

تغییرات مورفولوژیک بافت ریه در پی دریافت نانوذره نقره تولید شده با روش سنتز زیستی در موش‌های صحرایی نر ویستار تمرین کرده

فاطمه پورمند^۱، M.Sc.، سیدجواد ضیا الحق^{۲*}، Ph.D.، سحر ملزومی^۳، M.Sc.

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۲- گروه پزشکی، مرکز تحقیقات نانوذرات بیولوژیک در پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۳- گروه پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Javadzia@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۲

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی میزان آسیب بافت ریه موش‌های صحرایی تمرین کرده، ناشی از دریافت دوز بالای نانوذره بیولوژیک نقره است.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش صحرایی نر در ۶ گروه کنترل سالم، نانونقره، تمرین هوازی، تمرین بی‌هوازی، نانونقره + تمرین هوازی، نانونقره + تمرین بی‌هوازی به صورت تصادفی ساده تقسیم شدند. ابتدا گروه‌های تمرین به مدت ۱۰ هفته با پروتکل هوازی و بی‌هوازی به تمرین پرداختند. سپس تزریق درون صفاقی نانوذرات نقره تولید شده توسط قارچ فوزاریوم، به‌ازای ۱۰ درصد وزن بدن هر رت در ۵ نوبت انجام گرفت و پس از ۴۸ ساعت از آخرین تزریق، رت‌ها بی‌هوش شده و نمونه‌گیری صورت پذیرفت. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد تمرین بی‌هوازی در کاهش وزن رت‌ها به صورت معنی‌داری موثر بود ($p=0/045$). همچنین اکسیژن مصرفی در تمامی گروه‌ها به جز گروه دریافت کننده نانونقره، نسبت به گروه کنترل افزایش داشت ($p=0/000$). همچنین تزریق نانونقره بیولوژیک موجب التهاب و پرخونی در بافت ریه رت‌های بدون تمرین شد. اما در گروه تمرین بی‌هوازی التهاب و پرخونی نسبت به گروه هوازی کمتر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تزریق نانوذره نقره تولید شده به روش زیستی موجب عارضه‌های ساختاری بافت ریه رت‌های نر ویستار شود. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد پیش‌آمادگی بدنی بی‌هوازی نسبت به هوازی در کاهش این اثرات سودمندتر است.

واژگان کلیدی: پروتکل تمرین هوازی، پروتکل تمرین بی‌هوازی، نانوذرات نقره بیولوژیک

مقدمه

اگر چه انسان‌ها در مراحل تکاملی خود همیشه در معرض مواجهه با نانوذرات موجود در هوا بوده‌اند اما در طی چند قرن اخیر این مواجهه به طرز چشم‌گیری به دلیل افزایش منابع انسان‌زاد، فزونی یافته است. سرعت بالای توسعه فناوری نانو سبب شده تا نانومواد مهندسی شده نیز به یکی دیگر از منابع مواجهه با نانومواد تبدیل شوند. پژوهش‌های انجام‌شده، ارتباط بین مواجهه با ذرات موجود در هوای محیط و عوارض سو بر سلامتی، افزایش ناتوانی‌ها و مرگ‌ومیر را به اثبات رسانیده‌اند. اگرچه این ذرات بسیار در توسعه مصارف پزشکی و درمانی به کار گرفته می‌شوند اما سو مصرف ساختارهای نانو به احتمال زیاد سمی‌تر از مواد مشابه همان ماده در اندازه معمولی بوده و می‌توانند به بدن آسیب وارد کنند. بیان شده است اندازه بسیار کوچک نانوذرات و سطح دریافت آن احتمالاً نقش مهمی در سمیت نانوذرات ایفا می‌کند. بعضی گزارشات در زمینه‌های پزشکی و بیولوژیکی ثابت کرده‌اند که بسیاری از وسایل پزشکی نقره‌دار، یون‌های نقره آزاد می‌کنند که وارد خون و در کبد، کلیه، ریه و مغز انباشته شده و باعث سمی شدن آن‌ها و در نهایت منجر به مرگ می‌شود (۱). بنابراین نانو ذرات نقره ممکن است اثرات سمی داشته باشند که مکانیسم سمیت آن‌ها روشن نیست (۲) و نگرانی‌های زیادی را در ارتباط با استفاده در طبیعت برای سلامتی انسان‌ها به وجود آورده است (۳). نتایج مختلفی نشان داد که نانوذرات دارای اثرات منفی بر روی دستگاه تنفس، دستگاه تولید مثلی مردان و سیستم عصبی هستند (۴-۶). رودا و همکاران (۷) نشان دادند یکی از اثرپذیرترین بافت‌ها نسبت به نانوذرات نقره، پارانشیم ریوی است و حتی در دوزهای کم نیز آسیب‌های متعددی در پونوموسیت‌ها ایجاد می‌شود. هم‌چنین اندرسون و همکاران (۸) بیان کردند نانوذرات نقره در غشا پایه ریه رت‌های نرسوب می‌کند. از طرف دیگر تولید نانوذرات فلزی به سه روش شیمیایی و فیزیکی و بیولوژیکی امکان‌پذیر است که روش بیولوژیکی به دلیل عدم تولید مواد سمی در محیط به عنوان روش سبز خوانده می‌شود. بنابراین خصوصیات منحصر به فرد نانوذرات امکان استفاده بیولوژیکی آن‌ها را در تشخیص و درمان بیماری‌ها فراهم نموده است (۹). اما نباید تولید زیستی نانوذرات موجب سومصرف این ذرات شود و نیاز به بررسی دوزهای ایمن این نانوذرات بیولوژیک بیش از پیش احساس می‌شود.

