

Airway Hyperresponsiveness and Bronchoalveolar Fluid Inflammatory Cells in Obese Asthmatic Male Rats

Keyhanmanesh R¹, Alipour MR¹, Ghobadi H², Ahmadi M¹, Moradi AR², Aslani MR*²

1. Drug Applied Research Center, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

2. Lung Inflammatory Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +984533262140, Fax: +984533262140, E-mail: mraslani105@yahoo.com

Received: Oct 22, 2018

Accepted: Dec 21, 2018

ABSTRACT

Background & objectives: Epidemiological and clinical studies have shown a close relationship between asthma and obesity. The present study examined the effect of obesity on the airway response to methacholine and the number of inflammatory cells in the bronchoalveolar fluid of ovalbumin-sensitized male rats.

Methods: Twenty-four male Wistar rats were divided into 4 groups: normal diet (C+ND), OVA-sensitized with the normal diet (S+ND), high-fat diet (C+HFD) and OVA-sensitized with high-fat diet (S+HFD). All animals were fed for 8 weeks with standard diet or high-fat diet, and then were sensitized with ovalbumin or normal saline for another 4 weeks while receiving the designed regimens. At the end of the study, the number of inflammatory cells in bronchoalveolar fluid (BALF) and tracheal responsiveness to methacholine were examined.

Results: In diet-induced obesity groups, weight and obesity indices increased ($p < 0.05$ to $p < 0.001$). The results also showed that tracheal responsiveness to methacholine in S+HFD group compared to S+ND group, was significantly increased ($p < 0.05$). In addition, the number of inflammatory cells in the BAL, in the S+HFD group was higher than other groups ($p < 0.001$).

Conclusion: the results of this study suggest that the response of the airways to methacholine and the number of inflammatory cells are increased in obese-asthmatic male rats.

Keywords: Asthma; Obesity; Methacholine; Airway Responsiveness; Inflammatory Cells

افزایش پاسخ‌دهی مجاری هوایی و سلول‌های التهابی مایع برونکوآلوئولار در رت‌های نر چاق آسماتیک

رعنا کیهان منش^۱، محمد رضا علیپور^۱، حسن قبادی^۲، مهدی احمدی^۱، علیرضا مرادی^۲، محمد رضا اصلانی^{۲*}

۱. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های التهابی ریه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۲۶۲۱۴۰ فاکس: ۰۴۵۳۳۲۶۲۱۴۰ پست الکترونیک: mraslani105@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات اپیدمیولوژیک و کلینیکال ارتباط تنگاتنگی بین آسم و چاقی نشان داده‌اند. مطالعه حاضر اثر چاقی بر پاسخ‌دهی مجاری هوایی نسبت به ماکولین و تعداد سلول‌های التهابی در مایع برونکوآلوئولار رت‌های نر حساس شده با اوبومین را بررسی کرده است.

روش کار: ۲۴ رت نر از نژاد ویستار به ۴ گروه شامل رژیم غذایی معمولی (C+ND)، حساس شده با رژیم معمولی (S+ND)، رژیم پرچرب (C+HFD)، و حساس شده با رژیم پرچرب (S+HFD) تقسیم شدند. تمام حیوانات به مدت ۸ هفته با غذای معمولی یا با رژیم پرچرب تغذیه شده، سپس در حالی که رژیم طراحی شده را دریافت می‌کردند با اوبومین یا نرمال سالیین برای ۴ هفته دیگر حساسیت زایی صورت گرفت. در انتهای مطالعه مایع برونکوآلوئولار جهت بررسی سلول‌های التهابی و تراشه جهت بررسی پاسخ‌دهی به ماکولین مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه‌های چاق القا شده با رژیم، وزن و شاخص‌های چاقی افزایش داشتند ($p < 0.05$ تا $p < 0.001$). نتایج همچنین نشان دادند که در گروه S+HFD در مقایسه با S+ND، پاسخ‌دهی تراشه نسبت به ماکولین افزایش قابل توجهی داشت ($p < 0.05$). علاوه بر این، سلول‌های التهابی در مایع برونکوآلوئولار در گروه S+HFD در مقایسه با سایر گروه‌ها زیادتر بود ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: در شرایط چاقی توام با مدل آسماتیک در رت‌های نر پاسخ‌دهی مجاری هوایی نسبت به ماکولین و همچنین تعداد سلول‌های التهابی زیاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آسم، چاقی، ماکولین، پاسخ‌دهی مجاری هوایی، سلول‌های التهابی

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۳۰

مقدمه

آسم یک بیماری التهابی مزمن مجاری تنفسی است که در ایجاد آن سلول‌ها و اجزای سلولی زیادی نقش دارند. التهاب مزمن همراه با افزایش پاسخ‌دهی مجاری تنفسی^۱ است که معمولاً خودبخود یا توسط

درمان قابل برگشت می‌باشد [۱]. در ایجاد و بروز آسم عمدتاً دو دسته عوامل دخیل هستند که شامل عوامل مربوط به میزبان (عوامل ژنتیکی، چاقی و جنسیت) و عوامل مربوط به محیط (آلرژن‌ها، عوامل عفونی، مصرف سیگار، حساسیت‌های شغلی و آلودگی هوای استنشاقی) می‌باشند [۲].

¹ Bronchial Hyper Responsiveness= BHR

سلول‌های التهابی که در پاتوژنز بیماری آسم نقش دارند عبارتند از ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، لنفوسیت‌های T، سلول‌های دندریتی، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها [۴،۳]. این سلول‌ها با آزاد کردن انواع مدیاتورها^۱ نظیر کیموکین‌ها، لکوترین‌ها، سایتوکاین‌ها، هیستامین و پروستاگلندین‌ها [۵-۷] منجر به بروز علائم آسم می‌شوند.

