Sport Physiology **Volume 14, No 53, 2022, Page 177-202**

Research Paper

The Effect of Eight Weeks of Increasing Aerobic Training and Pumpkin Seed Supplementation on Oxidative Stress Indices of Lung Tissue in Rats Poisoned with Hydrogen Peroxide

M. Mohazab[1], H. Matin Homaei[2], S. A. Hosseini[3], S. Rahmati Ahmadabad[4]

1. Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author)
3. Department of Exercise Physiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
4. Department of Physical Education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, Iran.

Received: 2021/05/21 **Accepted: 2021/10/04**

Abstract

Objectives: The aim of this study was to investigate the effect of eight weeks of aerobic training and pumpkin seed supplementation on pulmonary oxidative stress indices of H2O2 poisoned rats.

Methods & Materials: 42 male Wistar rats were randomly divided into 7 groups: control, poisoned, poisoning+ 1 g pumpkin, poisoning+ 2 g pumpkin, poisoning+ aerobic exercise, poisoning+ 1 g pumpkin+ exercise, poisoning+ 2 g pumpkin+ exercise. Induction of oxidative stress by intraperitoneal injection of 0.1 mg/ kg of hydrogen peroxide for 3 days per week, receiving pumpkin seeds at 1 and 2 g per kg of body weight and exercise program including increasing running on a treadmill for 8 weeks (3 days Per week with a minimum speed of 8 meters per minute and a slope of 10 degrees). Specialized kits were used to measure cytochrome c, ATP, MDA and PAB indices and the data were analyzed by two-way analysis of variance at a significance level of 0.05.

Results: The results showed that H2O2 poisoning caused a significant decrease in ATP and significant increase in pulmonary cytochrome C, MDA and PAB ($P < 0.05$). Pumpkin seed doses had no significant effect on MDA, cytochrome c and ATP concentrations ($P > 0.05$). On the other hand, receiving 2 g of pumpkin seeds caused a significant decrease in PAB concentration ($P < 0.05$). Eight weeks of aerobic exercise had no significant effect on pulmonary MDA concentration ($P > 0.05$), but significantly increased ATP concentration and decreased cytochrome c and PAB concentrations ($P < 0.05$). Interaction of aerobic

1. Email: mahshidm60l@yahoo.com
2. Email: hasanmatinhomaee@gmail.com
3. Email: alihoseini_57@yahoo.com
4. Email: salehrahmati@gmail.com

exercise with pumpkin seed doses increased ATP and decreased concentrations of MDA, cytochrome c and PAB ($P < 0.05$).

Conclusions: The single effects of pumpkin seeds seem to be dependent on tissue and dosage. Eight weeks of aerobic exercise is also a good antioxidant solution in hydrogen peroxide poisoning, depending on the factors. The combination of aerobic exercise and high doses of pumpkin seed supplement has additional effects on oxidative indices of lung tissue in rats poisoned with Hydrogen Peroxide.

Keywords: Exercise, Pumpkin, Oxidative Stress, Hydrogen Peroxide

Extended Abstract

Background and purpose

Oxidative stress refers to an increase in the production of free radicals or a decrease in antioxidant defences that lead to disruption of normal metabolism and damage to biological molecules. Accordingly, many physiological and pathophysiological mechanisms involved in lung disorders are associated with oxidative stress. The most important oxidants of oxidative damage are reactive oxygen species (ROS) including anion superoxide (-O2), hydroxyl radicals (OH) and hydrogen peroxide (H2O2) (1). Scientific studies consider exercise to be an important factor in regulating messenger pathways, enhancing antioxidant defenses, and repairing cellular damage caused by oxidative stress (2). However, it is not clear how aerobic interventions affect the above conditions. On the other hand, there has been a lot of interest recently in studying extracts and plants with natural antioxidants (3). It is possible that consumption of pumpkin in a dose-dependent manner may cause different changes in the values of oxidative parameters following intoxication.

Materials and Methods

The present study was performed with an experimental research design (post-test with control group) and clinical research method in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health (NIH) and with the ethics code IR.IAU.M.REC.1398.032. The 42 male Wistar rats were randomly divided into 7 groups: control, poisoned, poisoning + 1 g pumpkin, poisoning + 2 g pumpkin, poisoning + aerobic exercise, poisoning + 1 g pumpkin + exercise, poisoning + 2 g pumpkin+ exercise. Induction of oxidative stress by intraperitoneal injection of 0.1 mg/kg of hydrogen peroxide for 3 days per week, receiving pumpkin seeds at 1 and 2 g per kg of body weight and exercise program including increasing running on a treadmill for 8 weeks (3 days per week with a minimum speed of 8 meters per minute and a slope of 10 degrees) (4). After eliminating the acute effect

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

of the interventions, 24 hours after the last training session and 12 hours after fasting, the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine. Malondialdehyde concentration was assessed using the ELISA kit of Minipolis USA (coefficient of variation of %16, detection range of 25-50 picomol/ml and sensitivity of 0.53 picomol/ml). In order to measure the concentration of cytochrome c oxidase, US-made COX ELISA kits (coefficient of variation of %11, detection range of 1.15-1.1 ng/ml and sensitivity of 0.42 ng/ml) were used. Intracellular ATP level was assessed using the evaluation kits of KA1661 model of Abnova Taiwan (change coefficient %9.3, detection limit 22222M and sensitivity 0001 µ)) . AAB concentration was also measured using TMB cation due to its electrochemical and optical properties. In this method, the values of prooxidant-antioxidant ratio in HK units were expressed based on the percentage of hydrogen peroxide adsorption in the standard solution (5). One-way analysis of variance was used to evaluate the normality of data distribution and one-way analysis of variance was used to investigate the effects of induction of H2O2 poisoning. In order to test the research hypotheses, two-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test was used to determine the main effect of exercise, pumpkin supplement and their interactive effect on dependent variables at a significant level of $p < 0.05$.

Findings

The results showed that H2O2 poisoning caused a significant decrease in ATP and a significant increase in pulmonary cytochrome C, MDA and PAB ($P < 0.05$). Receiving doses of pumpkin seeds had no significant effect on MDA concentration (==,,,,,, P,,,,,,, ===0.139) and in this respect, there was no significant difference between doses used ($p > 0.05$). Also, 8 weeks of aerobic training did not significantly reduce the concentration of pulmonary MDA (11111111444444441111111. However, the interaction of aerobic exercise and pumpkin seeds decreased AAA concentration (F999,,,,, ,,,,,,, , 777777777. Regarding cytochrome c concentration, the results showed no significant effect of doses of 1 and 1 g of pumpkin seeds in this inde((333 .... However, eight weeks of aerobic training significantly reduced the values of this index x8888,,,,, ,, ,,,,,, ,,,,,,,, ,. Besides, the interaction between training and pumpkin seeds reduced the concentration of cytochrome c (F=61.041, ,,,,,,,, ,, 4444444. The greatest decrease was observed when combining aerobic exercise with 2 grams of pumpkin seeds per kilogram of body weight. Receiving doses of pumpkin seeds did not cause significant changes in ATP concentration of lung tissue c (222 4444, ,,,,,,,, ,,,,,, ,,, . On the other hand, aerobic exercise significantly increased the concentration of ATP compared to the group

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

of hydrogen peroxide poisoning c (==,,,,,,, , 0000,, ... Also, the combination of aerobic exercise with pumpkin seeds 1 and 2 g in a completely similar pattern caused a significant increase in pulmonary ATP concentration compared to other groups c (..... .... ,,,, ,, =))))))) Finally, the results showed that receiving 2 g of pumpkin seeds (11111111, 22222222222222222 and eight weeks of aerobic training (. 55555555 11111111 666666666 significantly reduced the concentration of PAB in lung tissue. In addition, the interaction of aerobic exercise and pumpkin seeds (F11111111000000008888888888 significantly reduced PAB concentration without a significant difference in dose.

Conclusion

Based on our results, it is reasonable to combine herbal supplements with exercise interventions to neutralize the oxidative stress caused by physical activity. Accordingly, the anti-inflammatory and antioxidant properties of pumpkin seed supplement, along with increasing the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in aerobic exercise, reduce the prooxidant-antioxidant balance. Hence, these interventions operate through the mechanism of normalizing biomarker levels or compensating for disruption of oxidative markers (6). In this study, the lack of examination of other oxidative and antioxidant enzymes in poisoned mice is one of the research limitations. Therefore, in order to rationally interpret and generalize these results to other areas, we need more research on the auxiliary role of pumpkin seed doses and types of aerobic exercise in reducing the oxidative stress caused by H2O2 poisoning.

Article Message

Aerobic exercise to some extent counteracts the negative changes caused by hydrogen peroxide intake. However, combining eight weeks of treadmill running with pumpkin seed doses is an effective treatment to reduce oxidative damage to lung tissue. To confirm these findings, other intracellular mechanisms, molecular cascades, and possible messenger pathways in both sexes should be examined.