هم‌چنین امروزه مشخص شده است تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف تأثیرات متفاوتی را بر اندام‌ها و بافت‌های مختلف بدن می‌گذارد. اگر فعالیت بدنی با شدت ملایم و طولانی مدت انجام شود، حالت پایدار بدن و شرایط فیزیولوژیک بدن کاملاً ارتقا پیدا کرده و فرد شرایط جدیدی را تجربه می‌کند. این استرس مقطعی با تحریک و حتی تخریب اولیه موجب افزایش مقاومت محیطی و سازگاری‌های مختلف می‌شود که به صورت علمی به عنوان پیش آمادگی بدنی (Pre-conditioning) مطرح می‌شود (۱۰). به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی می‌تواند به عنوان یک عامل ضدالتهابی در تعدیل عوامل التهابی ناشی از ریزذرات آلاینده‌های مختلف در سیستم تنفس نقش داشته باشد. برای مثال فعالیت‌های بدنی نه تنها باعث بهبود علائم ریوی بیماران مبتلا به آسم نظیر بهبود فعالیت ریه‌ها در وضعیت استراحت، بهبود نمرات تنگی نفس و کاهش برونکواسپاسم ناشی از ورزش می‌شود، بلکه آمادگی فیزیکی آن‌ها را افزایش می‌دهد (۱۱). حتی فعالیت بدنی مداوم پارامترهای استرس اکسیداتیو و بافتی را در موش‌های در معرض دود سیگار را نیز بهبود بخشید (۱۲). هم‌چنین فعالیت بدنی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی (۱۳) را افزایش داده و بیان ژن‌های مربوط به مسیرهای انرژی و مسیرهای متابولیسم چربی را تنظیم می‌کند (۱۴، ۱۵). علاوه بر این، فعالیت‌های بدنی باعث کاهش تکثیر اپی‌تلیال و بیان موسین شده و مانع از اختلال عمل انقباض عروق

وابسته به اندوتلیوم ناشی از آلاینده‌های مختلف هوا در ریه‌ها می‌شود (۱۶،۱۷). نکته بسیار مهم در این زمینه تفاوت انواع پروتکل‌های تمرینی بر افزایش مقاومت سلولی و بافتی می‌باشد که می‌بایست در انتخاب نوع پروتکل تمرین دقت بسیار شود. در این راستا فیشر و همکاران (۱۸) نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول را در پی دارد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از استرس اکسیداتیو می‌توانند به‌ساختار سلولی DNA آسیب بزنند. آسیب DNA در بسیاری از ارگان‌ها از جمله ریه منجر به بروز رخداد آپوپتوزیس می‌شود. در مقابل ویرا و همکاران (۱۹) نشان دادند تمرین هوازی با شدت کم، التهاب مجاری تنفسی و تغییر ساختار سلول‌های ریوی را کاهش می‌دهد. کالج پزشکی ورزشی آمریکا (The American College of Sports Medicine) فعالیت هوازی را به‌عنوان هر فعالیتی که از گروه‌های بزرگ عضلانی استفاده کرده و می‌تواند به‌طور مداوم حفظ شود و ماهیت آن ریتمیک باشد، تعریف می‌کند (۲۰). گروه‌های عضلانی فعال شده توسط این نوع تمرینات متکی به متابولیسم هوازی هستند تا انرژی خود را به‌شکل آدنوزین تری‌فسفات (ATP) از اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای چرب استخراج کنند. از طرف دیگر فعالیت بی‌هوازی به‌عنوان فعالیت بدنی شدید با مدت زمان بسیار کوتاه تعریف شده است، که توسط منابع انرژی موجود در عضلات منقبض شده و مستقل از استفاده از اکسیژن استنشاق به‌عنوان منبع انرژی تامین می‌شود (۲۱). مشابه ورزش هوازی، ورزش‌های بی‌هوازی ممکن است تاثیر بالقوه مفیدی بر روی سیستم تنفسی داشته باشند. تمرینات هوازی به‌مدت ۵ هفته ممکن است با کاهش سیتوکین‌های التهابی و مارکرهای استرس اکسیداتیو از طریق تولید اینترلوکین ۱۰، التهاب ریوی را مهار کند (۲۲). هم‌چنین برخی محققان نشان دادند اثرات فعالیت‌های بی‌هوازی با عضوی از خانواده پپتیدهای ناتیوریتیک، معروف به پپتید نوع C منجر شود (۲۳).

باتوجه به این‌که بسیاری از مطالعات بر تاثیر نانوذرات شیمیایی متمرکز شده‌اند و تحقیقات محدودی در مورد اثر بخشی نانوذرات بیولوژیک انجام گرفته است و این‌که ممکن است تولید زیستی این مواد، موجب بروز سواستفاده‌ها به‌دلیل توهم کم‌خطر بودن ایجاد کند، هم‌چنین وجود پروتکل‌های هوازی و بی‌هوازی و اثرگذاری متفاوت آن‌ها در افزایش مقاومت سلول‌های ریوی، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیرات ناشی از تزریق درون صفاقی نانوذرات نقره بیولوژیک همراه با ده هفته پیش آماده‌سازی تمرین هوازی و بی‌هوازی بر بافت ریه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه با سنی (۱۲ هفته) و میانگین وزنی مشابه (۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم) از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود خریداری و حیوانات به‌مدت یک هفته بدون انجام هیچ‌گونه مداخله‌ای جهت سازگار شدن با محیط آزمایشگاه در شرایط استاندارد (سیکل روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به‌غذای حیوانات و آب شهری سالم و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد) در قفس‌های مخصوص حیوانات از جنس پلی‌اتیلن که کف آن از خاک چوب نرم پوشیده شده بود نگهداری شدند. در طی آزمایش از خوراک مخصوص و فشرده جوندگان و آب سالم شهری برای تغذیه رت‌ها طبق ضوابط قانون نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی به‌طور یکسان استفاده شد. نمونه‌های آماری این تحقیق به‌روش نمونه‌گیری انتخابی هدف‌دار و با توجه به شرایط وزنی و سنی انجام شد پس از گذشت یک هفته حیوانات به‌طور تصادفی در ۶ گروه مساوی با ۵ سر موش در هر گروه شامل گروه‌های (کنترل سالم، نانوذرات بیولوژیک نقره، تمرین

