تأثیر عصاره پرسیاوش بر بیان ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین‌های شوکی-گرمایی ریه رت‌های قرار گرفته در معرض هایپوکسی

مهدی یادگاری[۱]، شادمهر میردار[۲]، غلامرضا حمیدیان[۳]، حسین برنجیان تبریزی[۴]*

۱- دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۲- استاد، دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۳- استادیار، دکترای تخصصی بافت‌شناسی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- استادیار، گروه تربیت بدنی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

*آدرس مکاتبه: کیلومتر ۵ جاده کازرون- بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، بخش تربیت بدنی

تلفن: ۰۹۱۷۷۰۳۴۹۴۶

پست الکترونیک: hberenjeian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۶/۱۱ doi: 10.29252/jmp.4.72.183

چکیده

مقدمه: با وجود مصارف سنتی گیاه پرسیاوش، هنوز تحقیقات بالینی و ورزشی کاملی روی این گیاه ارزشمند صورت نگرفته است.

هدف: هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر عصاره پرسیاوش بر بیان ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین‌های شوکی-گرمایی ریه، در رت‌های قرار گرفته در معرض هایپوکسی بود.

روش بررسی: نمونه‌های پژوهش حاضر را ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار (۸ سر کنترل، ۸ سر هایپوکسی- تمرین و ۸ سر هایپوکسی تمرین مکمل)، کاملاً سالم و بدون سابقه بیماری (سن ۴ هفته و میانگین وزنی ۹±۷۲ گرم) تشکیل دادند. گروه تجربی پس از ۶ هفته تمرین تناوبی، ۳ هفته در محیط هایپوکسی نگهداری شد. نصف رت‌های تجربی در طی ۳ هفته قرارگیری در هایپوکسی، روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره پرسیاوش دریافت کردند. جهت انجام آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی، بافت ریه خارج و سطح پروئین‌های HSP70 و HSP90 اندازه‌گیری شد.

نتایج: در گروه تمرین- هایپوکسی نسبت به گروه کنترل، بیان پروتئین HSP70 و HSP90 به طور معنادار افزایش یافت ($P\leq$ ۰/۰۵). در گروه تمرین – هایپوکسی - مکمل نسبت به گروه تمرین - هایپوکسی، بیان پروتئین HSP70 و HSP90 به طور معنادار کاهش یافت ($P\leq$ ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: تأثیرات کاهشی عصاره پرسیاوش بر بیان پروتئین‌های شوکی گرمایی پارانشیم ریه در شرایط هایپوکسی احتمالاً دلالت بر کاهش شرایط استرس اکسایشی در ریه دارد.

گل‌واژگان: پرسیاوش، پروتئین شوکی گرمایی، ریه، هایپوکسی

مقدمه

کاهش فشار سهمی اکسیژن در دسترس، فعالیت زیستی سلول را به خطر خواهد انداخت. سلول نه تنها در وضعیت های پاتولوژیکی همانند آتروسکلروسیس، آپنه انسدادی خواب، بیماری کوهستان، بیماری‌های مرتبط با ایسکمی و سرطان با هایپوکسی روبه رو می‌شود، بلکه در شرایط فیزیولوژیکی همانند فعالیت ورزشی شدید و رشد جنینی نیز با کمبود اکسیژن مواجه می‌شود [۳-۱]. هایپوکسی عبارتست از کاهش فشار سهمی اکسیژن در سلول به گونه‌ای که عملکرد طبیعی آن دچار اختلال شود. در سال‌های اخیر گام‌های قابل توجهی در درک محققان از مسیرهای مولکولی مهم التهاب ناشی از هایپوکسی در ریه برداشته شده است. همانگونه که در هایپوکسی ناشی از بیماری‌های مزمن دیده شده است، قرارگیری در معرض هیپوباریک هایپوکسی مصنوعی و بروز هایپوکسی آلوئولی، توسعه التهاب و اثرات آپوپتوزی ریه را در پی دارد [۴].

با وجود پژوهش‌های متعددی که در ارتباط با عوارض التهابی- آپوپتوزی- ساختاری هایپوکسی بر بافت ریه به چاپ رسیده است [۹-۵]؛ به تأثیر هایپوکسی بر فاکتورهای محافظتی بافت ریه همچون پروتئین های شوکی-گرمایی (Heat shock proteins) اشاره‌ای نشده است.

پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs) اولین بار در سال ۱۹۶۲ کشف شدند و به آنها به عنوان مجموعه‌ای از پروتئین هایی که تظاهر آنها در اثر شوک گرمایی و مجموعه‌ای از استرس‌های دیگر است، اشاره شده است. این پروتئین‌ها در هر دو سوی سلول‌های هسته‌دار و فاقد هسته وجود دارند که شاخص محافظتی بالای آنها را نشان می‌دهد [۱۰]. پروتئین‌های شوک گرمایی همچنین در فرایندهای اساسی سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. پروتئین‌های شوکی گرمایی به عنوان یک سیگنال خطر در پاسخ به استرس اکسیداتیو، عدم تعادل کلسیمی، تخلیه‌ی گلوکز و گلیکوژن یا کاهش فراهمی گلیکوژن، عناصر سنگین، کاهش PH خون، استرس سرمایی، هایپرترمیا، ورزش و فعالیت بدنی، تعدادی از هورمون‌های استرسی نظیر کورتیزول و کاتکولامین‌ها تولید و در وهله‌ی اول نقش حفاظت از سلول را به عهده دارند [۱۱]. همچنین پژوهش‌ها نشان می‌دهد تمرینات ورزشی با شدت بالا منجر به اختلال در هموستاز بدن شده و با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است [۱۲]. فیشر (Fisher) و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند تمرین تناوبی شدید، تشدید استرس اکسیداتیو سلول را در پی دارد که می‌تواند در بافت ریه منجر به بروز رخداد مرگ سلولی شود [۱۳]. همچنین یادگاری و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند یک دوره تمرین تناوبی شدید منجر به بروز التهاب مزمن در ریه و افزایش سطح IL-6 بافتی می‌شود [۸]. در گزارشی دیگر یادگاری و همکاران (۱۳۹۵) تأیید کردند یک دوره تمرین تناوبی شدید منجر به تغییرات تخریبی در ساختار بافتی ریه می‌شود که از نظر پاتولوژیکی حائز اهمیت است [۷].

حذف و یا به حداقل رساندن عوارض قرارگیری در معرض هایپوکسی یا تمرین ورزشی شدید با مداخله‌های دارویی و تغذیه‌ای ممکن به نظر می‌رسد [۱۴]. مطالعات گیاه-شناسی نشان می‌دهد گیاه دارویی پرسیاوش با دارا بودن عناصر ضد التهابی و ضد اکسایشی مهمی همچون فلاونوئیدها (Flavonoids) و ساپونین (Saponins) ها نقش مؤثری در مهار واکنش‌های التهابی بازی می‌کند و از این نظر ممکن است در کاهش التهاب یا تخریب سلولی مؤثر باشد [۱۵]. با وجود مصارف سنتی گیاه پرسیاوش، هنوز تحقیقات بالینی و ورزشی کاملی روی این گیاه ارزشمند صورت نگرفته است. لذا لازم است با توجه به اثرات گوناگون بیولوژیک و درمانی گزارش شده از گیاه پرسیاوش با ایجاد الگوی بالینی- ورزشی مناسب، از لحاظ بودن در نقش یک مکمل محافظتی ریه در برابر تنش هایپوکسی بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

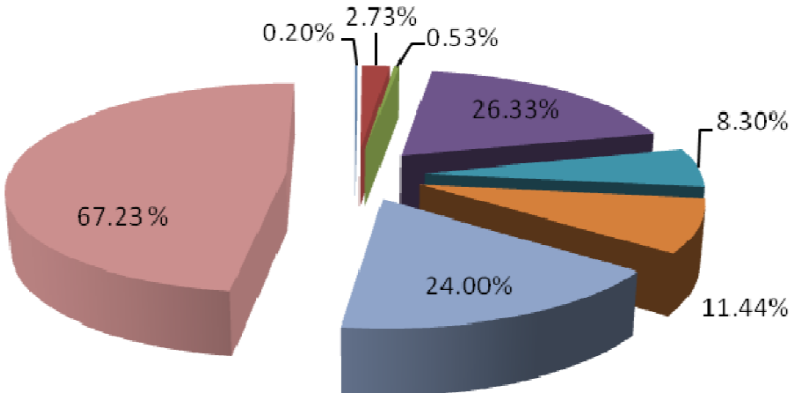
آزمودنی‌های پژوهش حاضر را ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۴ هفته، میانگین وزنی ۸ ±۷۲ گرم) تشکیل داده بودند که از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شده و به آزمایشگاه جانوری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران منتقل شدند و به صورت تصادفی به سه گروه کنترل ۹ هفته (۸ سر)،

تمرین – هایپوکسی (۸ سر) و تمرین – هایپوکسی – مکمل (۸ سر) تقسیم شدند. نمونه‌ها از نظر سلامت بدنی کاملاً سالم و هیچ‌گونه سابقه بیماری نداشتند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی- روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند، سپس به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. در طی پژوهش، غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار نمونه‌ها قرار گرفت.