Ethical Considerations

Compliance with Research Ethical Guidelines

This study was conducted with the fundamental objectives in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health (NIH) and considering all ethical principles related to working with laboratory animals with the ethics code of IR.IAU.M.REC.1398.032.

Funding

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

This article is extracted from the doctoral dissertation of the first author of the Department of Sports Physiology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch.

Authors' Contributions

All authors have participated in designing, implementing and writing all parts of the present study.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interset

Acknowledgement

This article is extracted from the doctoral dissertation of Ms. Mahshid Mahzab with the guidance and advice of the author's professors. We would like to thank all those who helped us in this study.

References

1. Daneshmandi H, Bambaichi E, Rahnama N. Response of some oxidative stress and inflammatory indicators to an acute exercise session following adaption to 8 weeks running training. Sport Physiology. 2014;6(23):95-108. DOI: journals.ssrc.ac.ir/article 32.html
2. Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? J Sport Health Sci. 2020;9(5): 415-25. DOI: 10.1016/j.jshs.2020.04.001
3. Ariyanfar H, Matinhomaee H, Hosseini SA, Ghazalian F. The effect of endurance training and purslane (Portulaca oleracea) seed consumption on Cytochrome-C and malondialdehyde in the heart tissue of rats poisoned with H2O2. Journal of Nutrition,Fasting and Health. 2020;8(2):80-6. DOI: 10.22038/jnfh.2020.44729.1237
4. Poozesh jadidi R, Nourazar AR. Effect of 8 weeks aerobic exercise training with chlorella supplementation on catalase and superoxide dismutase in the heart of diabetic male rats. Sport Physiology. 2018;10(38):181-96. DOI: 10.22089/spj.2018.4516.1605
5. Tavana S, Amini S, Hakhamaneshi M, Andalibi P, Hajir M, Ardalan A, et al. Prooxidant-antioxidant balance in patients with phenylketonuria and its correlation to biochemical and hematological parameters. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM. 2016;29. DOI: 10.1515/jpem-2015-0398.
6. Gorzi A, Ekradi S. The effect of intake duration of curcumin supplementation during strenuous endurance training on GPX activity and MDA levels of liver, heart and skeletal muscle in male wistar rats. Sport Physiology. 2020;12(46):139-56. DOI: 10.22089/spj.2020.8357.1989

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۴ ، شماره ۵۳ ،بهار ۱۴۰۱ .صص ۲۰۲-۱۷۷

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین هوازی فزاینده و مکمل بذر کدو بر شاخص‌های فشار اکسایشی بافت ریهٔ موش‌های مسموم‌شده با آب اکسیژنه[1]

مهشید مهذب[1]، حسن متین‌همایی[2]، سید علی حسینی[3]، صالح رحمتی احمدآباد[4]

۱. گروه فیزیولوژی ورزش، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزش، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)
۳. گروه فیزیولوژی ورزش، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
۴. گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۲

چکیده

اهداف: مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی و مکمل بذر کدو بر شاخص‌های فشار اکسایشی ریوی رت‌های مسموم‌شده با آب اکسیژنه (H_2O_2) انجام شد؛

مواد و روش ها: ۴۲ سر رت نر ویستار تصادفی به هفت گروه کنترل، مسموم‌شده، مسمومیت + یک گرم کدو، مسمومیت + دو گرم کدو، مسمومیت + تمرین هوازی، مسمومیت+ یک گرم کدو + تمرین، مسمومیت+ دو گرم کدو + تمرین تقسیم شدند. القای فشار اکسایشی با تزریق درون‌صفاقی ۰/۱ mg/kg هیدروژن پراکسید به‌مدت سه روز در هفته، دریافت بذر کدو به‌صورت یک و دو گرم به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن و برنامهٔ تمرینی شامل هشت هفته دویدن فزاینده روی تردمیل (سه روز در هفته با حداقل سرعت هشت متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درجه) بود. از کیت‌های تخصصی به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های سیتوکروم c، ATP، MDA و PAB استفاده شد و داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس دوراهه در سطح معناداری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نتایج نشان داد مسمومیت با H2O2 سبب کاهش معنادار ATP و افزایش معنادار سیتوکروم C، MDA و PABریوی شد ($P < 0.05$). دریافت دوزهای بذر کدو اثر معناداری بر غلظت MDA، سیتوکروم c و ATP نداشت ($P > 0.05$). از طرفی دریافت دو گرم بذر کدو موجب کاهش معنادار غلظت PAB شد ($P < 0.05$). هشت هفته تمرین هوازی اثری معناداری بر غلظت MDA ریوی نداشت ($P > 0.05$)، اما غلظت ATP را به‌صورت معناداری افزایش داد و غلظت سیتوکروم c و PAB را کاهش داد ($P < 0.05$). تعامل تمرین هوازی با دوزهای بذر کدو باعث افزایش ATP و کاهش غلظت MDA، سیتوکروم c و PAB شد ($P < 0.05$).

1. Email: mahshidm60l@yahoo.com
2. Email: hasanmatinhomaee@gmail.com
3. Email: alihoseini_57@yahoo.com
4. Email: salehrahmati@gmail.com

نتیجه گیری: به نظر می رسد اثرات مجرد بذر کدو به بافت و دوز مصرفی وابسته باشد. هشت هفته تمرین هوازی نیز بسته به عواملی راهکار ضداکسایشی مناسبی در شرایط مسمومیت با پراکسید هیدروژن است. ترکیب تمرین هوازی و دوزهای بیشتر مکمل بذر کدو اثرات مضاعفی بر شاخص‌های اکسایشی بافت ریه در رت‌های مسموم‌شده با آب اکسیژنه دارد.

واژگان کلیدی: تمرین، کدو تنبل، فشار اکسایشی، هیدروژن پراکسید.

مقدمه

فشار اکسایشی به هرگونه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی گفته می‌شود که به اختلال در متابولیسم طبیعی و آسیب به مولکول‌های بیولوژیک منجر می‌شود (۱)؛ براین‌اساس بیماری‌های عصبی، قلبی- عروقی، دیابت و بسیاری از سازوکارهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک درگیر در اختلالات ریه با فشار اکسایشی ارتباط دارند. از مهم‌ترین اکسیدان‌های ایجادکنندهٔ آسیب اکسیداتیو می‌توان به گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل سوپراکسید آنیون ($O2_{-}$)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) اشاره کرد (۷).

پژوهشگران از H_2O_2 یا آب اکسیژنه به‌عنوان یک روش شبیه‌سازی فشار اکسایشی در بدن استفاده می‌کنند. براساس مطالعات انسانی و حیوانی، هیدروژن پراکسید موجب ایجاد اختلالاتی مانند پراکسیداسیون فسفولیپید، اکسایش تیول و کاهش آلفا توکوفرول در سلول‌های ریوی می‌شود (۸). در این راستا ارتباط بین فشار اکسایشی ناشی از مسمومیت با H_2O_2 و تأثیر آن بر تغییر ساختار و عملکرد شاخص‌های فشار اکسایشی موضوع جالب توجهی است. این گونه‌ها در اسیدهای چرب طی فرایند پراکسیداسیون لیپیدی متابولیت‌هایی همچون مالون‌دی‌آلدئید (MDA)[1] ایجاد می‌کنند که با تغییر در عملکرد پروتئین‌ها موجب مهار آنزیمی و آسیب سلولی می‌شوند. در اسیدهای نوکلئیک، رادیکال هیدروکسیل در اثر واکنش با DNA و ایجاد کراس‌لینک در آن باعث تغییر قند دزکسی‌ریبوز و تولید هیدروکسی گوانوزین-۸[2] می‌شود. آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها و آمینواسیدها نیز به ایجاد ترکیباتی ازجمله کربونیل پروتئین، هیدروکسی لوسین، هیدروواالین و نیتروتیروزین منجر می‌شود (۹, ۱۰). یکی از پروتئین‌های اصلی که سیگنال‌دهی ردوکس را در فسفردارشدن اکسایشی میتوکندری کنترل می‌کند، سیتوکروم c است. مسمومیت با درگیرکردن مکانیسم‌های دفاعی سیتوکروم c بر شارژ

1. Malondialdehyde (MDA)
2. 8-OHdG

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

انرژی سلولی (ATP)[1] تأثیر می‌گذارد (۱۱). از طرفی در مایعات بدن تعادل بین تـولید و حذف گونه‌های اکـسیژن فعال با عنوان توازن پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان (PAB)[2] بسیار مهم است. وقتی این تعادل به‌سمت تخلیهٔ آنتی‌اکسیدانی پیش می‌رود، فشار اکسایشی نه‌تنها باعث آسیب مستقیم به ریه می‌شود، بلکه سبب فعال‌شدن مکانیسم‌های مولکولی التهاب نیز ریه می‌شود (۱۲). موارد ذکر شده در خون، ادرار و سایر مایعات بدن به عنوان بیومارکرهای فشار اکسایشی جهت ارزیابی و تشخیص انواع بیماری ها استفاده می شوند.