هوای، تمرین بی‌هوای، نانوذرات بیولوژیک نقره+تمرین هوای، نانوذرات بیولوژیک نقره+تمرین بی‌هوای) تقسیم شدند. این رت‌ها پس از ۱۰ هفته تمرین هوای و بی‌هوای (۲۴) (جدول ۱، ۲)، به‌اندازه ۱۰ درصد از وزن بدن هر رت، به‌صورت تزریق درون صفاقی در ۵ نوبت، نانوذرات نقره دریافت کردند (۲۵). نانوذرات نقره بیولوژیک توسط عصاره قارچ فوزاریوم اکسیسپوروم با استفاده از محلول نیترات نقره در مرکز تحقیقات نانوذرات بیولوژیک در پزشکی واحد شاهرود سنتز و توسط آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری، اسپکتوفوتومتری و روش پراش اشعه ایکس مورد تایید قرار گرفت (۲۶). هم‌چنین برای نمونه‌گیری بافتی پس از طی ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق، رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین، بی‌هوش و کالبد شکافی صورت گرفت و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از آن برای بافت شناسی آماده شد. پس از ۲۴ ساعت اندام مورد نظر در داخل فرمالین جدید ثابت و بعد از فیکساسیون، آب‌گیری و شفاف‌سازی به‌وسیله پارافین قالب‌گیری شد و سپس بعد از این مراحل، توسط دستگاه میکروتوم مقاطع با ضخامت ۵ میکرون به‌صورت نمونه‌گیری تصادفی و با فواصل منظم و یکنواخت تهیه شدند. مقاطع میکروسکوپی انتخاب شده، توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ و سپس توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر مطالعه و عکس‌های گرفته شده برای ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک بافت ریه به پاتولوژیست واگذار شد.

جهت اثبات داده‌های کمی در گروه‌ها بعد از تعیین نرمال بودن جامعه داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون کلوموگروف-اسمیرنوف (K-S) و هم‌چنین آزمون برابری واریانس‌ها (لوین) از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA)، و آزمون تعقیبی بونفرونی جهت تعیین اختلاف بین گروه‌ها تجزیه و تحلیل شدند. هم‌چنین سطح معنی‌داری در این پژوهش ۵ درصد $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: پروتکل هوای

هفته	مدت تمرین (دقیقه)	سرعت تمرین (متر/دقیقه)
۱	۱۵	۱۵
۲	۱۵	۱۵
۳	۲۰	۲۰
۴	۲۵	۲۰
۵	۳۰	۲۵
۶	۴۰	۲۵
۷	۵۰	۳۰
۸	۶۰	۳۰
۹	۶۰	۳۰
۱۰	۶۰	۳۰

جدول ۲: پروتکل بی هوازی

هفته	تعداد تکرارها (ثانیه)	تعداد ست ها	شیب تردمیل (درجه)	سرعت تمرین (متر/دقیقه)
۱	۴۰	۳	۵	۳۵
۲	۴۰	۴	۵	۴۰
۳	۴۰	۵	۵	۴۵
۴	۴۰	۶	۵	۵۰
۵	۴۰	۶	۵	۵۵
۶	۴۰	۶	۱۰	۵۵
۷	۴۰	۷	۱۰	۵۵
۸	۴۰	۸	۱۰	۶۰
۹	۴۰	۸	۱۵	۶۰
۱۰	۴۰	۸	۱۵	۶۰

جدول ۳: تغییرات وزن و مسافت طی شده بعد از ۱۰ تمرین هوازی و بی هوازی

گروه	وزن (گرم)	مسافت (متر)
کنترل	۳۱۵,۲۵	۹۲۵
نانو ذرات نقره بیولوژیک	۲۴۷,۷۵	۱۱۷
پروتکل تمرین هوازی	۲۴۳	۴۵۳۹
پروتکل تمرین بی هوازی	۲۳۳	۴۷۸۲
نانوذرات نقره+ پروتکل هوازی	۲۵۲	۲۰۷۹
نانوذرات نقره+ پروتکل بی هوازی	۲۳۶,۲۵	۳۲۹۱