برنامه تمرین شدید 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 طول می‌کشید. نمونه‌ها ۵ جلسه در هفته تمرین کردند. برنامه تمرین تناوبی شدید با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۷۰ متر بر دقیقه در پایان هفته ششم پایان پذیرفت [۱۶]. پس از پایان مرحله اول پژوهش (فعالیت تناوبی شدید ۶ هفته‌ای)، مرحله دوم پژوهش آغاز شد که ۳ هفته ادامه داشت. در طی این ۳ هفته نمونه‌های تمرین کرده پس از ۶ هفته تمرین تناوبی وارد محیط هایپوکسی (اتاقک کم فشار (Hypoxic chamber) اکسیژن در محیط شبیه‌سازی شده مصنوعی معادل ۲۸۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا) شدند و به مدت ۳ هفته در آنجا نگهداری شدند. نصف نمونه‌ها در طی ۳ هفته قرارگیری در معرض هایپوکسی، عصاره گیاهی پرسیاوش را به صورت گاواژ دریافت کردند. میزان مصرف عصاره پرسیاوش به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز بود [۱۷].

تهیه نمونه گیاهی و عصاره پرسیاوش

اندام هوایی گیاه پرسیاوش شامل برگ و ساقه گیاه در آخر فصل بهار (خردادماه) در اطراف شهرستان ساری در استان مازندران جمع‌آوری و پس از تأیید گیاه توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه مازندران (CJS16111)، نمونه‌های آن در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران نگهداری شد. نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شریط سابه و تهویه مناسب در دمای آزمایشگاه خشک شدند. در ابتدا جهت تهیه عصاره هیدروالکلی پرسیاوش به روش خیساندن، ۵۵ گرم پودر پرسیاوش 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 پورد پرسیاوش هر ۶ ساعت یکبار با میله شیشه‌ای هم زده شد و درنهایت پس از عبور از کاغذ صافی (واتمن ۴۲، آلمان) با استفاده از دستگاه روتاری مدل RV8 V-C ساخت شرکت IKA آلمان، اتانول آن در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد حذف شد (شکل شماره ۱) [۱۸].



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

نمونه‌برداری ریه و تهیه مقاطع بافتی

نمونه‌گیری بافتی از ریه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره پژوهش انجام شد. برای این منظور با تزریق ۳ واحد محلول کتامین (Ketamine) (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) رت‌ها بیهوش [۱۶] و بلافاصله بافت ریه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از سپری شدن ۵ روز از زمان فیکس بافتی، ابتدا با استفاده از تکنیک اورینتیتور و رعایت اصول IUR، برش‌هایی از بافت ریه تهیه و با انجام مراحل پاساژ (با استفاده از دستگاه اتوماتیک هیستوکینت مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت لایکا) و آماده‌سازی قالب‌های پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم دورانی مدل ۸۲۰ برش‌های متوالی به ضخامت ۵ میکرومتر جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. به منظور تعیین اولین مقطع و حداقل فواصل بین مقاطع از نتایج مطالعه پایلوت استفاده شد [۲۰].

مطالعات ایمونوهیستوشیمی

از هر ریه به طور تصادفی پنج برش نازک غیرمتوالی به ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی HSP70 و پنج برش نازک دیگر جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان پروتئینی HSP90 انتخاب شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی به روش انویژن (Envision) و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی HSP70 کد ab45133 و HSP90 کد ab59459 ساخت شرکت ABCAM انجام شد.

روش انجام آزمایش ایمونوهیستوشیمی

در ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS در ۴ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. پس از آن محلول پارا فرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه به بافت اضافه و در ادامه اسیدکلریدریک نرمال نیز به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. آنتی‌بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به بافت اضافه شد و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت، به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. درنهایت به بافت‌ها آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) با رقت ۱ به ۲۰۰ اضافه شد و سپس درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از آن به نمونه‌ها PI اضافه شد و پس از ۵ دقیقه روی نمونه‌ها PBS ریخته شد [۲۱]. درنهایت با میکروسکوپ فلورسانت سلول‌ها ارزیابی و شمارش شدند. با استفاده از دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک ۵ فیلد مختلف انتخاب و تصویربرداری صورت گرفت و درنهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش، با نسخه ۱/۴۹ نرم‌افزار ImageJ مورد آنالیز قرار گرفته و به صورت داده‌های عددی توصیف شدند [۲۲].

روش آماری

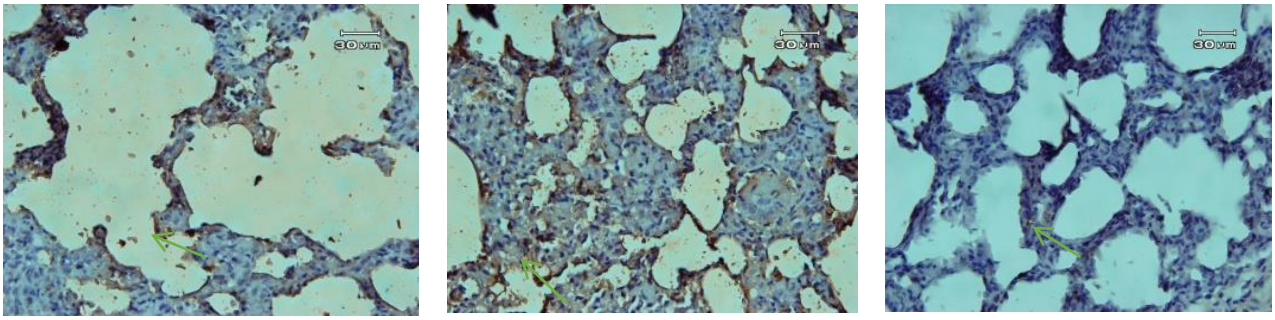
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. جهت اندازه‌گیری میانگین و انحراف استاندارد گروه‌ها از آمار توصیفی و جهت ارزیابی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری کلوموگروف اسمیرنوف (k-s) استفاده شد. از آزمون آمار استنباطی تحلیل واریانس یک طرفه نیز جهت مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS.21 و در سطح معناداری P≤ ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