آسم در واقع بیماری است که با افزایش غیرطبیعی پاسخ‌دهی مجاری هوایی به گروه وسیعی از محرک‌های استنشاقی فیزیکی، شیمیایی، فارماکولوژیک و ایمونولوژیک مشخص می‌گردد. افزایش پاسخ‌دهی مجاری تنفسی به حالتی اطلاق می‌شود که یک محرک ضعیف که در افراد سالم پاسخی ایجاد نمی‌کند، باعث افزایش پاسخ مجاری هوایی در افراد آسمی می‌گردد. این پاسخ ممکن است شامل سرفه، افزایش در ترشح موکوس یا تنفس کوتاه باشد، اما پاسخ اساسی در آسم تنگی حاد مجاری تنفسی است [۹،۸].

از طرف دیگر چاقی و بیماری‌های مرتبط با چاقی یکی از چالش‌های بهداشتی سلامتی است. اضافه وزن در بالغین به شاخص توده بدنی^۲ بین ۲۵ تا ۳۰ کیلوگرم به ازای متر مربع و چاقی به BMI بیش از ۳۰ kg/m² اطلاق می‌شود [۱۰]. بافت چربی با انواع مدیاتورها موسوم به آدیپوسایتوکاین‌ها^۳ به عنوان یک اندام آندوکرینی و التهابی در نظر گرفته می‌شود [۱۱]. در مورد ارتباط بین چاقی با دیابت، هیپرتانسیون و بیماری‌های قلبی مطالعات زیادی انجام گرفته اما در مورد ارتباط چاقی با بیماری آسم مطالعات کمی وجود دارد [۱۰]. تعدادی از مطالعات اپیدمیولوژیک و حیوانی ارتباط بین شدت آسم و چاقی را نشان داده [۱۲-۱۴]، اما تعدادی از عدم وجود ارتباط بین چاقی و آسم حکایت دارند [۱۵،۱۰]. از طرف دیگر، مدارک برای نشان دادن اثر چاقی بر روی پاسخ‌دهی مجاری

هوایی در شرایط آسمی کمتر ثابت شده است. در بعضی از مطالعات انسانی یک ارتباط بین افزایش پاسخ‌دهی مجاری تنفسی با افزایش BMI گزارش شده [۱۳] ولی در مطالعات دیگر هیچ‌گونه ارتباطی بین BMI با BHR گزارش نشده است [۱۶،۱۷]. اگرچه افزایش پاسخ‌دهی مجاری تنفسی ویژگی اصلی بیماری آسم است، و از طرف دیگر در شرایط چاقی چند مطالعه افزایش پاسخ‌دهی مجاری تنفسی را نسبت به چند محرک نشان داده اند، در این مطالعه محققین بر آن شدند که پاسخ‌دهی تراشه جدا شده رت‌های نر در شرایط چاقی توام با آسم نسبت به عوامل محرک و همچنین تعداد سلول‌های التهابی در مایع برونکوآلوئولار در مقایسه با سایر گروه‌ها را بررسی نمایند.

روش کار

در یک مطالعه حیوانی مداخله‌ای تصادفی شاهددار، ۲۴ رت نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۵۰ گرم طبق گروه‌های زیر (۶ رت در هر گروه) مورد بررسی قرار گرفتند: گروه کنترل (C+ND): در این گروه هیچ مداخله‌ای انجام نگرفت، گروه چاق (C+HFD): در این گروه حیوانات به مدت ۳ ماه رژیم غذایی پرچرب دریافت کردند، گروه آسمی (S+ND): در این گروه حیوانات توسط اوالبومین آسمی شدند، و گروه چاقی توام با آسم (S+HFD): در این گروه، حیوانات به مدت ۳ ماه رژیم پرچرب دریافت کرده و در طی آن آسمی شدند. نحوه نگهداری حیوانات در حیوانخانه برای تمامی حیوانات یکسان بود.

جهت القای چاقی به مدت ۳ ماه حیوانات رژیم غذایی پرچرب دریافت کردند. بر اساس این روش انرژی دریافتی از مواد غذایی چربی در حدود ۴۵ درصد بود. محتویات غذایی این گروه حاوی ۲۴ درصد پروتئین، ۴۲ درصد کربوهیدرات و ۲۴ درصد چربی بوده و ویتامین‌ها و سایر املاح بر اساس دستورالعمل

¹ Mediator

² Body Mass Index=BMI

³ Adipocytokines

حداکثر ارتفاع حاصله در نتیجه غلظت‌های افزایشنده آن بعنوان ۱۰۰ درصد پاسخ انقباضی در نظر گرفته شده سپس تغییر ارتفاع به ازای افزودن هر یک از غلظت‌های متاکولین با استفاده از تناسب درصد پاسخ انقباضی بوسیله مقایسه آنها با ۱۰۰ درصد انقباض حاصله بدست می‌آمد. در پایان هر آزمایش پاسخ انقباضی (روی محور Yها) در مقابل لگاریتم غلظت متاکولین (روی محور Xها) رسم شده و به این صورت برای هر آزمایش منحنی لگاریتم غلظت- پاسخ بدست آمده و به کمک منحنی حاصل، غلظتی از متاکولین که موجب ۵۰ درصد حداکثر انقباض در هر آزمایش می‌گردد بعنوان EC_{50}^1 تعیین شد [۱۹].