نتایج

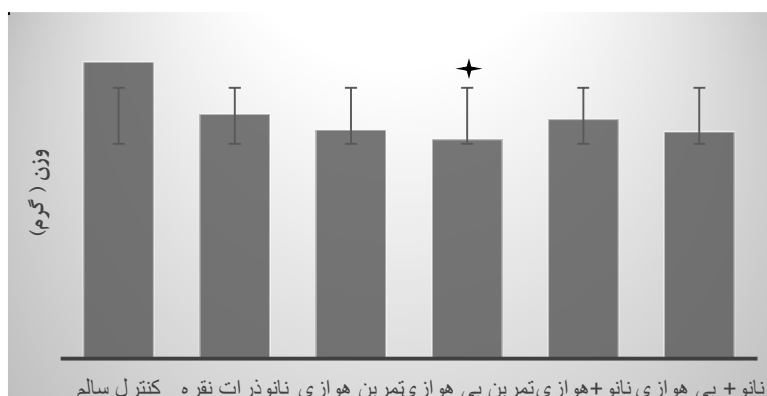
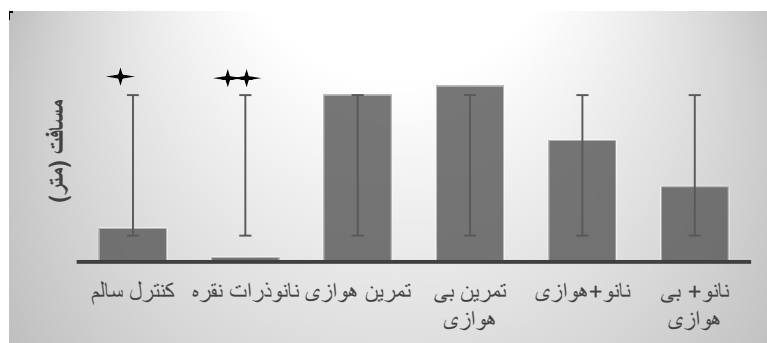
در این مطالعه با توجه به هدف اصلی این تحقیق مبنی بر مقایسه اثرگذاری نانوذرات نقره بر بافت ریه رت‌های تمرین کرده و بدون تمرین و همچنین مطالعه سازگاری‌های ناشی از این تمرینات، براساس دو متغیر وزن رت‌ها و همچنین میزان مسافت طی شده در آزمون دویدن بر روی تردمیل جوندگان (استقامت پیش‌رونده) (جدول ۳)، بعد از ۱۰ هفته مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که براساس آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی، وزن رت‌ها در گروه‌های تمرین به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کم‌تر بود ($p=0/045$) (جدول ۴) (شکل ۱). به علاوه میزان مسافت طی شده در آزمون دویدن استقامتی پیش‌رونده بر روی تردمیل جوندگان، در گروه‌های تمرین به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود ($p=0/000$) (جدول ۵) (شکل ۲).

جدول ۴: نتایج تحلیل واریانس یکطرفه در متغیر وزن رت‌ها

وزن	مجموع مربعات	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش f	sig
بین گروهی	۲۰۰۰۲۸۵۳	۸	۲۵۰۰۳۵۷	۲,۳۳۸	/.۰۴۵
درون گروهی	۳۱۰۱۴,۲۰۰	۲۹	۱۰۶۹,۴۵۵		
جمع کل	۵۱۰۱۷,۰۵۳	۳۷			

جدول ۵: نتایج تحلیل واریانس یکطرفه در متغیر مسافت طی شده در آزمون پیش‌رونده استقامتی رت‌ها

مسافت	مجموع مربعات	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش f	sig
بین گروهی	۴۵۵۸۴۵۰,۴۳۱	۸	۵۶۹۸۰۶,۳۰۴	۲۶,۷۶۶	/.۰۰۰
درون گروهی	۶۳۸۶۴۸,۸۰۰	۳۰	۲۱۲۸۸,۲۹۳		
جمع کل	۵۱۹۷۰۹۹,۲۳۱	۳۸			

شکل ۱: تغییرات وزن در گروه‌های مختلف (* $p < 0.05$)شکل ۲: اختلاف میان گروه‌ها در متغیر مسافت طی شده در آزمون پیش‌رونده استقامتی (* $p < 0.05$)

نتایج هیستوپاتولوژیک:

در رابطه با نتایج هیستوپاتولوژیک، میزان آسیب های بافت ریه از قبیل پرخونی و التهاب در گروه دریافت کننده نانوذرات نقره بدون تمرین از همه گروه ها بیشتر بود. بعلاوه گروه های تمرینی آسیب به نسبت کمتری نسبت به گروه های دیگر تجربه کردند. تغییرات ساختاری گروه ها با بزرگ نمائی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر در شکل ۳ نشان داده شده است.

در نمونه های گروه کنترل، شکل (A)، بافت ریه دارای ویژگی های نرمال به لحاظ بافت شناسی بوده و نظم و انسجام در کل بافت قابل رویت است. برونشیول های ریوی دارای دیواره مشخص با اپی تلیوم کاملا طبیعی و سالم بوده و تغییر خاصی در دیواره آن ها پدیدار نیست. اندازه و تعداد آلوئول ها و نیز دیواره بین آلوئولی (فلش سفید) به لحاظ تعداد سلولی مناسب است. سلول پونوموسیت نوع ۱ و ۲ (فلش آبی) کاملا مشخص و به لحاظ ویژگی های سلولی از قبیل شکل هسته و سیتوپلاسم و نیز تعداد سلول ها نرمال گزارش می شود.

