مقاله پژوهشی

تاثیر تمرین اینتروال فزآینده و مصرف مکمل گیاهی پرسیاوشان (*Adiantum capillus veneris*) بر سطوح HIF-1α و آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه رت‌های نر ویستار

صابر نیازی[1*]، شادمهر میردار[2]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

*مسئول مکاتبات: saber_niazi@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1944585.1338

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱

چکیده

تمرین اینتروال فزآینده با نقص عملکرد ایمنی و آسیب سلولی در بافت ریه همراه است، پرسیاوشان بعنوان مکمل گیاهی در طب سنتی بعنوان یک انتی اکسیدان مورد توجه بوده است. ازین جهت تحقیق حاضر به بررسی تاثیر تمرین اینتروال فزآینده بر سطوح HIF-1α و میزان آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه پرداخته است. برای این منظور ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار سالم (۴ هفته‌ای با میانگین وزنی ۹ ± ۷۲ گرم) به دو گروه تجربی (۱۸ سر) و کنترل (۶ سر) تقسیم شدند، پس از ۶ هفته تمرین اینتروال فزآینده تعداد ۶ سر از رت‌های گروه تجربی به گروه مکمل (۶ سر)، ادامه تمرین (۶ سر) و مکمل تمرین (۶ سر)، انتقال یافته و به مدت سه هفته دیگر در شرایط مورد نظر قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری میزان HIF-1α و آپوپتوز برونش و برونشیول، در پایان هفته نهم نمونه بافت ریه خارج و مورد سنجش قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) استفاده شد. یافته‌ها نشان داد که علی رغم افزایش معنی‌داری در میزان HIF-1α و آپوپتوز برونش و برونشیول ریه ($p \leq ۰/۰۵$) متعاقب فعالیت ورزشی فزآینده مکمل گیاهی پرسیاوش در هر دو گروه مکمل به تنهایی و مکمل تمرین با کاهش معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) در میزان HIF-1α، آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه همراه بود. بنابراین پرسیاوشان می‌تواند منجر به کاهش در میزان HIF-1α و آپوپتوز برونش و برونشیول ریه همراه شود.

کلمات کلیدی: فاکتور القایی هایپوکسی ۱ آلفا، آپوپتوز، تمرین اینتروال فزآینده، پرسیاوشان، ریه.

مقدمه

فعالیت ورزشی شدید، شرایط محیطی خاص نظیر ارتفاع و یا روش‌های بکارگیری تمرین به منظور رسیدن به اوج عملکرد ورزشی توام با آسیب‌های ریز سلولی و گاهی اوقات مرگ سلول نیز بشوند (۱۲). بافت مجاری تنفسی و ریه از جمله اندام‌هایی هستند که تحت تاثیر تمرینات ورزشی شدید در معرض کمبود اکسیژن قرار می‌گیرند و احتمال آسیب آنها وجود دارد. در اکثر تحقیقات آسیب‌های قسمت فوقانی مجاری تنفسی (URTI) را با تمرینات ورزشی شدید مورد بررسی قرار داده‌اند (۱۴)، و به ایجاد آسیب مجاری تنفسی تحتانی (DRTI)، ناشی از فعالیت ورزشی شدید یا مواردی از این دست کمتر توجه شده است. مجاری تنفسی تحتانی تحت شرایط تمرینات شدید صدمه می‌بیند که این آسیب ممکن

است به خاطر تنش ایجاد شده در شرایط کمبود اکسیژن (هایپوکسی) برگردد. در واقع این هایپوکسی برای بافت ریه و مجاری برونش و برونشیول آن می-تواند آسیب‌زا باشد (۱۱). این در حالی است که فاکتور القایی هایپوکسی-۱ آلفا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فاکتور القایی هایپوکسی-۱ (HIF-1) تنظیم‌کننده‌ی کلیدی پاسخ‌های مولکولی به هایپوکسی و بعنوان واسطه در مکانیسم‌های سلولی و فیزیولوژیکی ضروری برای سازگاری با اکسیژن محسوب می‌شود. پروتئین HIF-1α علاوه بر اینکه در تنظیم بیان ژن هدف در آنژیوژنز، خون‌رسانی، متابولیسم انرژی و زنده ماندن سلول ضروری است (۱۶)، می‌تواند تاثیرات مضر پاتوفیزیولوژیکی در بیماری‌های ایسکمی، دیابت، آترواسکلروزیس، بیماری آلزایمر، بیماری مزمن انسدادی ریه، اختلالات التهابی و سرطان بر جای بگذارد (۳). بایستی به این مهم توجه کرد که شرایط هایپوکسی همچنین می‌تواند در طی فعالیت‌های ورزشی که بدن نیاز به اکسیژن بیشتری پیدا می‌کند ایجاد شده و باعث بیان پروتئین HIF-1α شود. با کمبود اکسیژن معمولاً موقعیتی پیش می‌آید که هم می‌تواند منجر به بهبود برخی عوامل فیزیولوژکی شود و هم ممکن است شرایط پاتوفیزیولوژیکی را در پی داشته باشد. اخیراً مشخص شده بافت‌هایی که دچار التهاب مزمن می‌شوند یک ناحیه هایپوکسی را ایجاد می‌کنند. این نقص ممکن است به علت ترکیبی از عوامل نظیر مختل شدن جریان خون به علت تخریب میکروسکوپی عروق(در پی آن اختلال در تحویل اکسیژن)، افزایش فعالیت متابولیکی فاکتورهای ساکن در بافت ملتهب و نفوذ سلول‌های ایمنی و مصرف اکسیژن توسط برخی از گونه‌های باکتریایی باشد (۵، ۱۵). نیازی و همکاران (۱۴۰۰) به بررسی تاثیر شرایط محیطی هایپوکسی و تمرین اینتروال فزآینده هوازیبر سطوح فاکتور القایی هایپوکسی و آپوپتوز برونش و برونشیول پرداختند، آنها نشان دادند که کاهش بار تمرینی (تیپر) با کاهش التهاب بافت ریه و کاهش آپوپتوز برونش و برونشیول را در پی دارد (۱۳).