تحلیل آماری نشان داد در گروه تمرین - هایپوکسی نسبت به گروه کنترل، بیان پروتئین HSP70 پارانشیم ریوی به طور معنادار افزایش یافت (۳۵۵/۵۵ درصد، P≤ ۰/۰۵). در گروه تمرین – هایپوکسی - مکمل نسبت به گروه تمرین - هایپوکسی، بیان پروتئین HSP70 به طور معناداری کاهش نشان داد (۴۸/۱۷ درصد، P≤ ۰/۰۵، اندازه اثر: ۰/۴۱)، (نمودار شماره ۱، تصاویر شماره ۱).

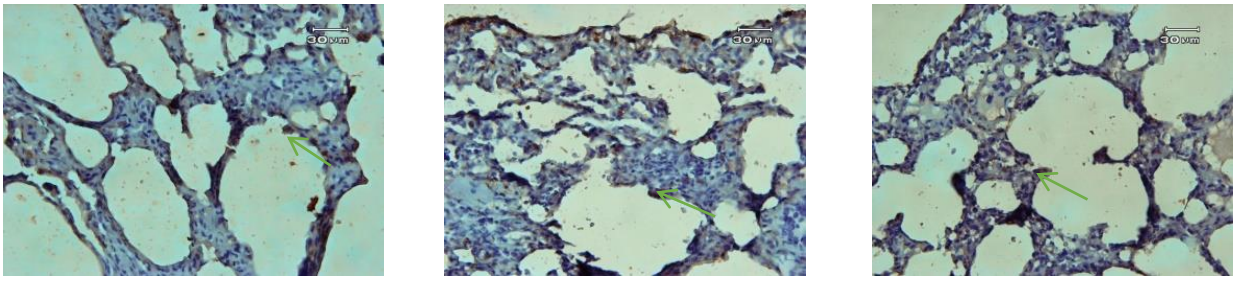
در گروه تمرین - هایپوکسی نسبت به گروه کنترل، بیان پروتئین HSP90 پارانشیم ریوی به طور معنادار افزایش یافت (۱۸۹ درصد، P≤ ۰/۰۵، اندازه اثر: ۰/۲۵). در گروه تمرین - هایپوکسی مکمل نسبت به گروه تمرین - هایپوکسی، بیان

پروتئین HSP90 به طور معناداری کاهش نشان داد (۴۰/۷۰ درصد، ۰/۰۵ ≥P)، (نمودار شماره ۲، تصاویر شماره ۲).



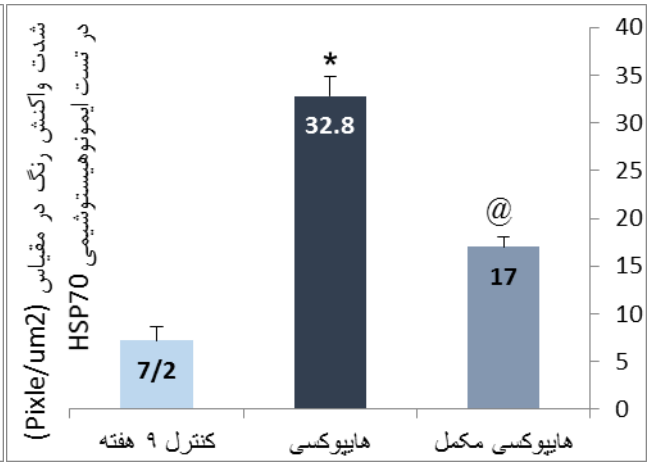
کنترل　　هایپوکسی　　هایپوکسی مکمل

تصاویر شماره ۱- میکروگراف از بافت ریه گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه HSP70 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 400× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر (واکنش رنگ قهوه‌ای) نشانه واکنش مثبت برای حضور آنتی‌بادی می‌باشد.

