CD. Neuroprotective potential of exercise preconditioning in stroke. Cond Med. 2017; 1(1): 27-34.

24. Ding YH, Luan XD, Li J, Rafols JA, Guthinkonda M, Diaz FG, Ding Y. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. Curr Neurovasc Res. 2004 Dec; 1(5): 411-20. DOI: 10.2174/1567202043361875

25. Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. Neuroscience. 2004; 124(3): 583-91. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.029

26. Mizutani K, Sonoda S, Yamada K, Beppu H, Shimpo K. Alteration of protein expression profile following voluntary exercise in the perilesional cortex of rats with focal cerebral infarction. Brain Res. 2011 Oct; 1416: 61-68. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.08.012

27. Samadi A. [Exercise Preconditioning and Neuroprotection: A Review of Mechanisms]. Shefaye Khatam. 2015; 3(1): 115-30. DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.1.115 [Article in Persian]

28. Zhang Y, Cao RY, Jia X, Li Q, Qiao L, Yan G, et al. Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016 Dec; 12: 3161-73. DOI: 10.2147/NDT.S121779

29. Terashi T, Otsuka S, Takada S, Nakanishi K, Ueda K, Sumizono M. Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats. Neurol Res. 2019 Jun; 41(6): 510-18. DOI: 10.1080/01616412.2019.1580458