در مطالعه‌ی دیگری که به بررسی تاثیر ورزش هوازی در کاهش التهاب و رمدلینگ رگ‌ها و پارانشیم ریوی موش‌ها با التهاب و آلرژی مزمن ریوی پرداخته شده بود، التهاب و رمدلینگ رگ‌ها و پارانشیم ریوی با تجزیه و تحلیل کمی ائوزینوفیل و سلول‌های منونوکلئال و کلاژن و ضخامت عضلات صاف ارزیابی شد. آنها به این نتیجه رسیدند که شرایط هوازی باعث کاهش التهاب رگ‌ها و پارانشیم و رمدلینگ ریوی در مدل تجربی موش‌هایی که دچار التهاب آلرژی مزمن ریه بودند شد. این تاثیرات ممکن است به دلیل کاهش پاسخ Th2 باشد و توسط افزایش اینترلوکین-۱۰ و کاهش بیان NF-KB و MCP-1 و IGF-I توضیح داده شود (۷). این دو تحقیق نشان داد که هایپوکسی یک تهدید شدید سلول، بافت و ارگانیسم‌ها برای زنده ماندن است. در شرایط پاتوفیزیولوژیک معمولاً شرایط حذف HIF-1α یک نقش کلیدی در سلول‌های ایمنی T، سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپی-تلیال بازی می‌کند (۱۵) . هایپوکسی ممکن است به علت آسیب حاد ریوی باشد که منجر به ناهنجاری در عملکرد ریه و اختلال در بهبود آن شود. اختلالی که توام با آپوپتوز بافت ریه در شرایط کووید-۱۹ نیز در مطالعات گزارش شده است (۸). اتفاقات اولیه در آسیب حاد ریوی شامل آسیب لایه‌ی پوششی آلوئولار، آپوپتوز سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولار، ادم ریوی، و در مراحل بعدی هایپرپلازی سلول‌های آلوئولار نوع II، آپوپتوز برونش و برونشیول، غالب و گاهی منجر به فیبروزیس میشوند. در طول آسیب حاد ریوی، افزایش عروقی شدن عمدتاً می‌تواند در نتیجه-

ی هایپوکسی، ایسکمی و یا تحریکات التهابی باشد. نقش سیستم HIF در تعدیل نفوذ عروقی شدن ریوی تنها با تعداد انگشت شمار مطالعات، منتشر شده است. در یک مدل ایسکمی هایپوکسی مجدد، تنظیم مثبت سطوح پروتئین HIF-1 با افزایش در سطوح فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و تقویت موانع مخل همراه بود (۱)

در مورد بافت ریه نیز این مهم حائز اهمیت است که سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولار ریه معمولاً به خوبی اکسیژن گیری می‌شوند اما ممکن است در بسیاری از شرایط پاتولوژیکی و بعضی شرایط محیطی مانند ارتفاع در معرض هیپوکسی قرار گیرند (۲).

فعالیت کاسپاز ۳، Apaf-1 واسطه کاسپاز ۹ و رهایی سیتوکروم c در چندین نوع سلول‌های تحت شرایط هایپوکسی گزارش شده است. همچنین مشاهده شده که بیان HIF-1α و HIF-1β به طور معنی‌داری مرتبط با آپوپتوز و فاکتورهای پیش آپوپتوزی مثل کاسپاز ۳، Fas و Fas ligand است (۹).

در واقع آپوپتوز می‌تواند در پاسخ به هایپوکسی ایجاد شود. شدت هایپوکسی تعیین‌کننده‌ی این است که آیا سلول آپوپتوز شود یا با هایپوکسی تطابق پیدا کند و جان سالم به در برد. پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی شامل Bcl-2 و Bcl-xl و پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی Bax، Bad ، Bak و Bid هستند که باعث تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند و هایپوکسی با تاثیر بر روی این پروتئین‌ها سبب ایجاد و یا عدم ایجاد آپوپتوز می‌شود. آپوپتوز ناشی از هایپوکسی می‌تواند از مسیر میتوکندری، در صورت کاهش ATP مشتق از میتوکندری از طریق پروتئین‌های Bak و Bax (موش های مایس فاقد این دو پروتئین هستند و در برابر آپوپتوز ناشی از فقدان اکسیژن مقاومند) و یا از طریق گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) ایجاد شود (٤). سلول‌های اپیتلیال آلوئولار در طول توسعه بلوغ ریه نرمال، پاتولوژی در آسیب حاد ریه و فیبروز ریوی هم تحت آپوپتوز قرار می‌گیرند (۱۰)

در مورد کنترل مرگ سلولی ناشی از ورزش، برخی از مواد غذایی طبیعی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی قرن‌ها به عنوان درمان در سیستم‌های پزشکی سنتی استفاده شده است و هنوز هم به عنوان منبعی از ترکیبات زیست فعال در توسعه داروسازی دارویی استفاده می‌شود (۱۷).

یکی از پرکاربردترین آنتی‌اکسیدان‌های پایه گیاهی، پرسیاوشان با نام علمی *Adiantum capillu- veneris* است که در طب سنتی چینی برای انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود. *Adiantum capillus-veneris* به طور سنتی در سیستم پزشکی یونانی برای درمان بیماری-های التهابی استفاده می‌شود (٦).

تجزیه و تحلیل شیمیایی از ترکیبات *Adiantum capillus-veneris* مجموعه‌ای از تری‌ترپن‌ها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و کاروتنوئیدها را نشان می‌دهد. بر اساس کاربردهای رایج این گیاه در طب سنتی، تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات ضد آپوپتوز و ضد بازسازی عصاره *Adiantum capillus-veneris* در بافت ریه و برونش و برونشیول ریوی رت‌های نر ویستار در پی فعالیت ورزشی شدید انجام شد. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی پاسخ به این سوال بود که آیا استفاده از عصاره *Adiantum capillus-veneris* بعنوان مکمل گیاهی می‌تواند در تعدیل عوارض منفی ناشی از تمرین اینتروال فزآینده مفید واقع شود یا خیر.