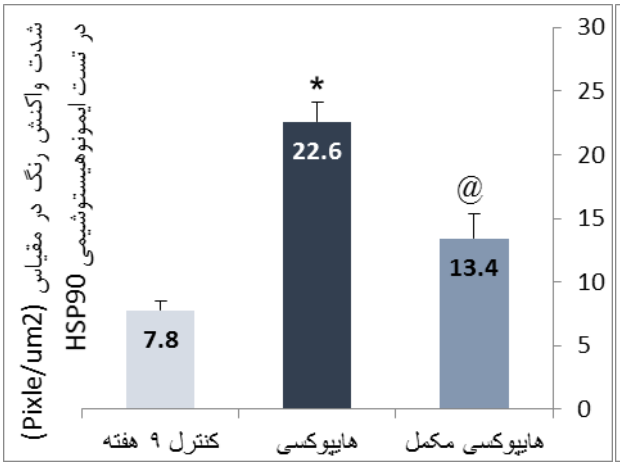


هایپوکسی مکمل　　هایپوکسی　　کنترل

تصاویر شماره ۲- میکروگراف از بافت ریه گروه‌های پژوهش. آنتی‌بادی ثانویه HSP90 به رنگ FITC متصل شده است و هسته سلول با رنگ PI رنگ‌آمیزی شده است. بزرگنمایی تصاویر در مقیاس 400× صورت گرفته است. فلش موجود در تصاویر (واکنش رنگ قهوه‌ای) نشانه واکنش مثبت برای حضور آنتی‌بادی می‌باشد.



شکل شماره ۱- میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین HSP70 پارانشیم ریوی. داده ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. * تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل. @ تفاوت معنادار نسبت به گروه هایپوکسی (۰/۰۵ ≥P).



شکل شماره ۲- میانگین و خطای استاندارد سطح پروتئین HSP90 پارانشیم ریوی. داده‌ها بر حسب میانگین± خطای استاندارد و با مقیاس شدت رنگ در واحد پیکسل بر میکرومتر مربع (Pixle/um2) گزارش شده است. * تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل. @ تفاوت معنادار نسبت به گروه هایپوکسی (۰/۰۵ ≥P).

بحث

پژوهش حاضر نخستین مطالعه‌ای است که به بررسی تأثیر عصاره پرسیاوش بر سطوح پروتئین‌های حفاظتی ریه (HSP70 - HSP90) در ریه نمونه‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هایپوکسی پرداخته است. یافته‌ها نشان داد سطح پروتئین‌های HSP70 و HSP90 در نمونه‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هایپوکسی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. همچنین نتایج مشخص کرد ۳ هفته مصرف عصاره پرسیاوش در نمونه‌های قرار گرفته در معرض هایپوکسی سطح پروتئین‌های HSP70 و HSP90 را به طور معناداری کاهش می‌دهد. در این راستا پژوهش‌هایی صورت گرفته است که عموماً نتایج همسو با پژوهش حاضر دارند، اما در پیشینه پژوهش، به بررسی تأثیر عصاره پرسیاوش بر پروتئین‌های HSP70 و HSP90 بافت ریه نمونه‌های تمرین کرده و قرار گرفته در معرض هایپوکسی مزمن پرداخته نشده است.

پژوهش‌ها نشان داده‌اند اجرای تمرینات شدید و قرارگیری در معرض هایپوکسی مزمن سبب آسیب اپیتلیال و افزایش التهاب در مخاط تنفسی می‌شود. فعالیت‌های شدید ورزشی با ایجاد هایپوکسی موقت و خونرسانی مجدد به بافت‌های متابولیک در دوره استراحت، شرایط افزایش رادیکال‌های آزاد را فراهم می‌آورند [۲۴، ۲۳]. همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از تولید افراطی ROS در هایپوکسی می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به بافت وارد نماید [۲۵]. بنابراین اگر هایپوکسی مزمن و فعالیت ورزشی شدید باشد و از طرفی فرصت بازسازی و ریکاوری مطلوب به سلول‌ها داده نشود، تولید زیاد رادیکال‌های آزاد، تضعیف دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی، آسیب به چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و تکه تکه شدن DNA را در پی‌دارد. شرایطی که به حضور عوامل التهابی و پروتئین‌های شوکی گرمایی همچون HSP70 و HSP90 در موضع منجر می‌شود [۲۶، ۸].

محققان گزارش کرده‌اند افزایش سطح HSP70 و HSP90 نقش مهمی در ترمیم سلولی، ریمدلینگ بافتی و محافظت از ساختار پروتئینی بافت را بر عهده دارند [۲۷]. از طرفی مشخص شده است پروتئین‌های شوکی گرمایی به طور مستقیم در فعالیت‌های بیولوژیکی همچون تسهیل یکپارچگی پروتئین-ها، انتقال پروتئین‌ها از عرض غشاء سلول، اتصال به پروتئین-های تخریب شده و کمک به فعال‌سازی مجدد، ترمیم و طراحی کمپلکس‌های پروتئینی، جلوگیری از انباشت پروتئین-های ناپایدار و تسریع در بهبود سلول‌هایی که در معرض استرس‌هایی نظیر گرمایی و استرس اکسیداتیو قرار گرفته‌اند می‌باشد [۲۸]. در تأیید این گزارش‌ها، نشان داده شده است منابع خارج سلولی و داخل سلولی گونه‌های اکسیژنی، کلسیم آزاد داخل سلولی، فعال شدن پروتئازها و فعال شدن کمپلمان‌ها در تحریک بیان پروتئین‌های شوکی گرمایی مؤثر هستند [۱۱].