اطلاعات پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین (EC_{50})، حداکثر پاسخ به متاکولین، تعداد کل گلبول‌های سفید مایع لواژ، و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید مورد مطالعه بصورت میانگین \pm خطای معیار ترسیم و بیان شدند. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS-16 و برای رسم نمودارها از نرم افزار SIGMA PLOT استفاده شد. بر اساس تست کولموگروف- اسمیرنوف این اطلاعات دارای توزیع نرمال بودند. اطلاعات ۴ گروه از حیوانات با استفاده از تست آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و استفاده از آزمون تکمیلی توکی مقایسه شد. معنی‌دار بودن نتایج با $p < 0.05$ مورد پذیرش قرار گرفت. کد اخلاق با شماره 92/4-6/9 در دانشگاه علوم پزشکی تبریز ثبت گردید.

یافته‌ها

مقایسه تغییرات وزن و ایندکس‌های چاقی

وزن اولیه، وزن نهایی و ایندکس‌های چاقی در رت‌ها (درصد تغییرات وزن، ایندکس^۲ Lee و درصد چربی بدن) بعد از سه ماه استفاده از رژیم پرچرب در

اضافه شد [۱۸]. حیوانات بطور هفتگی راس ساعت مشخص توزین شده و وزن نهایی و ایندکس‌های چاقی در رت‌ها تعیین شد.

به منظور القای آسم تجربی 1 mg اوالبومین (Sigma, Chemical Ltd, UK) به همراه ۲۰۰ mg هیدروکسید آلومینیوم (Sigma, Chemical Ltd, UK) بصورت داخل صفاقی در روزهای اول و هشتم تزریق شد. سپس حیوانات از روز چهاردهم به مدت ۱۸ روز از طریق بینی در معرض آئروسول اوالبومین ۴ درصد قرار گرفتند. در حیوانات واقع در گروه S+HFD، در انتهای ماه دوم القای چاقی، آسمی شدن حیوانات طبق پروتکل فوق شروع گردید. در گروه شاهد نرمال سالیین بصورت مشابه تجویز شد [۲۰، ۱۹].

جدا کردن بافت تراشه: بافت تراشه در پایان کار برای بررسی میزان پاسخ‌دهی از بدن جدا شده و طبق پروتکل زیر عمل شد: پس از اعمال بیهوشی، قفسه سینه حیوانات باز شده و سپس تراشه را به قطعات تراشه که حاوی ۶-۵ حلقه غضروفی است، تقسیم و بریده شد. قطعات تراشه آماده شده داخل محفظه مخصوص حمام بافت نصب شد. کابل ترانس دیوسر به سیستم پاورلب (ML-750, 4-channel recorder, March-Hugstetten, Germany) و کامپیوتر که از قبل تنظیم شده است اتصال یافت. سپس یک ساعت به بافت استراحت داده شد تا با شرایط محیط تطبیق یابد. در طول مدت استراحت هر ۱۵ دقیقه محلول کربس داخل حمام بافت، با محلول تازه تعویض شده تا بافت شسته شود. پس از نصب قطعه تراشه و یک ساعت استراحت، غلظت‌های افزایشنده متاکولین (Sigma, Chemical Ltd, UK) در ظرف حمام بافت ۲۰ میلی لیتری ایجاد می‌گردید. بین هر غلظت ۲ دقیقه به بافت استراحت داده شد تا منقبض گردد. نیروی انقباضی القاشده در قطعه تراشه ناشی از متاکولین توسط دستگاه ثبت داده‌ها (سیستم پاورلب) در کامپیوتر ثبت، ذخیره و تجزیه و تحلیل می‌گردید. برای اندازه‌گیری پاسخ تراشه به متاکولین ابتدا

¹ The Effective Concentration of Methacholine Generating 50% of Peak Response

² Lee Index

پرچرب (C+HFD) و گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، وزن نهایی و ایندکس‌های چاقی در مقایسه با گروه‌های با رژیم معمولی افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$ تا $p < 0.001$).

گروه‌های چاق و مداخله حساس زایی با اوبومین در ماه آخر القای چاقی در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود بعد از سه ماه القای چاقی با رژیم پرچرب در گروه شاهد توام با رژیم

جدول ۱. تغییرات وزن و ایندکس‌های چاقی در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	C+ND	S+ND	C+HFD	S+HFD
وزن اولیه (gr)	156/50 ± 7	153/17 ± 10/18	154/5 ± 5/12	152/5 ± 9/64
وزن نهایی (gr)	315/17 ± 22/29	312/17 ± 22/1	350/67 ± 12/92	336/83 ± 35/84
درصد تغییرات وزن (%)	101/2 ± 5/67	104/2 ± 8/14	127/15 ± 10/76	136/52 ± 17/25
ایندکس Lee (mg/mm)	303/16 ± 7/62	306/09 ± 3/19	319/14 ± 3/16	320/37 ± 3/68
درصد چربی بدن (%)	16/32 ± 5/57	18/45 ± 2/32	27/98 ± 2/3	28/88 ± 2/68

میانگین ± خطای معیار تغییرات وزن و ایندکس‌های چاقی در جوندگان در گروه‌های شاهد توام با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = 6

مقایسه گروه‌ها با همدیگر با استفاده از تست آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی انجام گردیده است