مواد و روش‌ها

نمونه آماری این پژوهش شامل ۲٤ سر موش صحرائی ویستار نر (سن٤ هفته‌ای، میانگین وزنی ۹ ± ۷۲ گرم) مرکز انستیتو پاستور آمل بود. که به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه

مازندران انتقال یافت و بصورت تصادفی به دو گروه تجربی (۱۸ سر) و کنترل (٦ سر) تقسیم شدند، پس از ٦ هفته تمرین اینتروال فزآینده تعداد ٦ سر از رت‌های گروه تجربی به گروه مکمل (٦ سر)، ادامه تمرین (٦ سر) و مکمل تمرین (٦ سر)، انتقال یافته و به مدت سه هفته دیگر در شرایط مورد نظز قرار گرفتند. نمونه‌ها سالم و فاقد هرگونه سابقه بیماری بودند. که پس از یک هفته آشنایی با محیط در دمای نگهداری ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٤٥ تا ٥٥ درصد چرخه‌ی روشنایی‌تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری می‌شدند. در طول مدت پژوهش، غذای استاندارد پلت (ساخت شرکت به‌پرور) و آب بطور آزاد در اختیار نمونه‌ها قرار می‌گرفت. نمونه‌های تجربی پس از مرحله آشنا سازی با دویدن بر روی تردمیل جانوری، وارد برنامه تمرین اینتروال شدند. مرحله آشنا سازی شامل چهار روز برنامه تمرینی اینتروال با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر بر دقیقه مطابق الگوی برنامه تمرینی اینتروال فزآینده اجرا شد. برنامه تمرینی اینتروال فزآینده اصلی به صورت ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای انجام شد، به گونه‌ای که سرعت استراحت نصف سرعت دویدن بود و کل تمرین روزانه برای هر رت، ۳۰ دقیقه بطول می-انجامید. تمرین نمونه‌ها چهار جلسه در هفته در مرحله آماده سازی و پنج جلسه در طول اجرای برنامه تمرین اینتروال فزآینده اصلی پژوهش انجام شد. برنامه تمرین اینتروال با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه (VO2max ٦٦ درصد) شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه (Vo2max ۱۸۵ درصد) در پایان هفته ششم پایان یافت. به غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن در نظر گرفته شد (۱۷). جهت تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقی دستگاه تعبیه شد. برای جلوگیری از اثر احتمالی استرس ناشی از شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش، به روش شرطی سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود (۱۸).

پس از پایان مرحله اول پژوهش (تمرین اینتروال فزآینده شش هفته‌ای)، مرحله دوم پژوهش که امقایسه مصرف مکمل گیاهی پرسیاوش و تمرین بود، اجرا شد. این مرحله سه هفته بطول انجامید بگونه ای که ۱۸ سر از نمونه‌های گروه تمرین پس از ٦ هفته تمرین به سه گروه ادامه دهنده تمرین اینتروال فزآینده (٦= n)، مکمل گیاهی پر سیاوش(گروه مکمل) (٦= n)، پرسیاوش و تمرین (مکمل تمرین) (٦= n) تقسیم شدند. در پایان دوره نمونه‌ها کشته و بافت ریه آنها جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه برداری بافت ریه: نمونه‌گیری بافتی از ریه موش‌ها ٤٨ ساعت پس از اتمام دوره پژوهش انجام شد (۱۷). برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن رت) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش (بی‌هوش و بلافاصله بافت ریه آنها خارج شد. بافت‌های ریه با استفاده از ترازوی Sartorius:B1 1500 وزن شد و با استفاده از استوانه مدرج و قانون ارشمیدوس حجم بافت ریه اندازه‌گیری شد. متغیر وابسته پژوهش شامل تغییرات آپوپتوز سلول‌های بافت پوششی و مجاری ریوی و سطح HIF-1α بافت ریه بود که مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین شاخص آپوپتوزی، لوب راست ریه‌ی نمونه‌ها به منظور تثبیت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰درصد قرار داده شد. جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه‌ها، به روش معمول تهیه مقاطع بافتی پارافینی عمل گردید. در این روش پس از ثبوت، با استفاده از دستگاه هیستوکینت مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت لیکا آلمان، مراحل مختلف پاساژ شامل آب‌گیری، شفاف-

سازی و آغشتگی به پارافین انجام گرفت (۲۰). تشخیص ایمونوهیستوشیمیایی سلول‌های آپوپتوز شده جهت تشخیص آپوپتوز بافت پوششی مجاری هوایی (برونش و برونشیال)، هسته این سلول‌ها با استفاده از روش غیر رادیواکتیو نشان‌دار کردن انتهایی در جای خود رنگ شده و شناسایی گردید. در این روش، پس از ثبوت و طی مراحل معمول و استاندارد تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه گردید. سپس مقاطع با استفاده از دو ظرف گزیلول پارافین-زدایی شده و با غلظت‌های نزولی الکل آب‌دهی شدند و در نهایت سه مرتبه با محلول بافر فسفات عاری از نوکلئاز شستشو شدند. جهت از بین بردن پراکسیدازهای درون‌زاد، مقاطع با پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد در متانول به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مقاطع بعد از شستشو با بافر فسفات عاری از نوکلئاز با کمک پروتئیناز K تیمار شدند (۲۰).