براساس مطالعات علمی، ورزش عاملی مهم در تنظیم مسیرهای پیام‌رسان، افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و ترمیم آسیب‌های سلولی ناشی از فشار اکسایشی است؛ بااین‌حال، نحوهٔ تأثیر مداخلات ورزشی بر شرایط ذکرشده مشخص نیست و مستلزم توجه زیادی در هنگام تجویز است. درواقع، آسیب‌های اکسیداتیو بسته به نوع ورزش، شدت و مدت آن، وضعیت تمرین‌کننده (آموزش‌دیده یا مبتدی) و نشانگرهای خاص ارزیابی‌شده می‌توانند افزایش یا کاهش یابند (۲). ظاهراً تمرینات مقاومتی آسیب‌های ناشی از فشار اکسایشی را در هنگام ترکیب با تمرینات هوازی یا استقامتی کاهش می‌دهند. از طرفی بیشتر مطالعات نشان‌دهندهٔ برتری ورزش‌های هوازی در کاهش عوارض این آسیب‌اند. سبک زندگی فعال و فعالیت‌های ورزشی متوسط از طریق کاهش ROS، افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پیشگیری از رهاسازی سیتوکروم c سبب ایجاد سازگاری‌های حفاظتی در مقابله با مسمومیت میتوکندریایی و کاهش آپوپتوز سلولی می‌شوند (۱۳)؛ بااین‌حال، گزارش‌های اخیر حاکی از این است که نوع و حجم ورزش (شدت * مدت) و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ناکارآمد، واسطه‌های اصلی فشار اکسایشی هستند و حتی شدت کم یا متوسط نیز می‌تواند باعث ایجاد عوارض شود (۲, ۱۳). در این رابطه تمرین با شدت زیاد روی تردمیل در مقایسه با شدت‌های کم و متوسط بدون تغییر در پراکسیداسیون لیپید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش می‌دهد. از طرفی تمرینات شدید کوتاه‌مدت از طریق تولید پراکسیدهیدروژن باعث آسیب اکسیداتیو می‌شود، اما این اثر تا سطح DNA گسترش نمی‌یابد؛ به همین ترتیب دوچرخه‌سواری با شدت زیاد آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی را افزایش می‌دهد، اما همان شدت در دو سرعت باعث افزایش آسیب اکسیداتیو می‌شود (۱۴, ۱۵). جمع‌بندی نتایج بیانگر آثار مطلوب فعالیت‌های ورزشی هوازی بر تغییرات فشار اکسایشی است؛ ازاین‌رو احتمالاً تمرینات هوازی فزاینده با بهبود سیستم ایمنی موجب تعدیلات جبرانی در شاخص‌های اکسیداتیو متعاقب مسمومیت می‌شود (۱۶)؛ بااین‌حال، مرور مطالعات نشان‌دهندهٔ کمبود مطالعات دربارهٔ اثر

1. Adenosine Triphosphate (ATP)
2. Oxidant–Antioxidant Balance (PAB)

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

تمرینات هوازی بر تغییرات شاخص‌های MDA، سیتوکروم c، ATP و PAB ریوی مدل‌های حیوانی مسموم‌شده با آب اکسیژنه است.

از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌ها مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر اکسیدان‌ها هستند که در حفظ وضعیت ردوکس، حذف گونه‌های فعال و متعادل‌کردن واکنش‌های اکسایشی بدن نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۷). در سال‌های اخیر، علاقهٔ زیادی به مطالعهٔ عصاره و گیاهان دارای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ایجاد شده است. در این زمینه اطلاعات مربوط به اثرات غذایی و درمانی ترکیبات اسیدهای چرب اشباع‌نشده، فیتواستروژن‌ها، ویتامین E و فیبرهای دانه‌های کدوتنبل تاحدودی گسترش یافته است. اسیدهای چرب غیراشباع و آنتی‌اکسیدان‌های موجود با کاهش اکسیداسیون نقش مهمی در پیشگیری و کاهش بیماری‌های پرفشاری خون، هیپوکلسترولمی، دیابت، آرتریت و انواع سرطان دارند؛ درحالی‌که ترکیبات فیتواستروژنی از هیپرلیپیدمی و پوکی استخوان جلوگیری می‌کند (۱۸, ۱۹). شیری و همکاران نشان دادند ۰/۷۵ گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن روغن دانهٔ کدو به‌واسطهٔ تأثیرات آنتی‌اکسیدانی، میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی و ادم مغزی را در موش صحرایی کاهش می‌دهد (۲۰). شکوهی‌راد و همکاران نیز در بررسی نشانگان اکسیداتیو عضلات کند انقباض موش‌های صحرایی نر مسموم‌شده با هیدروژن پراکسید گزارش دادند که بذر کدو و تمرین استقامتی، جداگانه باعث کاهش میزان فشار اکسایشی می‌شوند (۲۱)؛ بااین‌حال، مصرف کدوتنبل ممکن است در روشی وابسته به دوز باعث ایجاد تغییرات مختلف مقادیر پارامترهای اکسایشی متعاقب مسمومیت شود؛ ازاین‌رو بررسی اثرات دوزهای مختلف بذر کدوتنبل در مداخلاتی که شامل تمرینات هوازی هستند، می‌تواند به درک بهتر این فرایندها کمک کند. در این زمینه مطالعات محدودی به‌صورت مجزا انجام شده است و اطلاعات یکپارچه‌ای در رابطه با استفادهٔ هم‌زمان از آن‌ها در دسترس نیست. این احتمال وجود دارد که با ترکیب اثرات مفید بذر کدو و تمرین هوازی بتوان به نتایج بهتری دربارهٔ کاهش عوارض مسمومیت در بافت ریه دست پیدا کرد. براساس موارد گفته‌شده، تلاش برای یافتن بهترین و کم‌خطرترین راه به‌منظور کاهش فشار اکسایشی ناشی از هیدروژن پراکسید امری ضروری است؛ بنابراین هدف این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی و مکمل بذر کدو با دو دوز مصرفی بر تغییرات شاخص‌های سیتوکروم c، ATP، MDA و PAB در بافت ریوی رت‌های نر مسموم‌شده با هیدروژن پراکسید بود.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع توسعه‌ای با طرح پژوهش تجربی (پس‌آزمون با گروه کنترل) و روش پژوهش بالینی بود. این پژوهش با اهداف بنیادی مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسهٔ ملی بهداشت (NIH)[1] و رعایت همهٔ اصول اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.IAU.M.REC.1398.032 انجام شد. بدین‌منظور، ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار دوماهه با محدودهٔ وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم از مرکز حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند و به‌صورت تصادفی در هفت گروه کنترل، مسموم‌شده، مسمومیت + یک گرم کدو، مسمومیت + دو گرم کدو، مسمومیت + تمرین هوازی، مسمومیت + یک گرم کدو + تمرین، مسمومیت + دو گرم کدو + تمرین در قفس‌های مخصوص با دسترسی آزاد به غذا و آب استاندارد در دمای ۳ ± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخهٔ روشنایی ۱۲ ساعتی نگهداری شدند. پس از پایان مدت‌زمان سازگاری، موش‌ها پنج جلسه در هفته با راه‌رفتن روی نوارگردان حیوانات (شرکت پیشرو اندیشهٔ صنعت، مدل ۲۰۱۴) با سرعت ۱۵ متر در دقیقه و شیب صفر درجه آشنا شدند (۲۲). القای فشار اکسایشی با استفاده از تزریق درون‌صفاقی ۰/۱ mg/kg هیدروژن پراکسید ساخت شرکت مرک آلمان به‌مدت سه روز در هفته، اعمال شد.

بذر کدوی خشک از پژوهشگاه گیاهان دارویی تهیه شد و توسط آسیاب برقی کاملاً پودر شد. پودر به‌دست‌آمده در دو مرحلهٔ یک ساعتی در ۸۰ درصد اتانول با نسبت ۱: ۱۰ غوطه‌ور شد و توسط فیلتر کاغذی ۰/۲ میلی‌متری صاف شد. مادهٔ حاصل‌شده در دستگاه پرکولاسیون قرار گرفت تا اتانول تبخیر شود. درنهایت هر ۵۰ میلی‌گرم از پودر عصارهٔ باقیمانده در ۰/۱ میلی‌لیتر سالین سرد حل شد و به‌صورت یک و دو گرم به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن با روش گاواژ به‌مدت هشت هفته (چهار روز در هفته) در ساعت ۹ صبح به گروه‌های هدف خورانده شد (۲۱).