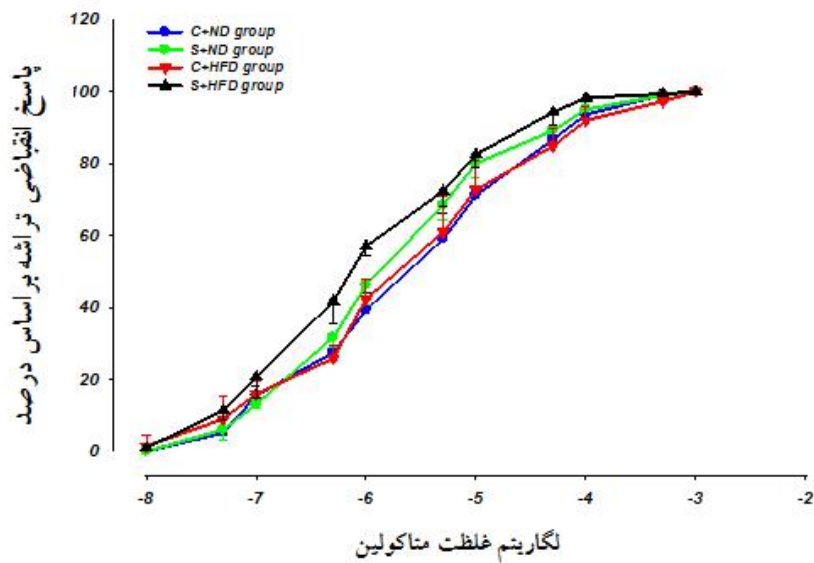
مقایسه سایر گروه‌ها با گروه C+ND: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

مقایسه گروه S+ND با C+HFD و S+HFD: + $P < 0.05$ ++ $P < 0.01$ +++ $P < 0.001$

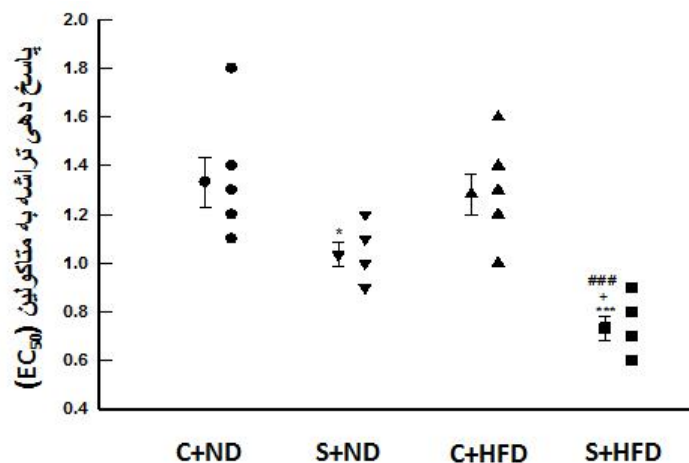
مقایسه پاسخ‌دهی زنجیره تراشه به متاکولین

منحنی غلظت- پاسخ متاکولین در گروه‌های حساس شده با اوبومین انحراف به چپ نسبت به منحنی غلظت- پاسخ متاکولین در گروه‌های غیر حساس شده را نشان داد. البته میزان انحراف به چپ منحنی غلظت- پاسخ متاکولین در گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب نسبت به گروه حساس شده توام با رژیم معمولی بیشتر بود (نمودار ۱). پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین در گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب بیشتر از گروه‌های دیگر بود. همچنین پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین در گروه حساس شده توام با رژیم معمولی نیز نسبت به گروه شاهد توام با رژیم معمولی بیشتر بود. میانگین

پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین (EC_{50}) در گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب (0.73 ± 0.12) بطور معنی‌داری از سایر گروه‌ها کمتر بود ($p < 0.05$) تا ($p < 0.001$) (نمودار ۲). میانگین حداکثر پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین در گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب ($37/45 \pm 2/23$) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود ($p < 0.01$ تا $p < 0.001$). همچنین میانگین حداکثر پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین در گروه حساس شده توام با رژیم معمولی ($29/52 \pm 4/48$) نسبت به گروه‌های غیر حساس بیشتر بود (برای هر دو گروه $p < 0.01$) (نمودار ۳).



نمودار ۱. منحنی لگاریتمی غلظت - پاسخ تجمعی متاکولین ایجاد کننده انقباض در قطعات تراشه حیوانات گروه شاهد با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = ۶. سمبلها در منحنی نشاندهنده میانگین پاسخ ۶ قطعه تراشه و بارها معرف خطای معیار است.



نمودار ۲. داده‌های خام و میانگین \pm خطای معیار (سمبل‌های بزرگ همراه با بار) پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین (EC_{50}) در حیوانات گروه‌های شاهد توام با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = ۶

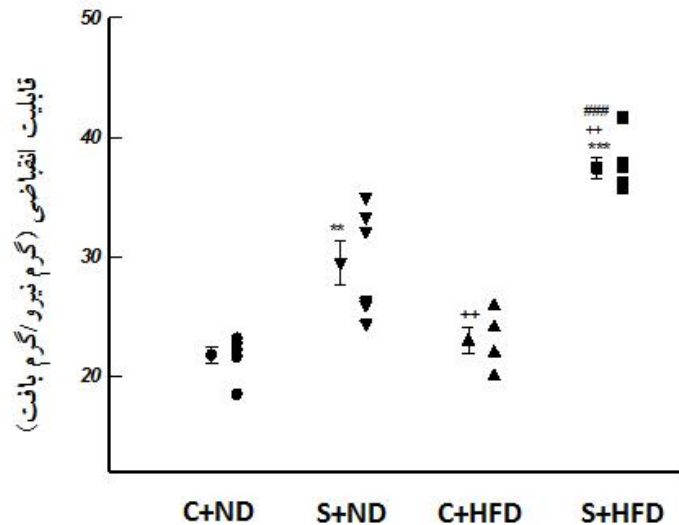
EC_{50} : غلظت یا دوزی از متاکولین که ۵۰ درصد حداکثر پاسخ ممکن را ایجاد میکند.