کیت آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق کیت تشخیص مرگ سلولی POD ساخت شرکت روژ آلمان (کیت شماره ۹۱۰ ۸۱۷ ٦٨٤ ۱۱) بود که تمامی مراحل آن مطابق با دستورالعمل همراه کیت انجام پذیرفت. برای تعیین شاخص آپوپتوزی در هر مقطع، ۱۰ برونش و برونشیول با بزرگنمایی بالا مورد بررسی قرار گرفت و هسته‌های TUNEL مثبت (هسته¬هایی به رنگ قهوه¬ای تیره و یکنواخت) و TUNEL منفی بافت پوششی هر مجرا شمارش شد. سپس شاخص آپوپتوزی (LI) از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۱):

$$LI= a/(a+b) \times 100$$

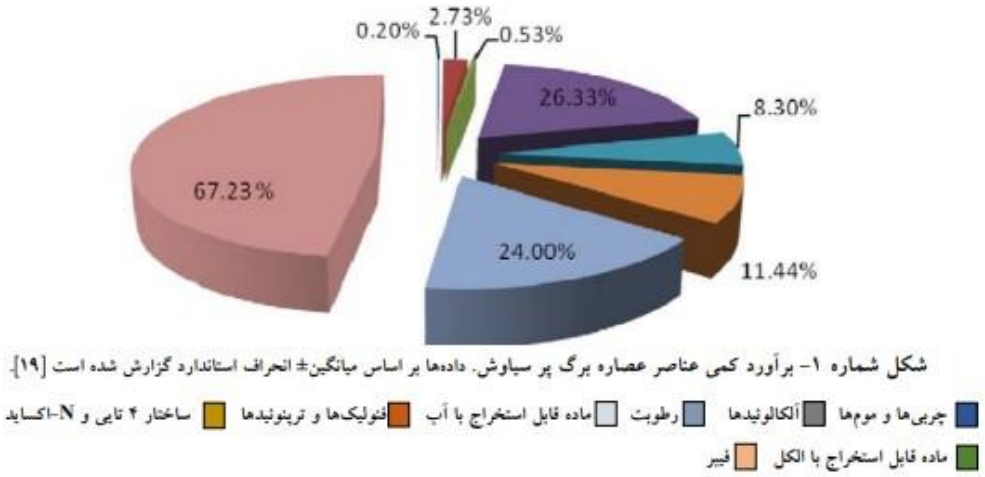
"a"تعداد هسته‌های TUNEL مثبت و "b" تعداد هسته‌های TUNEL منفی در هر ناحیه می‌باشد.

اندازه‌گیری سطح HIF-1α بافت ریه: متغیر وابسته دیگر پژوهش شامل سطوح HIF-1α ریه بود که مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعیین سطوح HIF-1αریه با استفاده از کیت CUSABIO BIOTECH کشور چین با حساسیت ۰/۷۸ pg/ml به روش الایزا توسط دستگاه الایزا ریدر کمپانی Tecan مدل Sun Rise کشور اتریش انجام شد. برای این منظور، ابتدا لوب راست بافت ریه با استفاده از نیتروژن مایع پودر و سپس در محلول بافر هموژنیزه و به مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول به دست آمده برای سنجش شاخص مورد نظر با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد.

تهیه نمونه گیاهی و عصاره پرسیاوش: اندام هوایی گیاه پرسیاوش شامل برگ و ساقه گیاه در آخر فصل بهار(خرداد). در اطراف شهرستان ساری در استان مازندران جمع‌آوری و پس از تایید گیاه توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه مازندران (CJS16111)، نمونه‌های آن را در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزش دانشگاه مازندران نگهداری شد. نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط سایه و تهویه مناسب در دمای آزمایشگاه خشک شدند. در ابتدا جهت تهیه عصاره هیدروالکلی پرسیاوش به روش خیساندن، ۵۵ گرم پودر پرسیاوشان به مدت ۷۲ ساعت در اتانول ۷۱ درصد خیسانده شد و در ظرفی در بسته که درب آن پوشیده از پارافین بود قرار داده شد و در دمای ۲۱ تا ۲۵ درجه سانتیگراد دور از نور نگهداری شد. مخلوط پودر پرسیاوش هر ٦ ساعت یکبار با میله شیشه‌ای هم زده شد و در نهایت پس از عبور از کاغذ صافی (واتمن ٤٢، آلمان) با استفاده از دستگاه روتاری مدل RV8 V-C ساخت شرکت IKA آلمان، اتانول آن در دمای ٦١ درجه سانتیگراد حذف شد (شکل ۱).

روش آماری: جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف معیار از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون آماری کولموگروف اسمیزنوف استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس یک

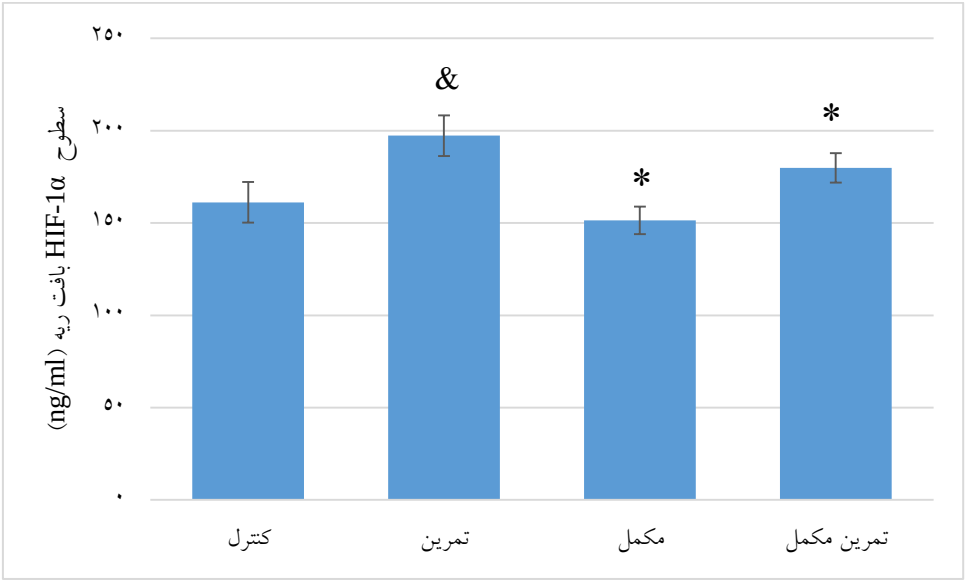
طرفه(ANOVA) و آزمون تعقیبی بانفرونی نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیه محاسبات با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ در سطح معناداری $p \leq ۰/۰۵$ انجام پذیرفت.