برنامهٔ هوازی گروه‌های تمرینی شامل هشت هفته (سه روز در هفته بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح) دویدن تداومی روی تردمیل به‌صورت شروع تمرین با سرعت هشت متر بر دقیقه، زمان ۳۰ دقیقه و شیب ۱۰ درجه بود. در هفتهٔ دوم سرعت ۱۲ متر بر دقیقه، شیب ۱۰ درجه و زمان ۳۰ دقیقه، هفتهٔ سوم سرعت ۱۶ متر بر دقیقه، شیب ۱۰ درجه و زمان ۴۵ دقیقه و در چهارمین هفته با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و شیب و زمان مشابه با هفتهٔ قبل رسید. در طول هفته‌های پنجم تا هشتم، رت‌ها با سرعت

1. National Institutes of Health (NIH)

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

۲۰ متر بر دقیقه، شیب ۱۰ درجه و زمان ۶۰ دقیقه تمرین کردند. برنامهٔ گرم‌کردن و سردکردن در هر جلسه شامل شش دقیقه دویدن با سرعت نُه متر بر دقیقه بود (۴).

با توجه به نیمهٔ عمر متغیرهای پژوهش و برای حذف اثر حاد مداخلات، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین و ۱۲ ساعت پس از ناشتایی، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از داروی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. بافت ریه بریده شد و در محلول نمکی سرد یخ‌زده تمیز شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونهٔ به‌دست‌آمده تا زمان تجزیه و تحلیل بعدی در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳). برای اندازه‌گیری غلظت بافتی شاخص‌ها، بافت ریه پس از اضافه‌کردن بافر حاوی 50mM Tris–HCl, NaCl و 12µM leupeptin با اسـتفاده از هموژنایزر برقی تنظیم‌شده روی ۸۰۰ دور در دقیقه هموژنه شد. سپس این محلول به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و به لوله‌های جدید منتقل شد. درنهایت، مقادیر کافی مایع رویی شناور برای سنجش MDA، PAB، سیتوکروم c و ATP برداشت شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از کیت الایزا شرکت مینیپولیس آمریکا (ضریب تغییرات ۱۶ درصد، دامنهٔ تشخیص ۱۰۰۰-۲۵/۵۰ پیکومول بر میلی‌لیتر و حساسیت ۰/۵۳ پیکومول بر میلی‌لیتر) ارزیابی شد. به‌منظور کمی‌کردن غلظت سیتوکروم c اکسیداز از کیت‌های الایزا COX[1] ساخت آمریکا (ضریب تغییرات ۱۱ درصد، دامنهٔ تشخیص ۱۰۰- ۱/۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت ۰/۴۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. سنجش میزان ATP درون‌سلولی با استفاده از کیت‌های ارزیابی مدل KA1661 شرکت Abnova تایوان (ضریب تغییرات ۳/۹ درصد، حد تشخیص ۰/۰۲ µM و حساسیت ۰/۰۰۱ µM) صورت گرفت. غلظت PAB نیز با استفاده از کاتیون TMB[2] به‌دلیل ویژگی‌های الکتروشیمیایی و نوری آن سنجیده شد. در این روش مقادیر نسبت پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان در واحدهای HK بر مبنای درصد جذب پراکسید هیدروژن در محلول استاندارد بیان شد (۵).

برای توصیف داده‌های جمع‌آوری‌شده از شاخص‌های گرایش مرکزی، برای بررسی طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی اثرات القای مسمومیت با H_2O_2 از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. به‌منظور بررسی فرضیه‌های پژوهش از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی بنفرونی برای تعیین اثر اصلی تمرین، مکمل کدوتنبل و اثر تعاملی آن‌ها بر متغیرهای وابسته استفاده

1. Cytochrome C Oxidase (COX)
2. Tetramethylbenzidine

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

شد. عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس[1] نسخهٔ ۲۲ انجام شد و نتایج در سطح معناداری ۰/۰۵ گزارش شد.

نتایج

القای فشار اکسایشی ناشی از H_2O_2 موجب کاهش معنادار غلظت ATP و افزایش معنادار مالون‌دی‌آلدئید، سیتوکروم c و توازن پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.05$) (جدول شمارهٔ یک).

جدول ۱- تغییرات شاخص‌های اکسیداتیو ریهٔ ناشی از القای مسمومیت با هیدروژن پراکسید به‌صورت میانگین ± انحراف معیار

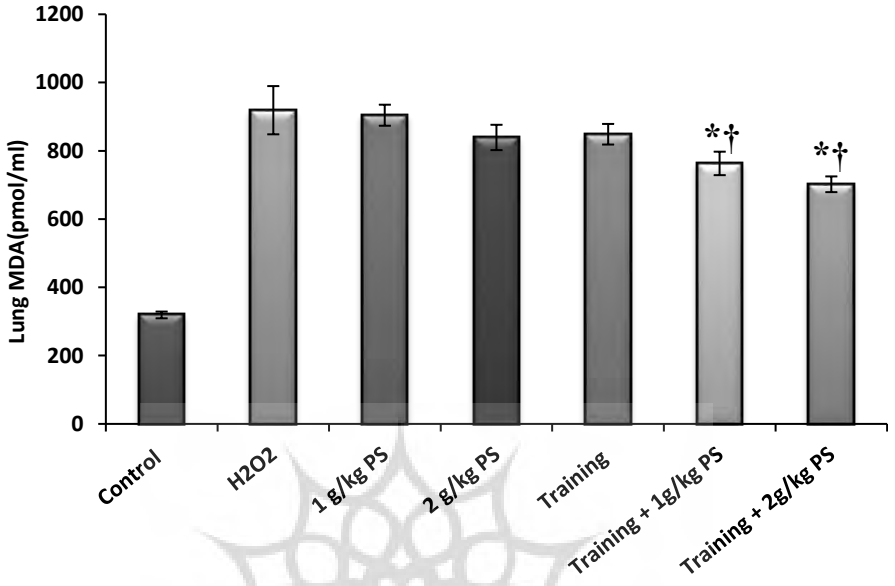
Table 1- Changes in lung oxidative indices due to induction of hydrogen peroxide poisoning by mean± SD

P	F	گروه مسموم‌شده Poisoned group	گروه کنترل control group	متغیر Variable
0.004	141.54	919.07± 86.49	319.20± 12.07	مالون‌دی‌آلدئید MDA (Pmol/mL)
0.002	620.70	6.19± 0.32	1.34± 0.07	سیتوکروم سی Cyt C (ng/mL)
0.001	1016.22	5.88± 0.51	22.31± 0.73	TT((µ))
0.001	1292.32	276.55± 8.82	46.57± 6.69	توازن پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان PAB (HK)

نتایج نشان داد که دریافت دوزهای بذر کدو اثر معناداری بر غلظت MDA نداشت ($F = 4.127$, $P = 0.091$, $\eta^2 = 0.139$) و از این لحاظ تفاوت معناداری بین دوزهای مصرفی نبود ($P > 0.05$). همچنین هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنادار غلظت MDA ریوی نشد ($F = 4.614$, $P = 0.084$, $\eta2 = 0.141$)؛ بااین‌حال تعامل تمرین هوازی و بذر کدو باعث کاهش غلظت MDA شد ($F = 39.711$, $P = 0.010$, $\eta^2 = 0.787$) و در این تعامل تفاوت معناداری بین دوزهای مصرفی مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل شمارهٔ یک).

1. SPSS

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License



شکل ۱- غلظت MDA بافت ریه در گروه‌های مطالعه‌شده

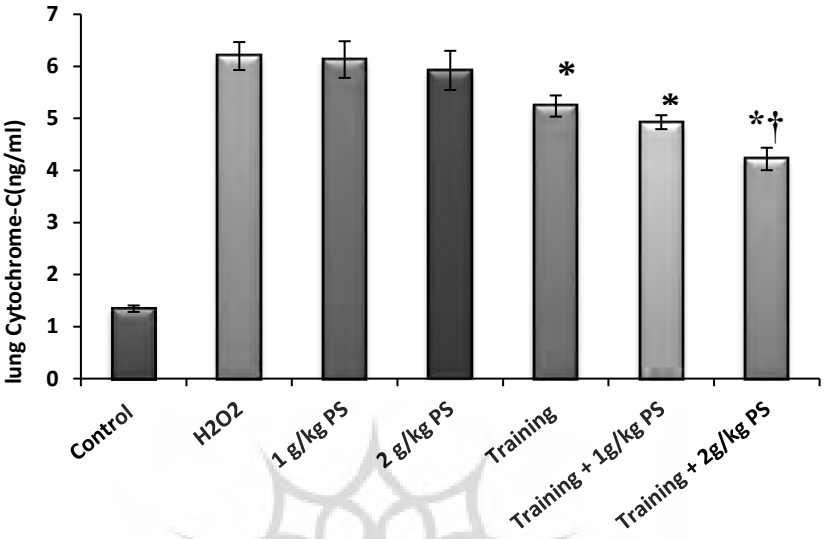
†*: کاهش معنادار در مقایسه با سایر گروه‌ها