مقایسه گروه‌ها با همدیگر با استفاده از تست آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی انجام گرفته است

مقایسه سایر گروه‌ها با C+ND: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

مقایسه گروه S+ND با C+HFD و S+HFD: + $P < 0.05$

مقایسه گروه C+HFD با گروه S+HFD: ### $P < 0.001$



نمودار ۳. داده‌های خام و میانگین \pm خطای معیار (سمبل‌های بزرگ همراه با بار) حداکثر پاسخدهی تراشه به متاکولین (گرم نیرو/گرم بافت) در حیوانات گروه‌های شاهد توام با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = ۶
گرم نیرو/گرم بافت: مقدار نیروی انقباضی ایجاد شده توسط متاکولین بر حسب گرم به مقدار وزن تراشه بر حسب گرم
مقایسه گروه‌ها با همدیگر با استفاده از تست آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی انجام گردیده است
مقایسه سایر گروه‌ها با C+ND: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
مقایسه گروه S+ND با C+HFD و S+HFD: ++ $P < 0.01$
مقایسه گروه C+HFD با S+HFD: ### $P < 0.001$

تعداد گلبول‌های سفید و انواع آن

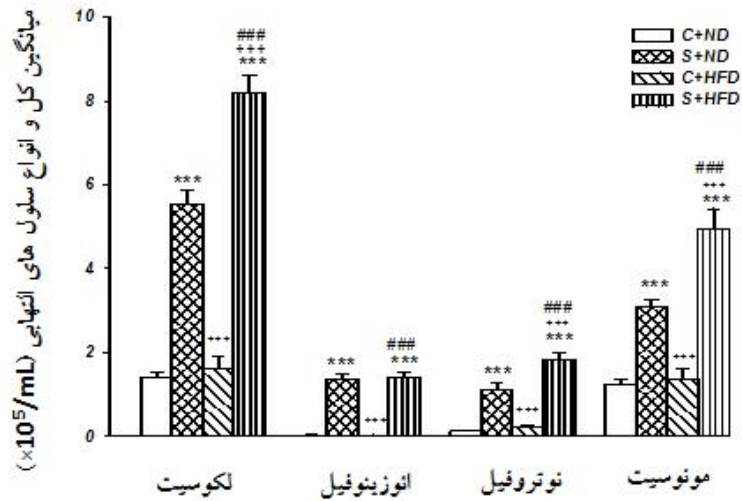
میانگین تعداد گلبول‌های سفید در هر میلی لیتر مایع لاواژ گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب $(8/2 \times 10^5 \pm 0.1/1)$ نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$) (نمودار ۴). همچنین میانگین تعداد گلبول‌های سفید در هر میلی لیتر مایع لاواژ در گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی $(5/54 \times 10^5 \pm 0.1/35)$ نسبت به گروه‌های شاهد حساس‌نشده افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$).

از نظر درصد انواع گلبول‌های سفید اختلافات موجود بدین ترتیب بود که در مایع لاواژ، میانگین درصد ائوزینوفیل گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی $(24/57 \pm 2/87)$ به طور معنی‌داری از میانگین ائوزینوفیل سایر گروه‌ها بیشتر بود ($p < 0.001$). همچنین میانگین درصد ائوزینوفیل در گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب $(17/33 \pm 1/63)$ نسبت به گروه‌های شاهد حساس‌نشده بیشتر بود

($p < 0.001$). میانگین درصد نوتروفیل در گروه‌های حساس (توام با رژیم معمولی و توام با رژیم پرچرب) نسبت به گروه‌های شاهد حساس‌نشده بیشتر بود ($p < 0.001$)، ولی با وجود اینکه میانگین درصد نوتروفیل در گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب $(22/50 \pm 2/25)$ بیشتر از گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی بود $(20/14 \pm 2/14)$ ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. علاوه بر این میانگین درصد نوتروفیل‌ها در گروه شاهد با رژیم پرچرب $(14/16 \pm 1/60)$ از گروه شاهد با رژیم معمولی $(9/66 \pm 1/03)$ بیشتر بود ($p < 0.01$). میانگین درصد منونوکلئرها در گروه‌های شاهد حساس‌نشده در مقایسه با گروه‌های حساس‌شده بطور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.001$). همچنین میانگین درصد منونوکلئرها در گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب $(60/16 \pm 2/92)$ در مقایسه با گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی $(55/57 \pm 2/87)$ بطور معنی‌دار ($p < 0.01$) و نیز میانگین درصد

منونوکلترها در گروه شاهد توام با رژیم معمولی (۸۴/۳۳±۲/۸۷) بیشتر بود ($p < 0.05$) (نمودار ۴ و ۵).

از گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (۸۸/۵۵±۱/۰۴) منونوکلترها در گروه شاهد توام با رژیم معمولی (۸۴/۳۳±۲/۸۷) بیشتر بود ($p < 0.05$) (نمودار ۴ و ۵).