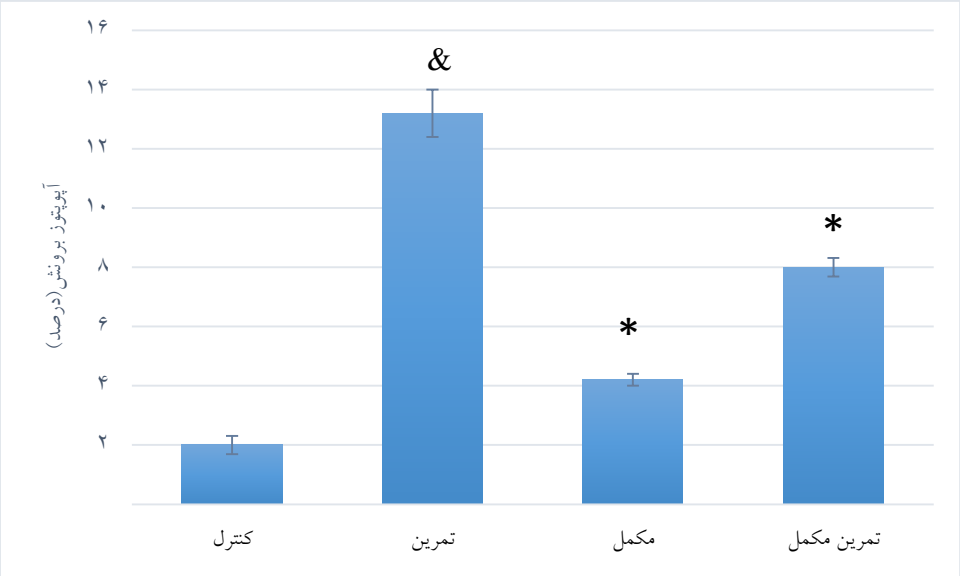
شکل شماره ۱- برآورد کمی عناصر عصاره برگ پر سیاوش. داده‌ها بر اساس میانگین± انحراف استاندارد گزارش شده است [۱۹].

نتایج

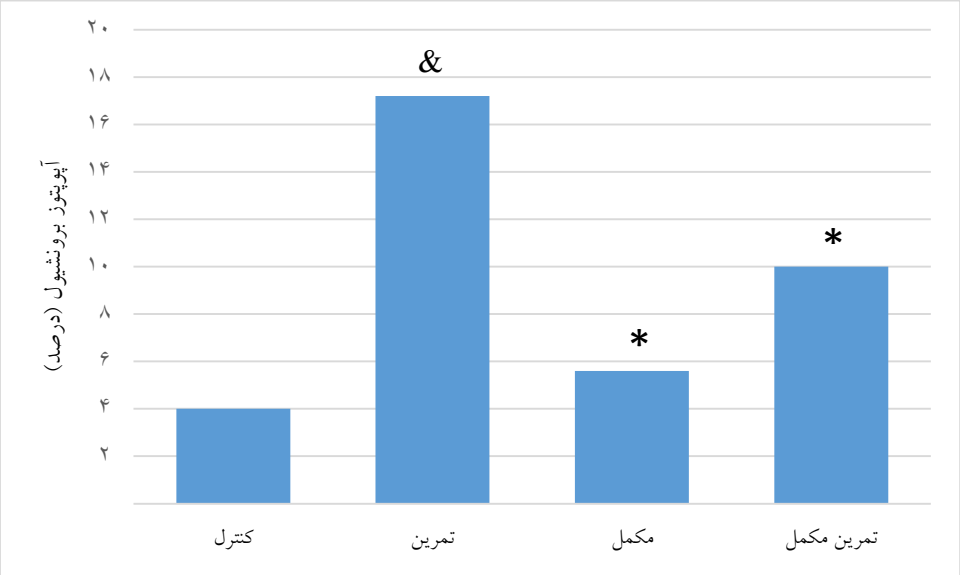
نتایج تحلیل آماری نشان داد سطوح HIF-1α (۲۳/۲۶ درصد) (نمودار ۱) و آپوپتوز برونش (۶۸/۱۸ درصد) (نمودار ۲) و برونشیول (۶۷/۴۴ درصد) (نمودار ۳) بافت ریه رت‌ها در گروه پرسیاوش بطور معنی‌داری نسبت به گروه تمرین کاهش یافته است ($p \leq ۰/۰۵$). در گروه تمرین مکمل، سطوح HIF-1α (۴۱/۸۶ درصد) (نمودار ۱) و آپوپتوز برونش (۳۹/۳۹ درصد) (نمودار۲) و برونشیول (۴۱/۸۶ درصد) (نمودار۳) بافت ریه رت‌ها بطور معنی‌داری نسبت به گروه تمرین کاهش نشان داد ($p \leq ۰/۰۵$).