Figure 1- MDA concentration of lung tissue in the studied groups

*†: A significant decrease compared to other groups

در رابطه با غلظت سیتوکروم c نتایج نشان‌دهندهٔ تأثیر معنادار نداشتن دوزهای یک و دو گرم بذر کدو در این شاخص بود ($F = 3.168, P = 0.143, \eta^2 = 0.089$)؛ بااین‌حال، هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنادار مقادیر این شاخص شد ($F = 38.099, P = 0.007, \eta^2 = 0.652$). همچنین تعامل تمرین و بذر کدو موجب کاهش غلظت سیتوکروم c شد ($F = 61.041, P = 0.004, \eta2 = 0.944$). بیشترین کاهش در زمان ترکیب تمرین هوازی با دو گرم بذر کدو به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد (شکل شمارهٔ دو).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License



شکل ۲- غلظت سیتوکروم C ریه در گروه‌های مطالعه‌شده

*: کاهش معنادار در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کنندهٔ بذر کدو و H2O2

†*: کاهش معنادار در مقایسه با سایر گروه‌ها

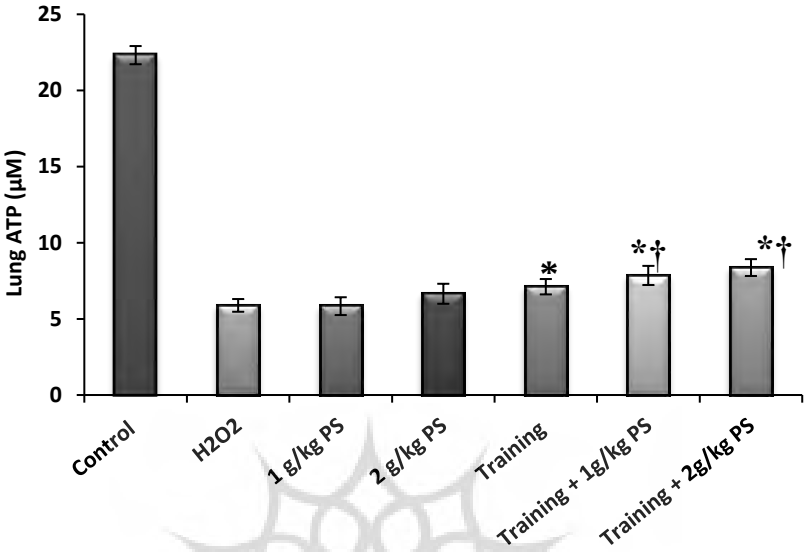
Figure 2- Lung cytochrome C concentration in the studied groups

*: A significant decrease compared to groups receiving pumpkin seeds and H2O2

t *: A significant decrease compared to other groups

براساس نتایج، دریافت دوزهای بذور کدو باعث ایجاد تغییرات معنادار در غلظت ATP بافت ریه نشد ($F = 2.824, P = 0.266, \eta^2 = 0.082$). از طرفی تمرین هوازی موجب افزایش معنادار غلظت ATP در مقایسه با گروه مسمومیت با هیدروژن پراکسید شد ($F = 16.548, P = 0.045, \eta^2 = 0.474$). همچنین تلفیق تمرین هوازی با بذر کدوی یک و دوگرمی در الگویی کاملاً مشابه موجب افزایش معنادار غلظت ATP ریوی در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ($F = 24.601, P = 0.021, \eta^2 = 0.587$) (شکل شمارهٔ سه).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License



شکل ۳- غلظت ATP بافت ریه در گروه‌های مطالعه‌شده

*: افزایش معنادار در مقایسه با گروه H2O2 و بذر کدوی یک‌گرمی

*†: افزایش معنادار در مقایسه با سایر گروه‌ها

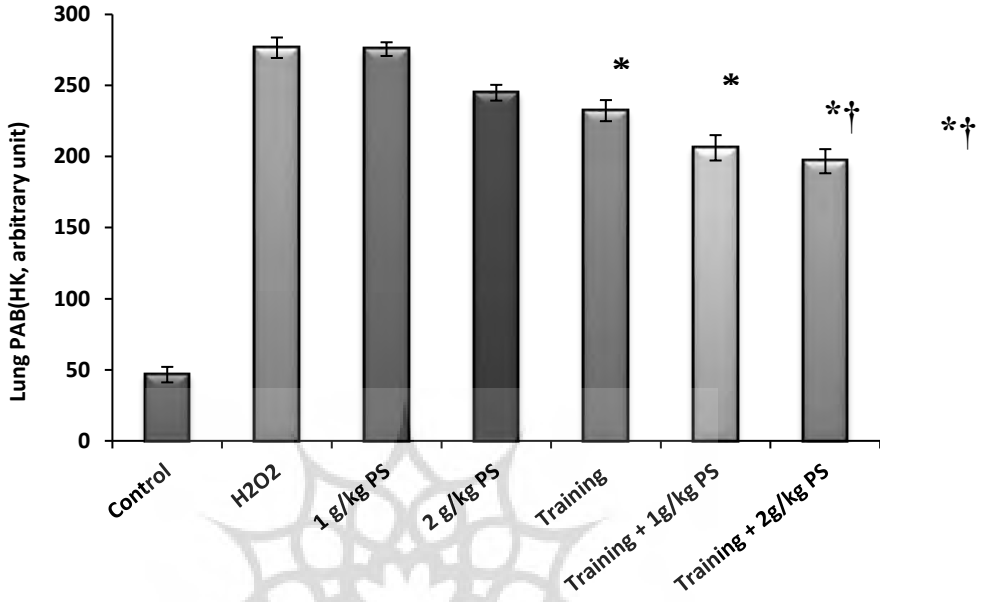
Figure 3- ATP concentration of lung tissue in the studied groups

*: A significant increase compared to the H2O2 group and 1 g pumpkin seeds

*†: A significant increase compared to other groups

همچنین نتایج نشان داد دریافت دو گرم بذر کدو ($F = 18.128, P = 0.029, \eta^2 = 0.512$) و هشت هفته تمرین هوازی ($F = 23.552, P = 0.018, \eta^2 = 0.568$) موجب کاهش معنادار غلظت PAB در بافت ریه شد. تعامل تمرین هوازی و بذر کدو نیز بدون اختلاف معنادار در میزان دوز مصرفی باعث کاهش معنادار غلظت PAB شد ($F = 39.017, P = 0.005, \eta^2 = 0.688$) (شکل شمارهٔ چهار).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License



شکل ۴- غلظت PAB بافت ریه در گروه‌های مطالعه‌شده

*: کاهش معنادار در مقایسه با گروه H2O2 و بذر یک‌گرمی

†*: نشانه کاهش معنادار در مقایسه با سایر گروه‌ها

Figure 4- PAB concentration of lung tissue in the studied groups

*: A significant decrease compared to the H2O2 group and 1 gram seeds

*† : A significant decrease compared to other groups

بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج پژوهش حاضر، مسمومیت با H_2O_2 باعث کاهش معنادار غلظت ATP و افزایش غلظت سیتوکروم c، MDA و PAB ریوی موش‌های صحرایی می‌شود. هنگام قرارگرفتن درمعرض هیدروژن پراکسید واکنش فنتون بین یون‌های H_2O_2 و Fe2 باعث تولید رادیکال واکنش‌پذیر OH به‌عنوان مکانیسم اصلی آسیب اکسیداتیو می‌شود. این رادیکال‌های سمی می‌توانند بسته به نوع سلول، وضعیت فیزیولوژیک، مدت‌زمان قرارگیری و غلظت آن باعث القای مرگ سلولی شوند. علاوه‌براین، در افراد دارای بیماری‌های التهاب ریه و سیگاری، H_2O_2 زیادی مشاهده می‌شود (۲۴). از طرفی بررسی ROS منابع غیرعضلانی نشان می‌دهد که بیشترین مقدار افزایش پراکسیدهیدروژن خارج سلولی در