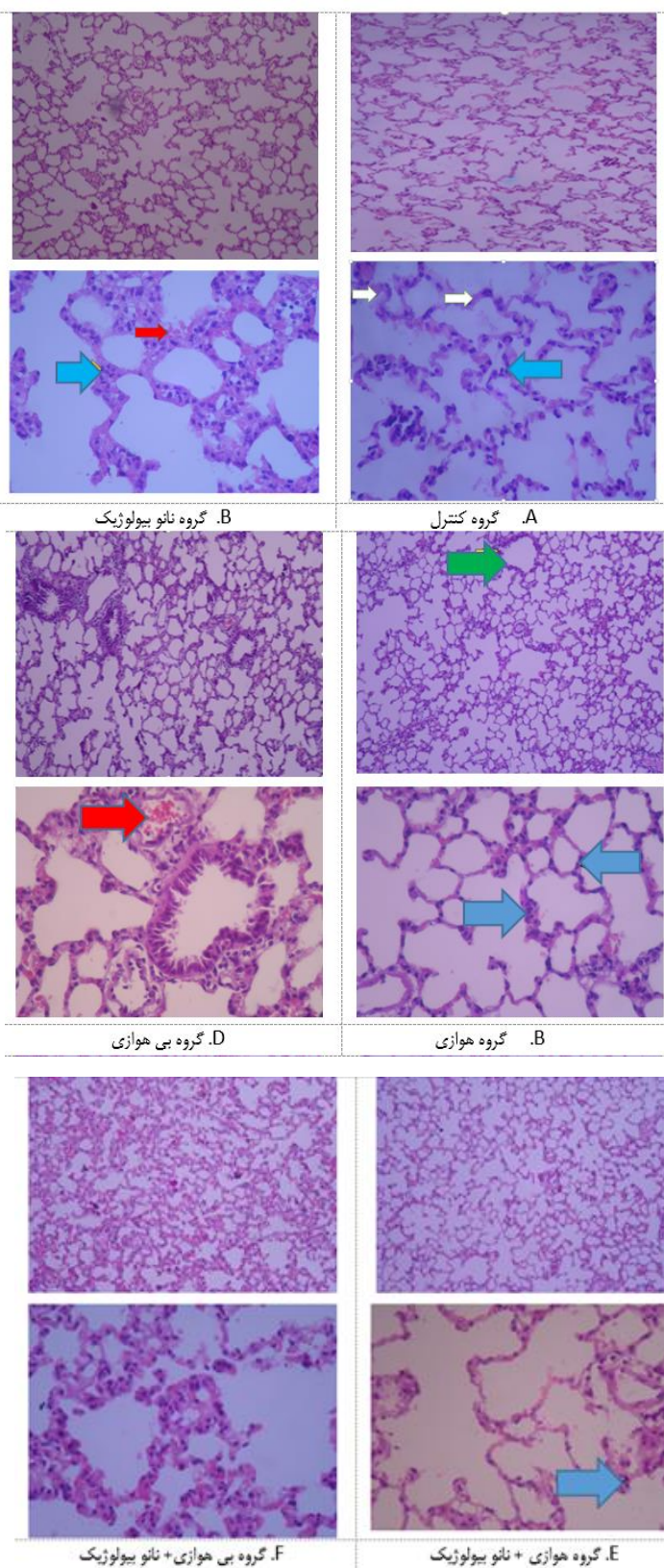
در نمونه های گروه نانو ذرات بیولوژیک نقره، شکل (B)، در نمونه های گروه بیولوژیک بافت ریه دارای فضای داخلی مشهود و منظم و قابل تفکیک می باشد. برونشیول های ریوی مشخص و اندازه طبیعی همراه با بافت پوششی یکنواخت دارند. در دیواره آلوئولها اندک تجمع خون دیده شده (فلش قرمز) اما افزایش التهاب موجود نیست. سلول های پونوموسیت شکل و ظاهر طبیعی دارند (فلش آبی) و تغییر خاصی در دیواره آلوئولی دیده نمی شود.

در نمونه های گروه هوازی شکل (C) بافت ریه در مقایسه با گروه کنترل تغییر خاصی را نشان نمی دهد. اندازه برونشیول ها (فلش سبز) و نیز تعداد و اندازه آلوئول های ریوی در مقاطع مختلف مناسب و طبیعی می باشد. سلول های دیواره آلوئولی و انواع پونوموسیت ها (فلش آبی) نیز ویژگی نرمال دارند.

در نمونه های گروه بی هوازی شکل (D) مشخصات بافتی همانند گروه کنترل دارای نظم و انسجام بوده و هیچگونه تغییر خاصی در بافت دیده نمی شود. سلول های دیواره آلوئولی شکل منسجم و تعداد و اندازه نرمال دارند. تنها میزان اندکی پرخونی (فلش قرمز) در برخی وریدچه ها قابل رویت است که محسوس نمی باشد.

در نمونه های گروه نانو ذرات بیولوژیک نقره + تمرین هوازی شکل (E) در نمونه های گروه هوازی بیولوژیک نظم و انسجام در بافت دیده می شود. تعداد و اندازه راه های هوایی و آلوئول ها طبیعی و مناسب بوده و تجمع خون یا سلول های التهابی دیده بافت دیده نمی شود. اندازه و تعداد سلول های نوموسیت (فلش آبی) طبیعی می باشد.

در نمونه های گروه نانو ذرات بیولوژیک نقره + تمرین بی هوازی شکل (F) در نمونه های گروه بی هوازی بیولوژیک هیچگونه تغییر خاصی در بافت ریه و دیواره ساختارها از قبیل آلوئول ها و دیواره بین آلوئولی و برونشیول ها وجود ندارد. تعداد اندکی سلول خونی در برخی نواحی رویت می شود که محسوس و غیر طبیعی نیست. بافت دارای فضای منظم و اندازه و انسجام طبیعی می باشد.



شکل ۳: فتومیکروگراف ریه موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ (بالا) و ۴۰۰ (پایین)

بحث

هدف از این پژوهش، بررسی میزان مقاومت سلولی ایجاد شده توسط دو نوع فعالیت بدنی هوازی و بی‌هوازی در سلول‌های ریوی در مواجهه با نانوذرات تولید شده با روش زیستی در رت‌های نر ویستار بود. نتایج اولیه این پژوهش ثابت کرد رت‌ها نر طی ۱۰ هفته تمرین هوازی و بی‌هوازی نسبت به تمرینات سازگار شده‌اند. مقدار مسافت طی شده در آزمون استقامتی پیش‌رونده بر روی تردمیل جوندگان در گروه‌های تمرینی به‌طور معنی‌داری افزایش چشم‌گیری داشت که بیان‌گر افزایش سازگاری‌های مختلف فیزیولوژیک نظیر سازگاری‌های قلبی-تنفسی، هورمونی و عصبی-عضلانی است (شکل ۱). به‌علاوه وزن این حیوانات در گروه‌های تمرینی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کم‌تر بود که نشان‌دهنده تغییرات متابولیکی در موش‌های صحرائی است (شکل ۲). هم‌چنین نتایج نشان داد تزریق درون صفاقی نانوذرات نقره موجب بروز نارسایی‌های ساختاری مثل پرخونی و التهاب در گروه نانوذرات نقره بیولوژیک شده است. در مقایسه دو نوع پروتکل تمرینی نتایج نشان داد در کاهش آسیب‌های پونوموسیت تمرینات بی‌هوازی در کاهش اثرات جانبی نانوذرات نقره در برونش‌یول‌ها و آلوئول‌ها اثر بخش‌تر بوده است و نسبت به تمرینات هوازی در کاهش التهاب بافت ریه تاثیرات بهتری اعمال کرده است (شکل ۳).