همچنین از دیگر سازوکارهای مؤثر در افزایش بیان پروتئین‌های شوکی گرمایی HSP70 و HSP90 در این پژوهش را شاید بتوان به تحریک فعالیت‌های پیش آپوپتوزی ناشی از هایپوکسی و فعالیت تناوبی شدید در بافت ریه دانست. مشخص شده است خانواده HSP نقش مهمی در فرآیندهای مرتبط با حیات سلول داشته و به عنوان ملازم مولکولی سایر پروتئین‌ها عمل می‌کنند. همچنین این پروتئین‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی دارند و به تاخوردگی اولیه و مجدد پروتئین‌ها کمک می‌کنند و سبب محافظت هسته سلول‌ها و غشای لیپیدی در مقابل آسیب‌های مکانیکی و متابولیکی می‌شوند و درنهایت و از آپوپتوزیس سلولی جلوگیری می‌کنند [۲۹].

از دیگر یافته‌های پژوهش حاضر کاهش محسوس سطح پروتئین‌های HSP70 و HSP90 ریه با مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هایپوکسی بود. به نظر می‌رسد مصرف عصاره پرسیاوش در محیط هایپوکسی از شرایط استرس اکسایشی بافت ریه کاسته باشد و از این رو با کاهش شرایط التهابی و کاهش آسیب مکانیکی در بافت، زمینه را برای کاهش بیان پروتئین‌های محافظتی که در پاسخ به استرس سلول بالا می‌روند را کاهش داده باشد.

ارزیابی فیتوشیمیایی پرسیاوش نشان از حضور مجموعه‌ای

از ترکیبات از جمله فلانوئیدها (flavonoids)، تری ترپنوئیدها (triterpenoids)، فنیل پروپانوئیدها (phenylpropanoids)، اولی آننس‌ها (oleananes)، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها (carotenoids) و آلاسایکلیس‌ها (alicyclics) در این گیاه دارویی دارد. همچنین برگ پرسیاوش دارای موسیلاژ (*Mucilage*)، قند، اسید گالیک (Gallic acid)، تانن (*tannin*)، اسانس و ماده‌ای تلخ به نام کاپیلارین (Capillarine) است. بسیاری از ترکیبات یاد شده توانایی خنثی سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش التهاب را دارا هستند. TNF-α یکی از سایتوکاین‌های قوی در بروز آپوپتوز مرتبط با گیرنده‌های مرگ سلولی است. در تأیید این فرضیات، مشاهده شد عصاره پرسیاوش توانایی مهار تولید PGE2 ناشی از عملکرد LPS (Lipopolysaccharides) و همچنین مهار تولید TNF-α و IL-6 در مونوسیت/ماکروفاژ را دارد. گزارش شده که بخش مهمی از این تأثیرات مهاری ناشی از غیرفعال سازی NF-κB است [۳۰]. مطالعات نشان می‌دهد p38 (mitogen-activated protein kinases) برای نسخه‌برداری NF-κB ناشی از تحریک TNF ضروری است. در همین راستا نتایج گزارش می‌کنند که عصاره پرسیاوش ممکن است به طور انتخابی بر فسفریلاسیون p38 MAPK اثرگذار باشد و تأثیر مهاری بر آن داشته باشد [۳۰].

همسو با این گزارش‌های کومار (Kumar) و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ پرسیاوشان در مقابل آسیب ناشی از القای هیدروژن پراکسید در لنفوسیت‌های خون محیطی پرداختند. تجویز عصاره برگ پرسیاوشان به مدت ۱۸ ساعت تأثیرات مهاری قابل ملاحظه‌ای بر پراکسیداسیون لیپید داشت و توانست فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و محتوای گلوتاتیونی را به طور معناداری افزایش دهد. محققان گزارش کردند که این تأثیرات پرسیاوشان احتمالاً به علت عملکرد مستقیم آن در مهار رادیکال‌های آزاد و درنتیجه بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد [۳۱].

در تأیید این یافته‌ها جیانگ و همکاران (Jiang) (۲۰۱۱) مطالعه‌ای را به منظور ارزیابی فعالیت ضداکسایشی فلاونوئیدهای مشتق از پرسیاوشان (FA) انجام دادند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی FA خالص مورد ارزیابی قرار گرفت و با آنتی اکسیدان‌های مصنوعی در توانایی مهار DPPH (1, 1-diphenyl1-2-picryl-hydrazyl) رادیکال آزاد، توانایی مهار آنیون سوپراکسید و قابلیت کیلیت (chelating) فریوزن در شرایط آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی FA تقریباً برابر یا مقداری بیشتر از فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی از جمله BHT (butylated hydroxytoluene)، EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) و اسید اسکوربیک بود [۳۲].