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

طی آزمون بروس[1] و آزمون وینگیت[2] مشاهده می‌شود؛ درحالی‌که هشت هفته تمرین هوازی تأثیری بر افزایش سطوح آن ندارد (۱۳, ۱۵). ازآنجاکه نبود تعادل در متابولیسم H_2O_2 با بیماری‌های مرتبط با فشار اکسیداتیو ازجمله چاقی، دیابت، ایسکمی، کاهش شنوایی، اختلالات قلبی و عصبی، پیری و شروع و پیشرفت تومور همراه است (۱۰, ۲۵)، این عوارض باید از طریق به‌کارگیری مداخلات مؤثر کاهش یابند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد دریافت بذر کدو موجب کاهش معنادار غلظت MDA در مقایسه با گروه بدون مکمل نشد. میزان MDA در گروه دریافت دوز دو گرم به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن کمتر از دوز یک گرم شد، اما این اثر معنادار نبود. همچنین هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنادار غلظت ریوی این شاخص نشد؛ بااین‌حال، هنگامی که دوزهای بذر کدو با تمرین هوازی ترکیب شد، MDA موش‌های مسموم‌شده کاهش معناداری را نشان داد. ظاهراً با افزایش دوز مصرفی، غلظت این شاخص کاهش بیشتری می‌یابد، اما بین دوزهای استفاده‌شده در این پژوهش این اختلاف معنادار نبود. این یافته‌ها در تناقض آشکار با نتایج پژوهش شکوهی‌راد و همکاران است. آن‌ها نشان دادند دریافت بذر کدو با دوز یک و دو گرم به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن و هشت هفته تمرین استقامتی موجب کاهش معنادار غلظت MDA عضلات کند انقباض موش‌های نر مسموم‌شده با پراکسیدهیدروژن می‌شود، اما تعامل آن‌ها چنین تأثیری ندارد (۲۱). از طرفی مهذب و همکاران گزارش کردند دو گرم بذر کدو و هشت هفته تمرین هوازی باعث کاهش معنادار غلظت MDA بافت قلبی متعاقب مسمومیت می‌شود (۲۶). براساس نتایج پژوهش روگ و همکاران، روغن دانهٔ کدوتنبل (چهار میلی‌لیتر در کیلوگرم) باعث کاهش چشمگیر غلظت MDA کبد و کلیه پس از مسموم‌شدن با ایماکتین می‌شود (۲۷)؛ بااین‌حال، دربارهٔ اثرات بذر کدوتنبل بر میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت ریه کمبود مطالعات وجود دارد. نتایج پژوهش حاضر حاکی از این است که اثرات مفید بذر کدو می‌تواند به بافت مطالعه‌شده و دوز مصرفی وابسته باشد که باید در مطالعات آینده بیشتر بررسی شود. کاهش‌نیافتن سطح MDA ریوی موش‌های مسموم‌شده پس از هشت هفته تمرین هوازی، تاحدودی با پژوهش‌های مشابه با حوزه‌های انسانی و حیوانی همخوانی ندارد. اشرفی و دبیدی روشن در مقاله‌ای مروری نشان دادند هشت هفته تمرین منظم هوازی با شدت متوسط برای تنظیم کاهشی مالون‌دی‌آلدئید ضروری است (۲۸). در این راستا، جابری و همکاران نشان دادند شش هفته تمرین

1. Bruce Test
2. Wingate Test

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

هوازی اثر معناداری بر فاکتور مالون‌دی‌آلدئید ندارد (۲۹). در این پژوهش، تغییرنکردن سطح مالون‌دی‌آلدئید به‌دنبال تمرین هوازی را می‌توان توسط چند عامل توجیه کرد. برخی مطالعات گزارش کرده‌اند جنسیت، عامل تعیین‌کنندهٔ تغییرات MDA در بافت قلب و عضلات اسکلتی پس از ورزش‌های شدید یا استقامتی است (۳۰). از طرفی این احتمال وجود دارد که شدت و مدت تمرین به‌کارگرفته‌شده، تنها سبب ایجاد سازگاری‌های ویژه‌ای در سیستم اکسایشی بدن شده باشد. در این راستا نشان داده شده است که تمرین با شدت زیاد روی تردمیل ممکن است بدون تغییر در پراکسیداسیون لیپید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش دهد (۱۵). در بررسی‌های آینده ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPx) تحت‌تأثیر پروتکل تمرینی مشابه می‌تواند توجیه مناسبی برای یافته‌های پژوهش حاضر باشد. از طرفی سازوکار اثر تعاملی فعالیت هوازی و بذر کدو در کاهش مالون‌دی‌آلدئید مشخص نیست. ظاهراً سازگاری با تمرین هوازی و دریافت بذر کدو قادر به حذف رادیکال‌های آزاد H_2O_2 و درنتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است. در این تعامل، الگوی تغییرات در دوزهای یک‌گرمی و دوگرمی در حالت تمرین‌کردن یا تمرین‌نکردن مشابه بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد ترکیب دوزهای بیشتر بذر کدو با تمرین هوازی اثرات بیشتری به همراه داشته باشد.

ارزیابی فعالیت آنزیم سیتوکروم c اکسیداز ریوی نشان‌دهندهٔ اثرات کاهندهٔ هشت هفته تمرین هوازی بود؛ درحالی‌که دریافت بذرهای کدو موجب ایجاد اختلاف معنادار در مقایسه با گروه مسمومیت نشد. از طرفی تلفیق تمرین هوازی با بذر کدوی دوگرمی موجب کاهش بیشتر این شاخص در مقایسه با تمرین هوازی مجرد شد. شایان ذکر است در مرور ادبیات پژوهش، مطالعه‌ای با هدف بررسی هم‌زمان این موضوع یافت نشد؛ بااین‌حال آریانفر و همکاران در یک پروتکل تمرینی مشابه با پژوهش حاضر نشان دادند هشت هفته تمرین هوازی باعث کاهش معنادار فعالیت سیتوکروم c در بافت قلب موش‌های مسموم‌شده با H_2O_2 می‌شود (۳). با بررسی عوامل افزایش چگالی میتوکندری و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو بافت عضلانی می‌توان این نتایج را به عواملی مرتبط دانست. چنین پیشنهاد شده است که تمرین هوازی از طریق نشست اکسیژن در زنجیرهٔ انتقال الکترون، متابولیسم پروستونوئید، گزانتین اکسیداز، فعالیت ماکروفاژ و افزایش فعالیت کاتکولامین‌ها بر روند فشار اکسایشی تأثیر می‌گذارد (۱۵). از طرفی کاهش فعالیت سیتوکروم c اکسیداز متعاقب هشت هفته تمرین هوازی و مصرف بذر کدو ممکن است با تغییرات یون آهن سیتوکروم c و فقر آهن موش‌ها مرتبط باشد. در این وضعیت، حذف یون‌های فلزی با تغییرات ساختمانی و غیرفعال‌شدن آنزیم همراه است. آهن جدا از عملکرد مهمی که به‌عنوان یکی از اجزای سازندهٔ هموگلوبین دارد، یک عامل اصلی در بسیاری از

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

آنزیم‌ها ازجمله کمپلکس III زنجیرهٔ انتقال الکترون در میتوکندری است که دست‌خوش تغییراتی برای سازگاری با مداخلات می‌شود. در این راستا، بوشهری و همکاران نشان دادند فعالیت آنزیم سیتوکروم c اکسیداز پس از ۱۲ هفته تمرین استقامتی و مصرف مکمل آهن افزایش معناداری می‌یابد و بر زمان دویدن تأثیرگذار است (۳۱)؛ بااین‌حال، در این پژوهش زمان و کیفیت دویدن آزمودنی‌ها مقایسه نشد تا بتوان در این باره نتیجه‌گیری کرد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد دریافت بذر کدو اثر معناداری بر غلظت ATP بافت ریه نداشت، اما با افزایش میزان دوز مصرفی، میزان ATP افزایش یافت. در ناهمسویی با این نتایج، یافته‌های پژوهش شکوهی‌راد و همکاران نشان داد دریافت مکمل بذر کدوی یک و دوگرمی باعث افزایش معنادار غلظت ATP در عضلهٔ نعلی موش‌های نر می‌شود (۲۱). با توجه به خواص ضدالتهابی و ضدخستگی مواد معدنی و عناصر عالی بذر کدو در عملکردهای ورزشی (۱۹)، چنین تناقص‌هایی در یافته‌ها احتمالاً به نوع بافت، عملکرد بافت و تناسب اندام فرد مربوط است (۳۲)؛ براین‌اساس، برخی از عوامل مانند تخلیهٔ سریع گلیکوژن، تجمع لاکتات، یون هیدروژن و فسفر داخل سلولی، اختلال در ترشح کلسیم از شبکهٔ سارکوپلاسمی، نبود توانایی برای حفظ ATP متناسب با انرژی مصرف‌شده و افزایش مصرف اکسیژن در ایجاد فشار اکسایشی نقش دارند (۲۷). همچنین اثرات آنتی‌اکسیدان بذر کدو می‌تواند در هر بافت به دوز وابسته باشد و ظاهراً در بافت ریه هرچه مقدار دوز این مکمل بیشتر باشد، اثر بهتری به جای می‌گذارد. ATP علاوه‌بر تأمین انرژی سلولی می‌تواند به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان بین‌سلولی نقش ایفا کند و سبب ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیک متنوع چون ترشح سیتوکین، تجمع پلاکت‌ها و التهاب شود (۳۳)؛ ازاین‌رو مصرف مقادیر بیشتر مکمل بذر کدو می‌تواند ضمن جلوگیری از کاهش ATP ریه، از پیشرفت مرگ سلولی و سرطان پیشگیری کند.