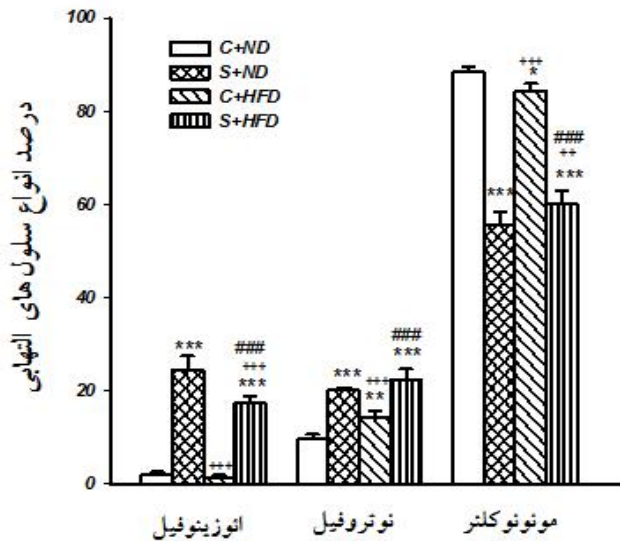
نمودار ۴. میانگین \pm خطای معیار تعداد لکوسیت‌ها و انواع آن در هر میلی لیتر مایع لاوز در گروه‌های شاهد توام با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = ۶

مقایسه گروه‌ها با همدیگر با استفاده از تست آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی انجام گرفته است.

مقایسه سایر گروه‌ها با C+ND: $***: P < 0.001$

مقایسه گروه S+ND با C+HFD و S+HFD: $+++; P < 0.001$

مقایسه گروه C+HFD با گروه S+HFD: $###; P < 0.001$



نمودار ۵. میانگین \pm خطای معیار تغییرات درصد تعداد لکوسیت‌ها در گروه‌های شاهد توام با رژیم معمولی (C+ND)، گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی (S+ND)، گروه شاهد توام با رژیم پرچرب (C+HFD) و گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب (S+HFD)، تعداد هر گروه = ۶

مقایسه گروه‌ها با همدیگر با استفاده از تست آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی انجام گرفته است.

مقایسه سایر گروه‌ها با C+ND: $***: P < 0.001$ $** : P < 0.01$ $* : P < 0.05$

مقایسه گروه S+ND با C+HFD و S+HFD: $+++; P < 0.001$ $++; P < 0.01$

مقایسه گروه C+HFD با گروه S+HFD: $###; P < 0.001$

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رژیم پرچرب باعث افزایش پاسخدهی تراشه به متاکولین، افزایش حداکثر پاسخدهی و افزایش التهاب در نمونه مایع لاواژ گردید.

اساساً چاقی در انسان در نتیجه مصرف رژیم غذایی پرچرب و مصرف انرژی کم ناشی می‌شود. در این مطالعه از مدل القای چاقی با رژیم پرچرب به مدت ۱۲ هفته استفاده شده و نتایج مطالعه نشان داد که این مدل باعث افزایش معنی‌دار وزن در گروه‌های تغذیه‌شونده با رژیم پرچرب شد که نتایج این مطالعه مشابه با نتایج مطالعات قبلی استفاده کننده از چنین مدل القای چاقی بود [۲۱، ۱۸]. همچنین برای تعیین چاقی در مدل‌های القای چاقی در رت‌ها از ایندکس‌های چاقی نظیر درصد تغییرات وزن، ایندکس Lee و درصد چربی بدنی استفاده می‌شود که در مطالعه حاضر بعد از القای چاقی از طریق رژیم پرچرب، شاخص‌های مذکور در گروه‌های دریافت کننده رژیم پرچرب نسبت به گروه‌های دریافت کننده رژیم معمولی تفاوت معنی‌داری داشت.

آسم به طور ویژه با انسداد قابل برگشت مجرای هوایی، افزایش پاسخدهی و التهاب مزمن مجاری هوایی مشخص می‌شود [۲۲]. افزایش پاسخدهی مجاری هوایی عبارت است از افزایش قابلیت تنگ شدن (انسداد) مجاری هوایی در اثر مواجهه با یک محرک منقبض کننده [۲۳]. افزایش پاسخدهی مجاری یک خصوصیت مشترک موش‌های چاق بوده و اثر چاقی در موش‌ها بیشتر از انسان‌ها می‌باشد. صرف نظر از شیوه القای چاقی در موش‌ها، پاسخ افزایش یافته مجاری نسبت به متاکولین وریدی در آنها مشهود است [۲۴، ۲۵]. در مطالعات بررسی پاسخدهی مجاری در موش‌های چاق، از $PEEP^1$ (فشار مثبت انتهایی بازدمی) و از متاکولین وریدی استفاده

می‌گردد. تصور می‌شود که هر دو عامل فوق قادر به تنگ کردن مجاری تنفسی در مقایسه با مطالعات انسانی می‌باشند [۲۶]. همچنین نشان داده شده است که حیوانات دست‌کاری شده ژنتیکی برای القای چاقی، دارای حجم‌های ریوی پایین تر می‌باشند که ممکن است بر remodeling مجاری انتهایی تأثیرگذار باشد [۲۶]. بر این اساس در مطالعه حاضر از روش مستقیم بررسی تراشه با استفاده از قطعات تراشه و افزودن متاکولین به محیط حمام بافتی استفاده گردید. نتایج این مطالعه مشخص کرد که در گروه‌های حساس شده با اولبومین (مدل القای آسم در حیوانات) افزایش چشمگیری در پاسخدهی تراشه به متاکولین و میزان contractility (پاسخ انقباضی تراشه به غلظت 10^{-6} متاکولین) نسبت به گروه‌های شاهد وجود دارد. جالب توجه اینکه در گروه حساس چاق القاشده با رژیم پرچرب افزایش پاسخدهی مجاری و همچنین حداکثر قدرت انقباضی تراشه نسبت به گروه حساس شده توام با رژیم معمولی بطور معنی‌داری بیشتر بود. نقطه متمایز مطالعه حاضر با مطالعات قبلی، تفاوت پاسخدهی تراشه در گروه‌های شاهد توام با رژیم پرچرب بود بطوری که در مطالعات انجام شده با حیوانات با دست‌کاری ژنتیکی افزایش پاسخدهی ذاتی تراشه مشاهده شده بود که در مطالعه حاضر چنین افزایش پاسخدهی مشاهده نگردید. شاید دلیل این تفاوت در مقایسه با مطالعات قبلی، در روش مورد استفاده در مطالعه حاضر یعنی بررسی مستقیم تراشه و همچنین عدم استفاده از متاکولین وریدی باشد.