در رابطه با اثر یک دوره نانونقره بر ساختار بافت ریه تحقیقات اندکی انجام شده است. بیان شده است تزریق درون صفاقی نانوذره نقره سبب نکروز شدن، دژنراسیون و ارتشاح سلول‌های ریوی رت‌ها می‌شود که با نتایج هیستوپاتالوژی ما مطابقت دارد (۲۷). هم‌چنین گزارش شده است نانوذراتی مثل نقره، اکسید تیتانیوم، اکسید آلومینیوم و کربن سیاه، شاخص‌های التهابی تنفسی را افزایش می‌دهند (۲۸). لیمباچ و همکاران (۲۹)، نشان دادند فیبروبلاست‌ها می‌توانند نانوذرات را جذب کنند. این نتایج نشان می‌دهد اگر ذرات در مقیاس نانو قرار گیرند از لحاظ بیولوژیکی فعال می‌شوند. در توجیه این سازوکار می‌توان بیان کرد نانوذرات نقره بعد از چسبیدن به سطح غشا سلولی، سیستم تنفسی را به‌صورت برهم‌کنش آنزیم با زنجیره تنفسی باکتری با نقره تخریب می‌کنند. هم‌چنین نقره با گروه‌های تیولی آنزیم‌های حیاتی واکنش داده و آن‌ها را غیرفعال می‌کند. نانوذرات نقره با اندازه ۱۱ نانومتر سمیت سلولی را در سلول‌های ریه ایجاد می‌کنند که به سطح پوشاننده آن‌ها بستگی ندارد (۳۰). نانو ذرات نقره پتانسیل غشایی پلازما را ناپایدار می‌کنند که نتیجه آن کاهش سطح ATP درون سلول می‌باشد این عمل با هدف قرار دادن غشا سلول باکتری انجام می‌شود و باعث مرگ باکتری می‌شد. هم‌چنین نانوذرات نقره موجب از هم گسستن اجزای ممانعت‌کننده (حفاظ) موجود در غشا خارجی باکتری می‌شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول‌هایی نظیر لیپوپلی‌ساکارید ۱ و پورین‌ها از غشا سیتوپلاسمی می‌شود (۳۱). اتصال نقره به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها و ایجاد پیوند با آن‌ها، باعث از بین رفتن خواص اصلی پروتئین‌ها می‌شود. نانونقره فقط به سطح غشا سلولی نمی‌چسبد بلکه به درون سلول‌ها هم نفوذ می‌کند. نانونقره پس از نفوذ به‌داخل سلول باکتری آنزیم‌های آن را غیر فعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می‌شود (۳۲).

مطالعات متعددی ارتباط بین سطح فعالیت بدنی و عمل‌کرد تنفسی را توصیف می‌کند (۳۳). ظرفیت حیاتی اجباری (Forced vital capacity) و حجم بازدم مجبور در ۱ ثانیه (Forced expiratory volume 1 second)، شاخص‌های قوی عمل‌کرد ریه هستند، که به‌دلیل سبک زندگی بی‌تحرک کاهش می‌یابند (۳۴، ۳۵). تحقیقات نشان می‌دهد مردانی که در طول پی‌گیری (۱۹ ماه) در سبک زندگی فعال باقی مانده بودند، ۵۰ میلی‌لیتر در FEV1 و ۷۰ میلی‌لیتر در FVC خود

بهبود داشتند، در حالی که افرادی که در سبک زندگی کم‌تحرک بودند ۳۰ و ۲۰ میلی‌لیتر در کاهش به‌ترتیب FEV1 و FVC (۳۶). مطالعات مقطعی گزارش کرده‌اند که فعالیت بدنی منظم و آمادگی جسمانی مناسب با عمل‌کرد بهتر ریوی مرتبط بوده است (۳۷، ۳۸). مشابه فعالیت‌های هوازی، فعالیت‌های بی‌هوازی نیز ممکن است تاثیر بالقوه مفیدی بر روی سیستم تنفسی داشته باشند. برخی محققان نشان دادند اثرات فعالیت‌های بی‌هوازی با عضوی از خانواده پپتیدهای ناتیورپتیک، معروف به پپتید نوع C (Natriuretic peptide precursor C) ارزیابی شد. CNP توسط اندوتلیوم سنتز می‌شود و از طریق تاثیرات آن بر انقباض عروق خونی و هم‌چنین اعمال خواص ضد فیبروتیک و ضد تکثیری، یک اثر محافظتی ایجاد می‌کند. این ماده باعث ایجاد تاثیر بیش از حد قطبی بر روی لایه عضلانی صاف رگ‌های خونی می‌شود که باعث اتساع عروق می‌شود (۲۳، ۳۹). هم‌چنین گزارش شده است که CNP برای جلوگیری از پیری قلب از طریق فیبروز دیواره بطن چپ از طریق مسیر حلقوی گوانوزین منوفسفات (cGMP)، اثرات غیر تکثیر خود را بر روی فیبروبلاست‌های قلبی اعمال می‌کند (۴۰). به‌نظر می‌رسد پیش‌آمادگی بدنی موجب افزایش مقاومت سلول‌های ریوی در مواجهه با سمیت نانوذرات نقره بیولوژیک می‌شود. در اثبات این مطلب ویرا و همکاران (۱۹) نشان دادند التهاب مجاری هوایی، تغییر شکل و بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی در نتیجه تمرین هوازی با شدت کم و متوسط، کاهش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد در تحقیق حاضر اثر بخشی پیش‌آمادگی بی‌هوازی به‌دلیل شدت تمرین رت‌ها در گروه‌های تمرین باشد و می‌توان بیان کرد تمرینات ورزشی می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی در تعدیل عوامل التهابی ناشی از ریزدات آلاینده‌های مختلف نقش داشته باشد. به‌نظر می‌رسد تمرینات ورزشی کم‌شدت تا متوسط از طریق کاهش کاتوکولامین‌ها، کورتیزول، رادیکال‌های آزاد و تنش اپی‌تلیالی، بیان فاکتورهای رونویسی هسته‌ای چون (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) را کاهش داده و این فاکتورها در ادامه، بیان اینترلوکین‌های پیش‌التهابی مختلفی هم‌چون اینترلوکین‌های (Interleukin) ۱، ۸ و ۱۳ را تقلیل دهند که سلسله این رخدادها، فراخوانی سلول‌های ایمنی در منطقه را کاهش داده و از تغییر ساختار سلول‌های ریوی جلوگیری می‌کند مخصوصاً زمانی که محرکی موجب افزایش این التهاب‌ها در منطقه شود (۴۱). به‌نظر می‌رسد پیش‌آمادگی بدنی بتواند از طریق سازکارهای فوق، مقاومت سلول‌های ریوی را نسبت به سمیت نانو افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