در زمینهٔ تمرین هوازی نتایج پژوهش حاضر نشان داد پس از اجرای پروتکل هشت‌هفته‌ای، غلظت ATP ریوی به‌طور معناداری در گروه تمرین‌کرده در مقایسه با گروه H_2O_2 افزایش یافت. مسلم است که عوامل متعددی مانند تناسب بدنی، آمادگی قلبی-عروقی و سازگاری با فعالیت بدنی منظم بر غلظت ATP سلولی و عضلانی اثرگذار هستند؛ بااین‌حال پژوهشگران نتایج متناقضی را گزارش کرده‌اند؛ به‌طوری‌که هاگتون و همکاران کاهش ATP کبدی را به‌دنبال فعالیت ورزشی در موش‌های صحرایی گزارش کردند (۳۴). قنبری و همکاران در بررسی اثر تمرین استقامتی نشان دادند تنها تمرینات استقامتی کوتاه‌مدت (سه هفته) و بلندمدت (۱۲ هفته) موجب افزایش معنادار غلظت این شاخص کبدی می‌شود (۳۵). همچنین شکوهی‌راد و همکاران در بررسی هشت هفته تمرین هوازی روی تردمیل نشان دادند غلظت ATP عضلهٔ نعلی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۲۱). به نظر

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

می‌رسد تغییر میزان لاکتات تولیدی در اثر نوع تمرین مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر غلظت ATP بافت‌ها باشد؛ زیرا بین کاهش لاکتات تولیدی حین تمرین و کاهش ATP رابطهٔ مستقیم یافت شده است. در این رابطه عواملی مانند شدت، مدت، طول دورهٔ تمرین و فاصلهٔ آخرین جلسهٔ تمرین تا بی‌هوشی نقش مهمی دارند (۳۳, ۳۵). از طرفی القای مسمومیت با هیدروژن پراکسید باعث کاهش فعالیت مسیرهای پیام‌رسان پروتئین کینازها (PKs)[1] و کانال‌های پتاسیمی حساس به تغییرات ATP به‌عنوان مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک مقابله با فشار اکسایشی می‌شود (۱۰, ۲۵) که ظاهراً این موضوع از طریق استفاده از مکمل بذر کدو و تمرین هوازی بهتر مرتفع خواهد شد.

همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد تفاوت معناداری بین دوزهای مصرفی بذر کدو در تأثیرگذاری بر شاخص PAB وجود داشت؛ به‌طوری‌که مصرف دو گرم این مکمل قادر به ایجاد تغییرات کاهشی شد. هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، شکوهی‌راد و همکاران گزارش کردند دریافت دو گرم بذر کدو موجب کاهش بیشتر شاخص PAB در عضلهٔ نعلی می‌شود (۲۱). دربارهٔ اثرات دوزهای مصرفی بذر کدو بر مقادیر این شاخص، محدودیت‌های پژوهشی زیادی وجود دارد، اما مکانیسم‌های پیشنهادی این کارایی‌ها به اثرات ضدالتهابی یا توانایی مهار رادیکال‌های آزاد عناصر فیتواستروژن‌ها و اسیدهای چرب اشباع‌نشده مربوط است (۳۶). ابوسیف[2] نشان داد مکمل‌دهی با روغن بذر کدو می‌تواند مسمومیت کبدی ناشی از الکل و فشار اکسایشی را خنثی کند (۳۷).

براساس یافته‌های پژوهش حاضر، هشت هفته تمرین هوازی باعث کاهش معنادار توازن پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان در مقایسه با گروه مسمومیت می‌شود. پژوهش‌های اولیه نشان داده‌اند فعالیت بدنی منظم با تأثیر بر شاخص PAB از وقوع بیماری‌های قلبی- عروقی جلوگیری می‌کند. براساس مطالعهٔ پیلچ و همکاران[3]، حداقل پنج روز تمرین هوازی موجب تغییر این شاخص در جهت افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود (۳۸). رح و سو[4] نیز در بررسی اثر تمرین هوازی و چاقی بر توازن اکسیدانی-آنتی‌اکسیدانی نشان دادند ســطوح ROS آزمودنی‌ها بعد از تمرین کاهش می‌یابد و سطح SOD افزایش می‌یابد (۳۹). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، شکوهی‌راد و همکاران نشان دادند میزان PAB پس از هشت هفته تمرین استقامتی در موش‌های نر مسموم‌شـده کاهش یافت (۲۱). شمس و همکاران نیز گزارش کردند هشت هفته تمرین هوازی و مصرف ویتامین D موجب افزایش معنادار

1. Protein kinases (PKs)
2. Abou Seif
3. Pilch & et al
4. Roh and So

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

غلظت GPx و کاهش معنادار نسبت PAB بافت ریهٔ رت‌های درمعرض آب اکسیژنه شد (۲۳). در این زمینه ظاهراً بیشترین تغییرات سازشی تمرینات هوازی در ارتباط با آنزیم GPx مشاهده می‌شود. در این فرایند، GPx با استفاده از گلوتاتیون داخل زنجیرهٔ انتقال الکترون، هیدروژن را به آب و پراکسیدهای ارگانیکی را به الکل تبدیل می‌کند (۶)؛ بنابراین کاهش معنادار نسبت پرواکسیدان‌ها متعاقب هش هفته تمرین هوازی را می‌توان به افزایش معنادار GPx و نقش آن در تبدیل H_2O_2 به آب و مناسب‌بودن شدت و مدت برنامهٔ تمرین هوازی نسبت داد. براساس نظر پژوهشگران، ترکیب هم‌زمان مکمل‌های گیاهی با مداخلات ورزشی به‌منظور خنثی‌کردن فشار اکسایشی ناشی از فعالیت بدنی، منطقی است؛ براین‌اساس، ویژگی‌های ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی مکمل بذر کدو در کنار افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی تمرینات هوازی موجب کاهش توازن پرواکسیدان-آنتی‌اکسیدان می‌شود؛ ازاین‌رو این مداخلات از طریق مکانیسم نرمال‌کردن سطوح نشانگرهای زیستی یا جبران اختلال در شاخص‌های اکسیداتیو عمل می‌کنند. در این پژوهش، بررسی‌نشدن سایر آنزیم‌های اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی موش‌های مسموم‌شده ازجمله محدودیت‌های پژوهش حاضر محسوب می‌شود؛ بنابراین برای تفسیر منطقی و تعمیم این نتایج به سایر زمینه‌ها به انجام‌دادن پژوهش‌های بیشتری دربارهٔ نقش کمکی دوزهای بذر کدو و انواع تمرین هوازی در کاهش فشار اکسایشی ناشی از مسمومیت با H_2O_2 نیاز است.

پیام مقاله

مطابق با نتایج پژوهش حاضر، تمرینات هوازی تاحدودی تغییرات منفی ناشی از دریافت هیدروژن پراکسید را خنثی می‌کند؛ بااین‌حال، ترکیب هشت هفته دویدن روی تردمیل با دوزهای بذر کدو، یک روش مؤثر درمانی برای تعدیل آسیب‌های اکسایشی بافت ریه محسوب می‌شود. برای تأیید این یافته‌ها باید سایر سازوکارهای درون‌سلولی، آبشارهای مولکولی و مسیرهای پیام‌رسان احتمالی در دو جنس بررسی شود.

پرتال جامع علوم انسانی

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با اهداف بنیادی مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسهٔ ملی بهداشت (NIH)[1] و رعایت همهٔ اصول اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.IAU.M.REC.1398.032 انجام شد.

حامی مالی

این پژوهش هیچ گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش بخش‌های پژوهش مشارکت یکسانی داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری خانم مهشید مهذب به راهنمایی و مشاوره اساتید نویسنده است. بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام دادن این پژوهش یاری کردند، سپاسگزاری می کنیم.

منابع

1. Daneshmandi H, Bambaichi E, Rahnama N. Response of some oxidative stress and inflammatory indicators to an acute exercise session following adaption to 8 weeks running training. Sport Physiology. 2014;6(23):95-108. DOI: journals.ssrc.ac.ir/article 32.html
2. Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? J Sport Health Sci. 2020;9(5): 415-25. DOI: 10.1016/j.jshs.2020.04.001
3. Ariyanfar H, Matinhomaee H, Hosseini SA, Ghazalian F. The Effect of Endurance Training and Purslane (Portulaca oleracea) Seed Consumption on Cytochrome- C and Malondialdehyde in the Heart Tissue of Rats Poisoned with H2O2. Journal of Nutrition,Fasting and Health. 2020;8(2):80-6. DOI: 10.22038/jnfh.2020.44729.1237