بررسی‌ها نشان می‌دهد برگ پرسیاوشان غنی از مولکول های مهارکننده رادیکال‌های آزاد همانند ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و تانن است و اثر آنتی‌اکسیدانی پرسیاوشان با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد همانند اسید اسکوربیک قابل مقایسه است. همچنین در برگ پرسیاوش فلزات سنگین مورد ردیابی قرار گرفته‌اند و نشان داده شده است که عناصری همانند کلسیم، منیزیم، پتاسیم، منگنز، روی و مس در غلظت‌های بالایی در برگ پرسیاوشان یافت می‌شود که احتمالاً قابلیت‌های بارزی در فعالیت‌های ضد اکسایشی و مهار رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند [۱۹].

نتیجه‌گیری

تأثیرات افزایشی تمرین شدید و هایپوکسی بر بیان پروتئین های محافظتی HSP70 و HSP90 پارانشیم ریه و تأثیرات کاهشی عصاره پرسیاوش بر بیان پروتئین‌های مذکور در شرایط هایپوکسی نتیجه‌گیری کلی پژوهش حاضر می‌باشد. افزایش سطح پروتئین‌های محافظتی ریه پس از یک دوره تمرین شدید و قرارگیری در محیط هایپوکسی هم می‌تواند نشان از افزایش قابلیت سیستم دفاعی ریه داشته باشد و هم دلیلی باشد بر پاسخ ریه در جهت تعدیل استرس تمرینی – هایپوکسی. کاهش سطح پروتئین‌های HSP70 و HSP90 با مصرف پرسیاوش در شرایط هایپوکسی، احتمالاً دلیلی بر برگشت نسبی هموستاز ریه به شرایط طبیعی باشد.

با توجه به اجتناب‌ناپذیر بودن استفاده از تمرینات تناوبی شدید و استفاده از محیط‌های فیزیولوژیکی غیرمتعارف مانند ارتفاع در جهت بهبود نتایج ورزشی یا مأموریت‌های نظامی و یا وجود هایپوکسی مزمن در بسیاری از بیماری‌های التهابی ریه، به نظر می‌رسد استفاده از عصاره‌های گیاهی آنتی‌اکسیدانی همچون پرسیاوش می‌تواند در حفظ هموستاز ریه مؤثر واقع شود.

منابع

1. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148 (3): 399-408.

2. Majmundar AJ, Wong WJ and Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*. 2010; 40 (2): 294-309.

3. Richalet J-P, Larmignat P, Poitrine E, Letournel M and Canouï-Poitrine F. Physiological risk factors for severe high-altitude illness: a prospective cohort study. *American J. Respiratory and Critical Care Medicine* 2012; 185 (2): 192-8.

4. Majmundar AJ, Wong WJ and Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell* 2010; 40: 294-309.

5. Yadegari M, Mirdar S and Hamidian G. The impact of three weeks taper in hypoxic environment on apoptotic index of Bax / Bcl2 and pulmonary alveolar epithelial cell population. 10th international conference of Tehran. 2017; 10.22089/10thconf.2017.680.

6. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidiyan GH, Yousefpour M and Riyahi F. Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli, followed by six weeks of high intensity exercise training. *Daneshvar Medicine* 2016; 24 (129): 31-40.

7. Yadegari M, Mirdar S and Hamidian G. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. *Daneshvar Medicine* 2016; 23 (124): 51-60.

8. Yadegari M, Riahi S, mirdar S, Hamidiyan G and Mosadegh P. investigatingof IL-6 level and lung inflammatory cells after performing high-intensity interval training and Exposure to hypoxic environment. *SJE*. 2016; 18 (3): 26-36.

9. Yadegari M, Riahi S, Mirdar S, Hamidian G and Mosadegh zavaragh P. Effect of the Adiantum capillus Veneris Extract on Bax and Bcl2 Apoptotic Markers of Lung Modulation in Trained Rats and Exposed to Hypoxic Stress. *Journal of Medicinal Plants* 2018; 4 (64): 162-71.

10. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovascular Res*. 2001; 51 (4): 637-46.

11. Asea AA and Pedersen BK. Heat shock proteins and whole body physiology: Springer Science & Business Media; 2009, pp: 38-45.

12. Packer N, Pervaiz N and Hoffman-Goetz L. Does exercise protect from cognitive decline by altering brain cytokine and apoptotic protein levels? A systematic review of the literature. *Exerc. Immunol. Rev*. 2010; 16: 138-62.

13. Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Gomulkiewicz A, Kisiela D, Dolinska-Krajewska B, Jethon Z and et al. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors. 2006, 11-17.

14. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. *Scandinavian J. Medicine & Science in Sports* 2010; 20 (s2): 24-31.

15. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J and et al. Ethanol extract of *Adiantum*

capillus-veneris L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 147 (3): 603-11.

16. Mehdi YA SM and GholamReza HA. The effect of high-intensity interval training on lung parenchymal and non-parenchymal structural changes. *Daneshvar Medicine* 2016; 23 (124): 51-60.

17. Nilforoushzadeh MA, Javanmard SH, Ghanadian M, Asghari G, Jaffary F, Yakhdani AF and et al. The effects of Adiantum capillus-veneris on wound healing: An experimental in vitro evaluation. *International J. Preventive Medicine* 2014; 5 (10): 1261.

18. Wendakoon C, Calderon P and Gagnon D. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *J. Medicinally Active Plants* 2012; 1 (2): 60-8.

19. Rajurkar N and Gaikwad K. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and elemental content of Adiantum capillus veneris leaves. *J. Chemical and Pharmaceutical Res.* 2012; 4 (1): 365-74.

20. Schneider JP and Ochs M. Stereology of the lung. *Methods in Cell Biol*. 2012; 113: 257-94.

21. Hofman F. Immunohistochemistry. Current Protocols in Immunol. 2002, 21.4. 1-.4. 3.

22. Di Cataldo S, Ficarra E, Acquaviva A and Macii E. Automated segmentation of tissue images for computerized IHC analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2010; 100 (1): 1-15.

23. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H and et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37 (4): 480-7.

24. Lawler HM, Underkofler CM, Kern PA, Erickson C, Bredbeck B and Rasouli N. Adipose tissue hypoxia, inflammation, and fibrosis in obese insulin-sensitive and obese insulin-resistant subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016; 101 (4): 1422-8.

25. Fisher-Wellman K and Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine* 2009; 8 (1): 1.

26. Eltzschig HK and Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *New England J. Medicine* 2011; 364 (7): 656-65.

27. Paulsen G, Vissing K, Kalhovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F and et al. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2007; 293 (2): R844-R53.

28. Nixon B, Bromfield EG, Cui J and De Iuliis GN. Heat Shock Protein A2 (HSPA2): Regulatory Roles in Germ Cell Development and Sperm Function. The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function: Springer; 2017, pp: 67-93.

29. Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J and et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J. Applied Physiol*. 2004; 97 (2): 605-11.

30. Yuan Q, Zhang X, Liu Z, Song S, Xue P, Wang J and et al. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF-κB activation. *J. Ethnopharmacol*. 2013; 147 (3): 603-11.

31. Kumar A. Antioxidant effect of Adiantum capillus-veneris Linn. on human lymphocyte: an in vitro study. *J. Cell and Tissue Res*. 2009; 9 (2): 1899-902.

32. Jiang M-Z, Yan H, Wen Y and Li X-M. In vitro and in vivo studies of antioxidant activities of flavonoids from *Adiantum capillus-veneris* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 2011; 5 (18): 2079-85.

Effect of the *Adiantum capillus-veneris* Extract on Immunohistochemical Expression of Lung Heat-Shock Proteins in Rats Exposed to Hypoxia

Yadegari M (Ph.D.)[1], Mirdar Sh (Ph.D.)[2], Hamidian GhR (Ph.D.)[3], Berenjeian Tabrizi H (Ph.D.)[4*]

1- PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
2- Professor, PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences,University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
3- Assistant Professor, PhD of Histological, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
*Corresponding author: Department of Physical Education and Sport Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
Tel: +98-917-7034946
Email: hberenjeian@gmail.com

Abstract

Background: Despite the traditional use of the *Adiantum capillus-veneris* plant, there is little evidence of its clinical effects.

Objective: The purpose of the present study was to investigate the effect of the *Adiantum capillus-veneris* extract on Immunohistochemical expression of Lung heat-Shock Proteins in rats exposed to hypoxia.

Methods: Twenty-four male Wistar rats (control: 8, training-hypoxia: 8, training-hypoxia-supplement: 8) without clinically evident disease were used. The rats were exposed to hypoxia environment for 3 week following 6 weeks interval training. Tweleve of the experimental samples were taken 500 ml Adiantum capillus-veneris extract per body weight (kg) in during exposure to hypoxia environment. Finally lung tissue was removed for immunohistochemistry tests of HSP70 and HSP90. To analyze of data, ANOVA test was used ($\alpha \leq 0.05$).

Results: Expression of HSP70 and HSP90 increased significantly in hypoxia group comparison with the control group ($P \leq 0.05$). Expression of HSP70 and HSP90 protein decreased significantly in the Supplement hypoxia group comparison with the hypoxia group ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Reduction effects of Adiantum capillus-veneris extract on expression of the parenchyma lung heat- shock protein in hypoxia conditions was observed that probably indicate decreased oxidative stress in the lung.

Keywords: *Adiantum capillus-veneris*, Heat shock protein, Hypoxia, Lung