تزریق درون صفاقی نانوذرات نقره تولید شده به‌روش زیستی نیز موجب تخریب، پرخونی و التهاب بافت ریه می‌شود. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد پیش‌آمادگی بدنی بی‌هوازی در کاهش این اثرات موثرتر باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد می‌باشد که با هزینه شخصی نفر اول پژوهش انجام شده است. بدین وسیله از آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود نهایت تقدیر و تشکر را داریم.

تاییدیه اخلاقی

این پژوهش زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود به شماره IR.IAU.SHAHROOD.REC.1396.41 در مرکز تحقیقات نانوذرات بیولوژیک در پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود انجام شد.

منابع

1. Shahnaz Bakand, Amanda Hayes. "Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure", *Inhal Toxicol.* 2012; 24(2): 125–135.
2. Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2008; 25(4): 958-61.
3. Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6(8): 681-8.
4. MOTTAHEDI1, Afrooz; ZIAOLHAGH2, Sayyed-Javad. Silver nanoparticles and structural changes in brain tissue of male rats following aerobic and anaerobic preconditioning. *Journal of Knowledge and Health in Basic Medical Sciences.* 2019, 14(2), Page: 3-14.
5. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2):449.
6. Morimoto Y., Izumi H., Yoshiura Y., Fujishima K, et al. Usefulness of intratracheal instillation studies for estimating nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(2):165.
7. Roda E, Bottone MG, Biggiogera M, Milanesi G, et al. T. Pulmonary and hepatic effects after low dose exposure to nanosilver: Early and long-lasting histological and ultrastructural alterations in rat. *Toxicology reports.* 2019; 6: 1047–1060.
8. Anderson DS, Silva RM, Lee D, Edwards PC, et al. Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: influence of dose, size, and chemical composition. *Nanotoxicology.* 2015; 9:591–602.
9. Pourali, P., Yahyaei, B. & Afsharnezhad, S. Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles by *Fusarium oxysporum* and Assessment of Their Conjugation Possibility with Two Types of β -Lactam Antibiotics without Any Additional Linkers. *Microbiology.* 2018; 87(2): 229–237.
10. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74(5): 1124-36.
11. Ram FSF, Robinson S, Black PN. Physical training for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2000; Issue 1.
12. Menegali B, Nesi R, Souza P, Silva L, et al. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009; 22(6):567–73.
13. Nemmar A, Al-Salam S, Yuvaraju P, Beegam S. Exercise training mitigates water pipe smoke exposure-induced pulmonary impairment via inhibiting NF-kappaB and activating Nrf2 signalling pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 7459612.

14. Robinson M, Dasari S, Konopka A, Johnson M, et al. Enhanced protein translation underlies improved metabolic and physical adaptations to different exercise training modes in young and old humans. *Cell Metab.* 2017; 25(3):581–92.
15. Dantas W, Murai I, Perandini L, Azevedo H, et al. Acute exercise elicits differential expression of insulin resistance genes in the skeletal muscle of patients with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 2017; 86:688–97.
16. Yu Y-B, Liao Y-W, Su K-H, Chang T-M, et al. Prior exercise training alleviates the lung inflammation induced by subsequent exposure to environmental cigarette smoke. *Acta Physiol.* 2012; 2012:1–9.
17. Feng B, Qi R, Gao J, Wang T, et al. Exercise training prevented endothelium dysfunction from particulate matter instillation in Wistar rats. *Sci Total Environ.* 2019; 694:133674.
18. Fisher G, Schwartz DD, Quindry J, Barberio MD, et al. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *Journal of Applied Physiology.* 2011; 110(3): 730-737.
19. Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ÂB, et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176(9):871-7.
20. Wahid A, Manek N, Nichols M, Kelly P, et al. Quantifying the Association Between Physical Activity and Cardiovascular Disease and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(9): e002495.
21. Patel H., Alkhawam H., Madanieh R., Shah N., et al. Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. *World journal of cardiology.* 2017; 9(2), 134–138.
22. Rigonato-Oliveira NC, Mackenzie B, Lacerda Bachi AL, Oliveira-Junior MC, et al. Aerobic exercise inhibits acute lung injury: from mouse to human evidence exercise reduced lung injury markers in mouse and in cells. *Exerc Immunol Rev.* 2018; 24:36–44.
23. Akseki Temür H, Vardar SA, Demir M, et al. The alteration of NT pro CNP plasma levels following anaerobic exercise in physically active young men. *Anatol J Cardiol.* 2015; 15(2):97-102.
24. Mogharnasi M, Bayat J, Foaddini M, Salehinia A, et al. The effect of colostrum along with aerobic and anaerobic exercise on lipid peroxidation and total antioxidant capacity of male Wistar rats. *Armaghan-e-Danesh.* 2016; 21(3):265-277.
25. Del Bonis-O'Donnell JT, Chio L, Dorlhiac GF, McFarlane IR, et al. Advances in Nanomaterials for Brain Microscopy. *Nano Res.* 2018; 11(10):5144-5172.
26. Pourali P, Badiee SH, Manafi S, Noorani T, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles by two bacterial and fungal strains, *Bacillus cereus* and *Fusarium oxysporum*, and assessment and comparison of their nanotoxicity in vitro by direct and indirect assays, *Electronic Journal of Biotechnology.* 2017; 29: 86-93.
27. Zamani N, Naghsh N, Fathpour H. Comparing poisonous effects of thioacetamide and silver nanoparticles on enzyme changes and liver tissue in mice. *Zahedan J Res Med Sci(ZJRMS)* 2014; 16(2): 54-57.
28. Zhang Z, Kleinstreuer C, Donohue JF, Kim CS. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *J Aerosol Sci* 2005; 36(2): 211-33.

29. Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 2007; 41(11): 4158-63.
30. Pengyu Chen, Shane A. Seabrook, V. Chandana Epa, et al. Contrasting Effects of Nanoparticle Binding on Protein Denaturation. *J Phys Chem. C* 2014; 118(38): 22069–22078.
31. Sondhi P, Maruf M, Stine K.J. Nanomaterials for Bio sensing Lipopolysaccharide. *Biosensors*. 2019; 10(1):2.
32. Abdul Razack S, Duraiarasn S, Mani V. Biosynthesis of silver nanoparticle and its application in cell wall disruption to release carbohydrate and lipid from *C. vulgaris* for biofuel production. *Biotechnology Reports*. 2016; 11: 70-76.
33. Pelkonen M, Notkola IL, Lakka T, Tukiainen HO, et al. Delaying decline in pulmonary function with physical activity: a 25-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168 (4): 494- 9.
34. Inselma LS, Milanese A, Deurloo A. Effect of obesity on pulmonary function in children. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16 (2): 130- 7.
35. Jakes RW, Day NE, Patel B, Khaw KT, et al. Physical inactivity is associated with lower forced expiratory volume in 1 second: European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk Prospective Population Study. *Am J Epidemiol* 2002; 156 (2): 139- 47.
36. Bottai M, Pistelli F, Di Pede F, Carrozzi L, et al. Longitudinal changes of body mass index, spirometer and diffusion in a general population. *Eur Respir J* 2002; 20 (3): 665- 73.
37. Thomas PS, Cowen ER, Hulands G, Milledge JS. Respiratory function in the morbidly obese before and after weight loss. *Thorax*. 1989; 44 (5): 382- 6.
38. Rochester DF, Enson Y. Current concepts in the pathogenesis of the obesity-hypoventilation syndrome. Mechanical and circulatory factors. *Am J Med* 1974; 57 (3): 402-20.
39. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(3):1426–1431.
40. Sangaralingham SJ, Huntley BK, Martin FL, McKie PM, et al. The aging heart, myocardial fibrosis, and its relationship to circulating C-type natriuretic Peptide. *Hypertension*. 2011; 57(2):201–207.
41. Hashimoto S, Gon Y, Matsumoto K, Takeshita I, et al. Inhalant Corticosteroids inhibit hyper osmolality-induced, and cooling and rewarming–induced interleukin-8 and RANTES production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(3 Pt 1):1075-80.

Morphological changes in lung tissue following the uptake of silver nanoparticles produced by biosynthesis in trained male Wistar rats

Pourmand F¹ M.Sc., Ziaolhagh SJ^{1,2*} Ph.D., Molzemi S³ M.Sc.

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
2. Biological Nanoparticles in medicine research center, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran
3. Department of Laboratory Sciences, School of Medical Science, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

* Email corresponding author: Javadzia@gmail.com

Received: 3 Oct. 2020

Accepted: 24 Jan. 2021

Abstract

Aim: Therefore, this study aimed to investigate the amount of lung tissue damage in trained rats due to biological silver nanoparticles.

Material and Methods: 30 male rats were divided into 6 groups of healthy control, nano-silver, aerobic training, anaerobic training, nano-silver + aerobic training, nano-silver + anaerobic training. First, the training groups trained with the aerobic and anaerobic protocol for 10 weeks. Then, intraperitoneal injection of silver nanoparticles was injected 5 times per 10% of the bodyweight of each rat, and 48 hours after the last injection, the rats were anesthetized and sampled. The samples were photographed and studied by hematoxylin-eosin staining with a light microscope.

Results: The results showed that anaerobic exercise was significantly effective in weight loss in rats ($p = 0.045$). Also, oxygen consumption increased in all groups except the group receiving nano-silver compared to the control group ($p = 0.000$). Injection of biological nano-silver also caused inflammation and hyperemia in the lung tissue of untrained rats. However, in the anaerobic training group, inflammation and hyperemia were less than in the aerobic group.

Conclusion: It seems that injection of biologically produced silver nanoparticles causes structural complications in the lung tissue of male Wistar rats. Also, the results of the present study showed that anaerobic pre-conditioning is more beneficial than aerobic in reducing these effects.

Keywords: Aerobic training protocols, Anaerobic training protocols, Silver biologic nanoparticles