1. National Institutes of Health (NIH)

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

4. Poozesh jadidi R, Nourazar AR. Effect of 8 Weeks Aerobic Exercise Training with Chlorella Supplementation on Catalase and Superoxide Dismutase in the Heart of Diabetic Male Rats. Sport Physiology. 2018;10(38):181-96. DOI: 10.22089/spj.2018.4516.1605
5. Tavana S, Amini S, Hakhamaneshi M, Andalibi P, Hajir M, Ardalan A, et al. Prooxidant-antioxidant balance in patients with phenylketonuria and its correlation to biochemical and hematological parameters. Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM. 2016;29. DOI: 10.1515/jpem-2015-0398.
6. Gorzi A, Ekradi S. The Effect of Intake Duration of Curcumin Supplementation During Strenuous Endurance Training on GPX Activity and MDA Levels of Liver, Heart and Skeletal Muscle in Male Wistar Rats. Sport Physiology. 2020;12(46):139-56. DOI: 10.22089/spj.2020.8357.1989
7. Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, Garcia AE, Zemskov EA, Maltepe E, et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. Redox Biology. 2020;36:101679. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101679
8. Mahtabi Alamdari J, Matin Homaei H, Farzanegi P. The Effects of Vitamin D and Continuous Training on Apoptosis Markers in Aorta Tissue of Rats Exposed to Hydrogen Peroxide (H2O2). Sport Physiology. 2018;10(40):163-78. DOI: 10.22089/spj.2019.7061.1877
9. Mehrabani J, Ramezani N, Iranshahi F. The effect of interval aerobic training on malondialdehyde and total capacity antioxidant in sedentary women. Sport Physiology. 2014;6(22):81-94. DOI: elmnet.ir/article/720686-42701
10. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biology. 2017;11. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035
11. Ramzan R, Vogt S, Kadenbach B. Stress-mediated generation of deleterious ROS in healthy individuals - role of cytochrome c oxidase. Journal of Molecular Medicine. 2020;98(5):651-7. DOI: 10.1007/s00109-020-01905-y
12. MacNee W. Pulmonary and Systemic Oxidant/Antioxidant Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proceedings of the American Thoracic Society. 2005;2:50-60. DOI: 10.1513/pats.200411-056SF
13. Thirupathi A, Wang M, Lin J, Fekete G, Bíró I, Baker J, et al. Effect of Different Exercise Modalities on Oxidative Stress: A Systematic Review. BioMed Research International. 2021;2021. DOI: 10.1155/2021/1947928
14. Gomes MJ, Pagan LU, Lima ARR, Reyes DRA, Martinez PF, Damatto FC, et al. Effects of aerobic and resistance exercise on cardiac remodelling and skeletal muscle oxidative stress of infarcted rats. 2020;24(9):5352-62. DOI: 10.1111/jcmm.15191
15. Paes L, Lima D, Matsuura C, de Souza MdG, Cyrino F, Barbosa C, et al. Effects of moderate and high intensity isocaloric aerobic training upon microvascular reactivity and myocardial oxidative stress in rats. PloS one. 2020;15(2):e0218228-e. DOI: 10.1371/journal.pone.0218228

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

16. Frajtabar Z, Fathi R, Nasiri K, Ahmadi F. The Effect of Aerobic Exercise and Ethanol Consumption on Nrf2 Gene Expression in Heart Tissue and Some Antioxidant Indices in Male Rat. Sport Physiology. 2021;13(49):65-88. DOI: 10.22089/spj.2019.7664.1940
17. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition Journal. 2016;15(1): 71. DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5
18. Lestari B, Meiyanto E. A Review: The Emerging Nutraceutical Potential of Pumpkin Seeds. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention. 2018;9:92. DOI: 10.14499/indonesianjcanchemoprev9iss2pp92-101
19. Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. Food Research International. 2009;42(5):641-6. DOI: org/10.1016/j.foodres.2009.02.003
20. shiri E, Rahnema M, Bigdeli M. The effect of pumpkin seed oil (Cucurbita Moschata) on the permeability of the blood-brain barrier and on brain edema in stroke animal model. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2016;8(2): 301-11. DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.2.301
21. Shokohi Rad N, Bagherpour T, Nemati N, Hojati V. The effect of pumpkin seed and endurance training on oxidative stress factors and DNA damage. Daneshvar Medicine: Basic and Clinical Research Journal. 2020;28(3):28-41. DOI: magiran.com/p2164926
22. Nazem F, Hokkamian E, Ranjbar K, Nazari A. The Effects of Aerobic Training on Renal Oxidative Stress in Myocardial Infarction Rats. Sport Physiology. 2017;9(34):79-94. DOI: 10.22089/spj.2017.1887.1241
23. Shams Z, Azarbayjani MA, peeri M, Matin Homaee H. The effect of aerobic training and Vitamin Don GPx concentration and PABin lung tissue of rats exposed to Hydrogen Peroxide. Razi Journal of Medical Sciences. 2020;26(12):156-66. DOI: rjms.iums.ac.ir/article-1-5876-en.html
24. Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H2O2 to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(23):9149. DOI: 10.3390/ijms21239149
25. Shlyonsky V, Boom A, Mies F. Hydrogen Peroxide and Sodium Transport in the Lung and Kidney. BioMed Research International. 2016;2016:1-7. DOI: 10.1155/2016/9512807
26. Mohazab M, Matinhomaee H, Hosseini S, Rahmati-Ahmadabad S. The effects of endurance training and pumpkin seed consumption on oxidative stress and DNA damage markers in the cardiac muscle of rats poisoned with H2O2. 2019;6:12-9. DOI: jbrms.medilam.ac.ir/article-1-453-en.html
27. Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, et al. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. African Health Sciences. 2020;20:413-25. DOI: 10.4314/ahs.v20i1.48

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

28. Yeylaghi Ashrafi M, Dabidi Roshan V. Aerobic and Anaerobic Exercise of the Acute and Chronic and the Selected Markers of Oxidative Stress: A Systematic Review in Human and Animal Studies. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016;22(Special Issue):1126-38. DOI: jsums.medsab.ac.ir/article_834.html
29. Jabbari e, gholami m, nikbakht h, shakeri n, ghazaliyan f. Effect of aerobic training and L-carnitine supplementation on some apoptotic factors in diabetic rat liver. Razi Journal of Medical Sciences. 2019;26(7): 131-40. DOI: 10.18502/ijdo.v12i1.3635
30. Balcı ıı Pepe ,, Guney S, Ç Ö, Revan S. Effects of Gender, Endurance Training and Acute Exhaustive Exercise on Oxidative Stress in the Heart and Skeletal Muscle of the Rat. Chin J Physiol. 2012;55. DOI: 10.4077/CJP.2012.BAA021
31. Shetab-Boushehri S, Samavati-Sharif M, Ravasi A, Kordi M, Minaii B. Effect of oral iron supplementation and endurance training on cytochrome C oxidase activity in rat soleus muscle. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010;2:33-5. DOI: eprints.iums.ac.ir/id/eprint/21291
32. Gorzi A, Ekradi S, Rahmani A. The Effect of 8 Weeks of Sprint Interval Training on Oxidative and Antioxidative Capacity of Heart, Liver and Skeletal Muscle in Male Wistar Rats. Sport Physiology. 2018;10(37): 123-38. DOI: 10.22089/spj.2018.1155
33. Bangsbo J, Krustrup P, González-Alonso J, Saltin B. ATP production and efficiency of human skeletal muscle during intense exercise. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2001; 280:E956-64. DOI: 10.1152/ajpendo.2001.280.6.E956
34. Houghton CR, Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. The effects of physical training on the metabolic response to short-term severe exercise in the rat. Biochemical Journal. 1971;124(5):57P-P. DOI: 10.1042/bj1240057pa
35. Ghanbari-Niaki A, Kraemer R, Abednazari H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. 2011;43 2:112-6. DOI: 10.1055/s-0030-1267998
36. Ramak P, Mahboubi M. The beneficial effects of Pumpkin (Cucurbita pepo L.) seed oil for health condition of men. Food Reviews International. 2019;35(2):166-76. DOI: 10.1080/87559129.2018.1482496
37. Abou Seif HS. Ameliorative effect of pumpkin oil (Cucurbita pepo L.) against alcohol-induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2014;3(3):178-85. DOI: org/10.1016/j.bjbas.2014.08.001
38. Pilch W, Szygula Z, Tyka ,, łałk a T, Tyka ,, Cisoń T, et al. Disturbances in Pro-Oxidant-Antioxidant Balance after Passive Body Overheating and after Exercise in Elevated Ambient Temperatures in Athletes and Untrained Men. PloS one. 2014;9:e85320. DOI: 10.1371/journal.pone.0085320

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

39. Roh H-T, So W-Y. The effects of aerobic exercise training on oxidant–antioxidant balance, neurotrophic factor levels, and blood–brain barrier function in obese and non-obese men. Journal of Sport and Health Science. 2017;6(4):447-53. DOI: 10.1016/j.jshs.2016.07.006

استناد به مقاله

مهذب مهشید، متین‌همایی حسن، حسینی سیدعلی، رحمتی‌احمدآباد صالح. تأثیر هشت هفته تمرین هوازی فزاینده و مکمل بذر کدو بر شاخص‌های فشار اکسایشی بافت ریۀ موش‌های مسموم‌شده با آب اکسیژنه. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۴۰۱؛ ۱۴(۵۳): ۱۷۷-۲۰۲. شناسۀ دیجیتال: 10.22089/SPJ.2021.10524.2137

M. Mohazab, H. Matin Homaei, S. A. Hosseini, S. Rahmati Ahmadabad. The Effect of Eight Weeks of Increasing Aerobic Training and Pumpkin Seed Supplementation on Oxidative Stress Indices of Lung Tissue in Rats Poisoned with Hydrogen Peroxide. Spring 2022; 14(53): 177-202. (In Persian). Doi: 10.22089/SPJ.2021.10524.2137

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License