نمودار ۱- میانگین ± انحراف معیار HIF-1α بافت ریه رت‌ها در گروه‌های پژوهش. علامت * نشان دهنده وجود تفاوت معنی-دار بین گروه‌های تمرین می‌باشد. علامت & نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد



نمودار ۲- میانگین ± انحراف معیار درصد آپوپتوز برونش بافت ریه رت‌ها در گروه‌های پژوهش. علامت * نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تمرین می‌باشد. علامت & نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۳- میانگین ± انحراف معیار درصد آپوپتوز برونشیول بافت ریه رت‌ها در گروه‌های پژوهش. علامت * نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تمرین می‌باشد. علامت & نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

بحث

پژوهش حاضر به بررسی اثر مکمل پرسیاوش متعاقب یک دوره آماده‌سازی ٦ هفته‌ای تمرین اینتروال فزآینده بر میزان آپوپتوز برونش و برونشیول و نیز سطوح HIF-1α بافت ریه رت‌های نر ویستار پرداخت. یافته‌ها نشان‌داد، مصرف مکمل پرسیاوش به میزان ۲۳/۲٦درصد کاهش داد. همچنین آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه، ناشی از تمرین اینتروال فزآینده در دوره آماده‌سازی را به ترتیب میزان ٦۱/٤٤ و ٤۱/۸٦ درصد کاهش داد این کاهش در گروه تمرین مکمل نیز نسبت به گروه تمرین در میزان

سطوح HIF-1α، آپوپتوز برونش و برونشیول به ترتیب ٤١/٨٦، ٣٩/٣٩ و ٤١/٨٦ درصد با کاهش همراه بود. فشارها و استرس فیزیکی ناشی تمرینات آماده‌سازی در ورزشکاران، ممکن است موجب اختلال در هموستاز بدنی و آسیب سیستم ایمنی می-شود، به بیان دیگر ورزشکاران برای بهبود اجرای خود، تحت فشار افزایش بارتمرینی قرار می‌گیرند (۲، ١٤). علاوه بر این، تمرین اینتروال فزآینده می‌تواند شرایط کمبود اکسیژنی یا هایپوکسی را بر دستگاه‌های مختلف بدنی درپی داشته باشد (۵).

مطالعات اولیه به مسیرهای HIF-1α که با کمبود اکسیژن ناشی از تمرین اینتروال فزآینده فعال می‌شود، از طریق افزایش فرایندهایی مانند رگ‌زایی، متابولیسم گلیکولیتیک و ... اما اخیراً مشخص شده است که مسیر HIF-1α یک نقش کلیدی در تنظیم ایمنی و التهاب دارد (۱۵).

به نظر می‌رسد پروتئین HIF-1α می‌تواند عامل ایجاد کننده آسیب‌های مختلف نیز باشد که در شرایط هایپوکسی ناشی از تمرینات ورزشی شدید و طولانی مدت بیان می‌شود (۵).

هی و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که کمبود اکسیژن علت اصلی آسیب ریوی است. در مراحل اولیه کمبود اکسیژن، تغییرات مخربی رخ می‌دهد که منجر به آسیب بافت پوششی آلوئولار، آپوپتوز سلول‌های اپی-تلیال آلوئولار II و ادم ریوی می‌شود (١٦)، بنابراین پروتئین HIF-1α می‌تواند عامل ایجاد کننده آسیب‌های مختلف باشد که طی تمرینات ورزشی شدید و طولانی‌مدت بیان می‌شود. که در پژوهش ما نیز سطوح HIF-1α بافت ریه در گروه‌های تمرین افزایش نشان داد. از این جهت با پژوهش لاندبی و همکاران همسو بود، آنها بیان کردند که سطوح-mRNA HIF 1αو HIF-2α در عضلات اسکلتی افراد تمرین نکرده در پاسخ به ورزش حاد افزایش می‌یابد (۱۷). این افزایش در بیان HIF-1α در عضلات ممکن است جهت سازگاری عضلانی با شرایط بی‌هوازی مهم باشد، در این زمینه راندکویست نشان داد که هایپوکسی ایجاد شده در اثر تمرینات ورزشی، می-تواند یکی از مهم‌ترین عوامل برای سازگاری عضلات با تمرینات ورزشی باشد و پروتئین HIF-1α یکی از مهم‌ترین فاکتورهای این سازگاری‌ها است (۱۸).

از طرفی با مطالعه دی اسمت و همکاران ناهمسو بود آنها نشان دادند که ده دقیقه انسداد شریانی باعث افزایش مایونوکلئوس‌های بیان کننده HIF-1α می‌شود (۱۹).

مطالعات نشان داده‌اند که فاکتور القای هایپوکسی یک الفا بعنوان یک عامل پیش التهابی در فرآیند آپوپتوز می‌تواند نقش داشته باشد. در واقع تطبیق سلول به شرایط کاهش اکسیژن همیشه منجر به تکثیر و بقای سلولی نمی‌شود بلکه در بعضی شرایط سلول می‌میرد. نشان داده شده که کمبود اکسیژن در بعضی موارد سلول‌ها را وادار به آپوپتوز کرده که در آن HIF-1α نقش کلیدی بازی می‌کند (۲۰). در واقع مشخص شده است که در کنار سایر تاثیرات HIF-1α بر روی سلول‌های بدن، هایپوکسی و خود ژن HIF-1α بسته به نوع و شرایط تجربی سلول به عنوان یک فاکتور پیش آپوپتوزی و یا ضد آپوپتوزی عمل می‌کند. به نظر می‌رسد که شرایط پیش آپوپتوزی هنگام کاهش سطح اکسیژن بافتی در فعالیت‌های ورزشی طولانی مدت و شدید رخ دهد که در آن HIF-1α به همراه ژن P53 نقش تعیین کننده داشته باشد (۲۱). مکانیزم آپوپتوز یک نقش کلیدی در آسیب‌های بافت پوششی دارد، بدین صورت که سلول در حال مرگ دفع می‌گردد. یکی از این مکانیزم‌های دفع، شامل شناسایی فسفاتیدیلیسرین غشاء پلاسمایی توسط ماکروفاژها است. همچنین رها سازی TGH-β از ماکرو فاژها در اثر آپوپتوز افزایش می‌یابد. که این کار

برای محدود کردن التهاب بیش از حد است.، چرا که TGH-β بعنوان کاهنده سوپر اکسیدازها عمل می-کند و TGF-β بعنوان یک میانجی در اپی تلیوم راههای هوایی ساخته می‌شود. برای فهمیدن آپوپتوز اپیتلیال برونش و یا برونشیال می‌توان به حضورP85 که یک آنزیم از خانواده PI3K است پی برد که فعال کننده کاسپاز ۳ می‌باشد (۱۰).