در مطالعه حاضر، افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید، افزایش ائوزینوفیلی و نوتروفیلی در مایع لاواژ گروه‌های حساس شده (توام با رژیم معمولی و توام با رژیم پرچرب) مشاهده شد. نتایج فوق موید حساس شدن (القائه آسم در مدل حیوانی) حیوانات گروه حساس شده است [۲۷-۲۹]. جالب توجه اینکه تعداد کل گلبول‌های سفید مایع لاواژ در گروه حساس شده توام

¹ Positive End-Expiratory Pressure

با توجه به اینکه نتایج مطالعه فعلی نشان دادند که در شرایط چاقی توام با آسم پاسخ‌دهی مجاری هوایی و همچنین تعداد سلول‌های التهابی در مایع برونکوآلوئولار افزایش داشت، برای نشان‌دادن عوامل تاثیرگذار در این تغییرات بهتر است مسیرهای درون سلولی مورد ارزیابی قرار گیرند. مطالعات قبلی نشان داده اند که آدیپوسایتوکاین‌ها از قبیل ویسفاتین با تغییر مسیر فاکتورهای رونویسی و مولکول‌های درون سلولی قادر هستند در پاتوژنز بیماری آسم در شرایط چاقی تاثیرگذار باشند [۳۴، ۱۹]. لذا به نظر می‌رسد که برای توضیح مکانیسم‌های درگیر در این شرایط، مطالعه سایر آدیپوسایتوکاین‌ها تحت شرایط چاقی توام با آسم ضروری باشد.

نتیجه گیری

القای آسم با استفاده از روش تجربی موجب افزایش پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین، افزایش حداکثر پاسخ به متاکولین، و افزایش التهاب ریوی شد. از طرف دیگر القای چاقی از طریق رژیم پرچرب همراه با القای آسم باعث بدتر شدن پاسخ‌دهی تراشه به متاکولین، حداکثر پاسخ به متاکولین و التهاب ریوی گردید.

تشکر و قدردانی

در نهایت از کلیه همکاران محترم که محققین را در انجام مطالعه یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که بودجه این تحقیق را فراهم کردند، قدردانی می‌گردد. نتایج این مقاله قسمتی از نتایج پایان نامه دوره دکتری فیزیولوژی (Ph.D) (به شماره 92/4-6/9) در دانشگاه تبریز می‌باشد.

با رژیم پرچرب از گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی بیشتر بود که نشان از افزایش التهاب در مجاری در گروه دریافت کننده رژیم پرچرب بود. همچنین مقدار سلول‌های ائوزینوفیل در گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب در مقایسه با گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی کمتر بود. در عوض مقدار نوتروفیل در گروه حساس‌شده توام با رژیم پرچرب بیشتر از گروه حساس‌شده توام با رژیم معمولی بود. مشخصه مشترک آسم آلرژیک التهاب مجاری بویژه التهاب ائوزینوفیلیک است، در حالی که التهاب مجاری در چاقی توام با آسم بیشتر وضعیت غیر ائوزینوفیلیک می‌باشد [۳۰]. مطالعات انجام شده بر نمونه خلط افراد آسمی و همچنین نمونه مایع لاواژ موش‌های حساس‌شده چاق، نشان داده اند که درصد ائوزینوفیل‌های مجاری با BMI ارتباط معکوس دارد [۳۱]. با این وجود افزایش پاسخ‌دهی مجاری هوایی نسبت به آلرژن‌ها در موش‌های حساس‌شده چاق بیشتر است. دلیل احتمالی برای افزایش پاسخ‌دهی با وجود کاهش درصد ائوزینوفیل‌ها با مطالعات هیستولوژیک انجام شده در موش‌های حساس‌شده چاق، عبارت از این است که تجمع ائوزینوفیل‌ها در نواحی اطراف مجاری برونش (در بافت اپی تلیال) بیشتر از نمونه غیرچاق بوده و این احتمال مطرح شده است که تاخیر حرکت ائوزینوفیل‌ها از نواحی مذکور به مجاری هوایی شاید عامل احتمالی در افزایش پاسخ‌دهی مجاری باشد [۳۲، ۱۹]. نقطه قابل توجه این است که در مطالعات انسانی عمدتاً ارتباطی بین تعداد ائوزینوفیل‌ها با BMI مشاهده نشده است [۳۳].

References

- 1- Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev.* 2011 Jul; 242(1): 31-50.
- 2- Ammit AJ, Lazaar AL, Irani C, O'Neill GM, Gordon ND, Amrani Y, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced secretion of RANTES and interleukin-6 from human airway smooth muscle cells: modulation by glucocorticoids and beta-agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Apr; 26(4): 465-74.