در سال‌های اخیر پژوهش در زمینه آپوپتوز توجه بسیاری از پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کرده است. زیرا شواهد نشان می‌دهد که علاوه بر مرگ سلولی به شکل نکروز، مرگ سلولی به صورت آپوپتوز نیز با فعالیت ورزشی شدید رخ می‌دهد. ورزش بیش از حد یا ورزش شدید ممکن است موجب آسیب مکانیکی قابل ملاحظه‌ای شود که با پاسخ‌های التهابی منجر به آپوپتوز و نکروز نمود پیدا می‌کند. ورزش شدید باعث تعدیل بسیاری از عواملی می‌شود که ممکن است آپوپتوز را در انواع بافت‌ها تغییر دهد. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت‌های ورزشی شدید موجب افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئید، غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر در شرایط کمبود اکسیژن ناشی از شدت بالای تمرینی یا شرایط محیطی همچون هیپوکسی که ورزشکاران جهت بهبود عملکرد و سازگاری‌های فیزیولوژیک آن مورد استفاده قرار می‌دهند، می‌شود که این امر عاملی برای ایجاد آسیب‌هایی از جمله کاهش عملکرد سیستم ایمنی همچون آپوپتوز بشمار می‌رود. اگرچه مکانیسم دقیق آپوپتوز هنوز مشخص نیست، اما ممکن است با توجه به نوع سلول و نوع تحریکات متفاوت باشد (۲۲).

پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهند آپوپتوز می‌تواند در پاسخ به کمبود اکسیژن ناشی از تمرینات ورزشی شدید، با وهله‌های استراحتی کوتاه مدت، القا می‌شود. شدت این کمبود اکسیژن تعیین می‌کند که آیا سلول با این شرایط سازوگار می‌شود و زنده می‌ماند و یا دچار مرگ می‌شود (۲۳). در پژوهش حاضر استفاده از مکمل گیاهی پرسیاوش متعاقب یک دوره آماده‌سازی شدید میزان سطوح فاکتور القایی هیپوکسی یک آلفا و عوامل احتمالی زیر دستی آن یعنی آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه رت‌ها را تا حدودی کاهش داد که البته در مقایسه با گروه کنترل همچنان سطوح بالایی را نشان می‌داد، احتمالا کاهش میزان استرس-هایی ناشی از تمرین که پیش‌تر عنوان شد از عوامل کاهشی متغییرهای پژوهش حاضر بوده باشد (۲٤).

کمبود اکسیژن ناشی از فعالیت ورزشی شدید می‌تواند سبب القاء آپوپتوز، از طریق نفوذ پذیری غشای میتوکندری که منجر به آزاد سازی سیتوکروم‌c از فضای بین دو غشا میتوکندری به داخل سیتوزول می-شود گردد. آپوپتوزیس که در شرایط هایپوکسی رخ می‌دهد بیشتر توسط مهار زنجیره الکترون از غشاء داخلی میتوکندری صورت می‌گیرد. کمبود اکسیژن، حمل و نقل پروتون را مهار می‌کند و در نتیجه باعث کاهش پتانسیل غشاء می‌شود. کاهش ATP بدست آمده از میتوکندری، سبب فعال شدن پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مثل BAX,BAD می‌شود و در نهایت منجر به انتشار سیتوکروم C به داخل سیتوزول می‌گردد (۲۵).

از این روی سلول‌های فاقد پروتئین‌های پیش آپوپتوزی (BAX، BAD) نسبت به آپوپتوز ناشی از فقدان اکسیژن مقاوم هستند (۲٦). نتایج نشان می‌دهد که مسیرهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری و مسیرهای آپوپتوزی وابسته به گیرنده مرگ Fas در قلب موش در هایپوکسی بلند مدت فعال هستند (۲۷). رولز و همکاران نیز اثر تمرین اینتروال بر روی عملکرد دو چرخه سواری را بررسی کردند. آنها چنین نتیجه گرفتند که ٤ هفته تمرین اینتروال موجب بهبود عملکرد استقامتی می‌شود (۲۸). در طرف مقابل

تاثیرات پیش آپوپتوزی، سلول‌ها می‌تواند در شرایط هایپوکسی در برابر آپوپتوز مقاوم بشوند. در پژوهشی دیگر نشان دادند که سلول‌های درمان شده توسط فاکتور القایی قوی آپوپتوز یعنی استرواسپرین در شرایط هایپوکسی شدید در ارتفاع بالا نسبت به سطح دریا، حساسیت کمتری به آپوپتوز داشتند که مقاومت در برابر مرگ در سلول‌های هایپوکسیک حداقل در دو سطح صورت می‌گیرد: در میتوکندری و در سیتوزول سلول، در سلول‌های معالجه شده توسط استرواسپرین، پروتئین‌های پیش آپوپتوزی BAX در طی هایپوکسی در میتوکندری سرکوب می‌گردد. BAX پروتئینی است که باعث رهایی سیتوکروم C به داخل سیتوزول می-شود که در نتیجه رهایی سیتوکروم C به داخل سلول در طی هایپوکسی کاهش می‌یابد که از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند (۲۹). همچنین در پژوهش حاضر سایر گروه مکمل تغییرات آپوپتوزی کمتری داشتند که بعلت کاهش فشار تمرین و مصرف مکمل گیاهی پر ساوشان می‌توان برشمرد. آنالیز فیتوشیمیایی پرشیاوش نشان دهنده وجود مجموعه‌ای از ترکیبات از جمله فلاونوئیدها تری ترپنوئیدها، تری ترپنوئیدها؛ فنیل پروپانوئیدها، اولئان‌ها کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها، کاروتنوئیدها و سیکلیک‌ها است. در برگ‌های پرسیاوش نیز موسیلاژ دارد، موسیلاژ (قند، اسید گالیک، تانن، اسانس و ماده تلخی به نام کاپیلارین دارد. بسیاری از این ترکیبات این توانایی را دارند رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند و التهاب را کاهش می‌دهند (۳۰).