- 3- Keyhanmanesh R, Rahbarghazi R, Aslani MR, Hassanpour M, Ahmadi M. Systemic delivery of mesenchymal stem cells conditioned media in repeated doses acts as magic bullets in restoring IFN-gamma/IL-4 balance in asthmatic rats. *Life Sci.* 2018 Nov; 212: 30-36.
- 4- Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J.* 1998 Jul; 12(1): 221-34.
- 5- Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Jun; 38(6): 872-97.
- 6- Reddel HK, Levy ML. The GINA asthma strategy report: what's new for primary care? *NPJ Prim Care Respir Med.* 2015 Jul; 25: 15050.
- 7- Ahmadi M, Rahbarghazi R, Shahbazfar AA, Baghban H, Keyhanmanesh R. Bone marrow mesenchymal stem cells modified pathological changes and immunological responses in ovalbumin-induced asthmatic rats possibly by the modulation of miRNA155 and miRNA133. *Gen Physiol Biophys.* 2018 May; 37(3): 263-74.
- 8- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004 May; 59(5): 469-78.
- 9- Dodge RR, Burrows B. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis.* 1980 Oct; 122(4): 567-75.
- 10- Baruwa P, Sarmah KR. Obesity and asthma. *Lung India.* 2013 Jan; 30(1): 38-46.
- 11- Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci.* 2008 Feb; 114(4): 275-88.
- 12- Akerman MJ, Calacanis CM, Madsen MK. Relationship between asthma severity and obesity. *J Asthma.* 2004 Aug; 41(5): 521-26.
- 13- Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 May; 121(5): 1087-93; quiz 94-95.
- 14- Aslani MR, Keyhanmanesh R, Khamaneh AM, Ebrahimi Saadatlou MA, Mesgari Abbasi M, Alipour MR. Lung Altered Expression of IL-1beta mRNA and Its Signaling Pathway Molecules in Obese-asthmatic Male Wistar Rats. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2016 Jun; 15(3): 183-97.
- 15- Cassol VE, Rizzato TM, Teche SP, Basso DF, Centenaro DF, Maldonado M, et al. Obesity and its relationship with asthma prevalence and severity in adolescents from southern Brazil. *J Asthma.* 2006 Jan-Feb; 43(1): 57-60.
- 16- Schachter LM, Salome CM, Peat JK, Woolcock AJ. Obesity is a risk for asthma and wheeze but not airway hyperresponsiveness. *Thorax.* 2001 Jan; 56(1): 4-8.
- 17- Bustos P, Amigo H, Oyarzun M, Rona RJ. Is there a causal relation between obesity and asthma? Evidence from Chile. *Int J Obes.* 2005 Jul; 29(7): 804-809.
- 18- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007 Apr; 15(4): 798-808.
- 19- Keyhanmanesh R, Alipour MR, Ebrahimi H, Aslani MR. Effects of Diet-Induced Obesity on Tracheal Responsiveness to Methacholine, Tracheal Visfatin Level, and Lung Histological Changes in Ovalbumin-Sensitized Female Wistar Rats. *Inflammation.* 2018 Jun; 41(3): 846-58.
- 20- Ahmadi M, Rahbarghazi R, Soltani S, Aslani MR, Keyhanmanesh R. Contributory Anti-Inflammatory Effects of Mesenchymal Stem Cells, Not Conditioned Media, On Ovalbumin-Induced Asthmatic Changes in Male Rats. *Inflammation.* 2016 Dec; 39(6): 1960-71.
- 21- Akhavanakbari G, Babapour B, Alipour MR, Keyhanmanesh R, Ahmadi M, Aslani MR. Effect of high fat diet on NF- B microRNA146a negative feedback loop in ovalbumin-sensitized rats. *BioFactors.* 2019 Jan; 45(1): 75-84.
- 22- Aslani MR, Keyhanmanesh R, Khamaneh AM, Abbasi MM, Fallahi M, Alipour MR. Tracheal overexpression of IL-1beta, IRAK-1 and TRAF-6 mRNA in obese-asthmatic male Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2016 Apr; 19(4): 350-57.
- 23- Boulet LP, FitzGerald JM, Reddel HK. The revised 2014 GINA strategy report :opportunities for change. *Curr Opin Pulm Med.* 2015 Jan; 21(1): 1-7.
- 24- Shore SA, Rivera-Sanchez YM, Schwartzman IN, Johnston RA. Responses to ozone are increased in obese mice. *J Appl Physiol.* 2003 Sep; 95(3): 938-45.
- 25- Rivera-Sanchez YM, Johnston RA, Schwartzman IN, Valone J, Silverman ES, Fredberg JJ, et al. Differential effects of ozone on airway and tissue mechanics in obese mice. *J Appl Physiol.* 2004 Jun; 96(6): 2200-6.

- 26- Shore SA. Obesity and asthma: lessons from animal models. *J Appl Physiol*. 2007 Feb; 102(2): 516-28.
- 27- Saadat S, Mohammadi M, Fallahi M, Aslani MR. The protective effect of *-hederin*, the active constituent of *Nigella sativa*, on tracheal responsiveness and lung inflammation in ovalbumin-sensitized guinea pigs. *J Physiol Sci*. 2015 Mar; 65(3): 285-92.
- 28- Ahmadi M, Rahbarghazi R, Aslani MR, Shahbazfar AA, Kazemi M, Keyhanmanesh R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jan; 85: 28-40.
- 29- Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol*. 2003 Jul; 3(7): 909-20.
- 30- Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug; 178(3): 218-24.
- 31- van Veen IH, Ten Brinke A, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Airway inflammation in obese and nonobese patients with difficult-to-treat asthma. *Allergy*. 2008 May; 63(5): 570-74.
- 32- Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol*. 2010 Feb; 159(3): 617-25.
- 33- Sutherland ER. Linking obesity and asthma. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Apr; 1311: 31-41.
- 34- Aslani MR, Keyhanmanesh R, Alipour MR. Increased visfatin expression is associated with nuclear factor-kappaB in obese ovalbumin-sensitized male wistar rat tracheae. *Med Princ Pract*. 2017 Apr; 26(4): 351-58.