نتیجه‌گیری

تاثیرات افزایشی تمرین اینتروال فزآینده بر سطوح HIF-1α و القای آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه با مصرف عصاره پرسیاوشان بعنوان مکمل گیاهی می‌تواند اثرات منفی سطوح HIF-1α و آپوپتوز برونش و برونشیول بافت ریه را در رت‌های نر ویستار کاهش داده و از آسیب‌های سلولی پیش رو محافظت نماید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و مسئول آزمایشگاه جانوری دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران تقدیر می‌شود.

منابع

1. Becker PM., Alcasabas A., Yu AY., Semenza GL.,Bunton TE. 2000. Oxygen-independent upregulation of vascular endothelial growth factor and vascular barrier dysfunction during ventilated pulmonary ischemia in isolated ferret lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(3): 272-279.

2. Clerici C., Planès C. 2009. Gene Regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(3): L267-L274.

3. Dayan F., Mazure N.M., Brahimi-Horn M.C., Pouysségur J. 2008. A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 1(1): 53-68.

4. Greijer A.,Van der Wall E. 2004. The Role of hypoxia inducible factor 1 (Hif-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*, 57(10): 1009-1014.

5. Groenman F., Rutter M., Caniggia I., Tibboel D., Post M. 2007. Hypoxia-inducible factors in the first trimester human lung. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(4): 355-363.

6. Haider S., Nazreen S., Alam M.M., Gupta A., Hamid H., Alam M.S. 2011. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus-veneris* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3): 741-747.

7. He X., Shi X., Yuan H., Xu H., Li Y.,Zou Z. 2012. Propofol attenuates hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial type Ii cells through down-regulating hypoxia-inducible factor-1α. *Injury*, 43(3):279-283.

8. Jain A.,Doyle DJ. 2020. Apoptosis and Pericyte Loss in Alveolar Capillaries in Covid-19 Infection: Choice of Markers Matters. *Intensive Care Medicine*, 46(10): 1965-1966.

9. Ke Q.,Costa M. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (Hif-1). *Molecular Pharmacology*, 70(5):1469-1480.

10. Krick S., Eul BG., Hanze J. 2005. Role of Hypoxia-Inducible Factor-1α in Hypoxia-Induced Apoptosis of Primary Alveolar Epithelial Type Ii Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(5):395-403.

11. Kuwano K. 2007. Epithelial Cell apoptosis and lung remodeling. *Cell and Molecular Immunology*, 4(6):419-429.

12. Lundby C., Millet G.P., Calbet J.A., Bärtsch P.,Subudhi A.W. 2012. Does 'Altitude Training'increase Exercise Performance in Elite Athletes? *British Journal of Sports Medicine*, 46(11): 792-795.

13. Niazi S., Mirdar S., Bazar R., Hamidian G.,Talebi V. 2021. Evaluation of Hif-1α response and the rate of bronchial and bronchiole apoptosis in lung tissue of male Wistar rats in case of decreased exercise load and hypobaric hypoxia conditions belonging to high-intensity interval training. *Studies in Medical Sciences*, 32(6):437-447.

14. Papacosta E.,Gleeson M. 2013. Effects of intensified training and taper on immune function. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, 27(1):159-176.

15. Semenza GL. 2012. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3):399-408.

16. Yeh C.H., Cho W., So EC. 2011. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced lung epithelial cell iInjury by reducing hypoxia-inducible factor-1α expression. *British Journal of Anaesthesia*, 106(4):590-599.

17. Yuan Q., Zhang X., Liu Z. 2013. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting Nf-Kb activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3):603-611.

The Effect of High-Intensity Interval Training and Adiantum Capillus-Veneris Herbal Supplementation on HIF-1α Levels and Bronchial and Bronchiole Apoptosis of Lung Tissue of Male Wistar Rats

Saber Niazi[1*], Shadmehr Mirdar Harijani[2]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

Abstract

High intensity interval training is associated with impaired immune function and cellular damage in lung tissue. *Adiantum capillus-veneris* has been considered as an herbal supplementation in traditional medicine as an antioxidant. Therefore, the present study investigated the effect of high-intensity interval training on HIF-1α levels and the rate of bronchial and bronchiole apoptosis in lung tissue. For this purpose, 24 healthy Wistar male rats (4 weeks with a mean weight of 72 ± 9 g) were divided into experimental (n = 18) and control (n = 6) groups. After 6 weeks of high-intensity interval training, 6 rats in the experimental group were transferred to the supplement group (n = 6), continued training (n = 6) and exercise supplement (n = 6), and were monitored for another three weeks. At the end of the ninth week, lung tissue samples were taken and assayed to measure HIF-1α levels and bronchial and bronchiole apoptosis. One-way analysis of variance at the significant level ($p \geq 0.05$) was used to analyze the data. The results showed that despite a significant increase in HIF-1α and bronchial apoptosis and pulmonary bronchioles ($p \geq 0.05$) following increased exercise activity of Adiantum capillus-veneris, herbal supplementation in both supplemental group alone and exercise supplementation was significantly decreased. ($p \geq 0.05$) associated with HIF-1α, bronchial apoptosis and bronchial lung tissue. Therefore, Adiantum Capillus-Veneris can lead to a decrease in HIF-1α levels and associated bronchial apoptosis and pulmonary bronchioles.

Keywords: High-intensity interval training, Apoptosis, Adiantum capillus-veneris, Lung tissue.