

تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده و مصرف مکمل ویتامین C بر سطوح سرمی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در موش ویستار

امین اعتمادی بروجنی^۱، مهدی کارگرفرد^۲، حجت‌اله علایی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اطلاعات اندکی در خصوص اثرات تمرین در هوای آلوده به همراه مصرف ویتامین C بر روی عوامل پلازما وجود دارد. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر ۱۲ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده و مصرف ویتامین C بر سطوح سرمی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در موش‌های نژاد Wistar بود.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی تجربی، ۵۰ موش نر نژاد Wistar به طور تصادفی در پنج گروه شامل تمرین، تمرین-مکمل، تمرین-آلودگی، تمرین-آلودگی-مکمل و شاهد قرار گرفتند. برنامه‌ی تمرین شامل ورزش هوازی به مدت ۴۰ دقیقه با شدت ۸۰-۶۵ درصد سرعت بیشینه به مدت ۱۲ هفته و ۵ جلسه در هفته بود. میزان مکمل مصرفی در گروه‌های دریافت کننده، ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز به صورت خوراکی از طریق گاواژ بود. سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در پایان مطالعه با استفاده از ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: سطح اندوتلین-۱ در گروه‌های هوای آلوده به طور معنی‌داری افزایش نشان داد، اما ویتامین C توانست میزان اندوتلین-۱ را کاهش دهد ($P < 0.05$). سطح نیتریک اکسید در گروه تمرین در هوای آلوده افزایش چشم‌گیری داشت. این نتایج، تفاوت معنی‌داری با گروه تمرین در هوای آلوده به همراه مصرف ویتامین C داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، مصرف ویتامین C در هنگام مواجهه با آلودگی هوا، در کاهش سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱ مؤثر است. تأثیر تمرین و هوای آلوده بر نیتریک اکسید معنی‌دار است و ویتامین C، تنها در گروه تمرین-آلودگی توانست باعث کاهش نیتریک اکسید شود.

واژگان کلیدی: اندوتلین-۱؛ نیتریک اکسید؛ آلودگی هوا؛ ویتامین C؛ تمرین هوازی

ارجاع: اعتمادی بروجنی امین، کارگرفرد مهدی، علایی حجت‌اله. تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده و مصرف مکمل ویتامین C بر سطوح سرمی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در موش ویستار. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۷۶): ۳۳۹-۳۴۶.

مقدمه

در دهه‌های اخیر، افزایش مصرف سوخت‌های فسیلی، باعث تشدید آلودگی هوا و محیط زیست گردیده است (۱). آلاینده‌های موجود در هوا، باعث تأثیر سوء بر دستگاه‌های تنفسی و قلبی-عروقی می‌شوند (۲). آلاینده‌ها در دو دسته‌ی عمده طبقه‌بندی می‌شوند: ۱- مواد آلوده کننده‌ی اولیه که به طور مستقیم تولید می‌شوند و شامل مونوکسیدکربن (CO)، اکسیدهای سولفور (SO_x)، اکسیدهای نیتروژن (NO_x)، هیدروکربن‌ها و ذرات معلق می‌باشند. ۲- آلوده کننده‌های ثانویه مانند ازن (O₃)، نترات پروکسی استیل (PAN)، آلدهیدها، اسید

سولفوریک (H₂SO₄) و سولفات‌ها که از راه تأثیر متقابل بین مواد اولیه و محیط به وجود می‌آیند. دود یا ابر قهوه‌ای که به طور معمول با برخی از نواحی شهرهای بزرگ در ارتباط است، هر یک از آلاینده‌های اولیه و یا ثانویه را در بر می‌گیرد (۳).

پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که میزان قابل تحمل آلودگی هوا در حیوانات و انسان، به طور قابل توجهی از میزان قابل قبول در پژوهش‌های گذشته، کمتر است (۴). قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا برای مدت کوتاه نیز می‌تواند باعث بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و یا تشدید بیماری‌های عروق محیطی شود (۵).

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: امین اعتمادی بروجنی؛ دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: eatemady@gmail.com

عملکرد اندوتلیالی در عروق بدن دارد (۱۰).

همانند تمامی مکانیسم‌های هموستازی بدن، تعامل بین اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید باید در وضعیت تعادل باشد تا سیستم عروقی به خوبی فعالیت کند و هنگامی که تعادل بین این دو عامل به هم می‌خورد، حالت‌های پاتولوژیک همچون اختلال عملکرد اندوتلیالی به وقوع می‌پیوندد. اگر چه به طور معمول، اختلال عملکرد اندوتلیالی با کاهش ترشح نیتریک اکسید شناخته می‌شود، افزایش ترشح اندوتلین-۱ نیز می‌تواند باعث این آسیب گردد (۱۱).

فعالیت ورزشی هوازی بلند مدت، می‌تواند میزان اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید پلازما را تحت تأثیر قرار دهد. این تأثیر، شامل افزایش چشم‌گیر در میزان نیتریک اکسید تولید شده و کاهش معنی‌دار در میزان اندوتلین-۱ ترشح شده است (۱۰). در پاسخ به استرس برشی ایجاد شده بر دیواره‌ی عروق توسط ورزش سلول‌های اندوتلیوم عروق به آزادسازی نیتریک اکسید می‌پردازند و باعث گشاد شدن عروق می‌گردند (۱۲). در مقابل، آلودگی هوا تأثیرات معکوسی بر این دو ماده دارد و باعث کاهش تولید نیتریک اکسید (۱۰) و افزایش تولید و حتی افزایش بیان ژن اندوتلین-۱ می‌گردد (۱۳).

از دیگر عوامل مؤثر بر روی میزان آزادسازی نیتریک اکسید و اندوتلین-۱، مکمل‌ها هستند. از این دست مکمل‌ها، می‌توان به ویتامین C اشاره نمود. غیر فعال شدن ترشح نیتریک اکسید اندوتلیومی توسط رادیکال‌های آزاد (Free radicals)، باعث ایجاد پرفشاری خون اولیه می‌شود. مشاهده شده است که این نوع از اختلال، در رگ‌گشایی اندوتلیالی توسط آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون ویتامین C قابل بهبود می‌باشد (۱۴).

تحقیقات کافی برای بررسی تأثیر سه عامل تمرین هوازی، آلودگی هوا و مکمل ویتامین C، بر روی میزان سطوح نیتریک اکسید و اندوتلین-۱ انجام نشده است. از این رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی هوازی، آلودگی هوا و مصرف مکمل ویتامین C بر روی سطوح سرمی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در موش‌های نر نژاد Wistar انجام شد.

روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون بود و با حضور گروه شاهد انجام شد. در این پژوهش، تعداد ۵۰ موش نر نژاد Wistar، در ۵ گروه تقسیم شدند و گروه‌ها تحت تأثیر متغیرهای تمرین هوازی، آلودگی هوا و مکمل ویتامین C قرار گرفتند. در ابتدای پژوهش، موش‌ها سن ۸ هفته داشتند. وزن موش‌ها 135 ± 5 گرم بود. این پژوهش در کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه اصفهان با کد IR.UI.REC.1398.076 تأیید شد.

اگر چه اندوتلیوم تنها یک لایه‌ی ساده از سلول‌ها است، اندوتلیوم سالم می‌تواند تأثیرات چشم‌گیری در پاسخ‌های فیزیولوژیک داشته باشد. از جمله، می‌توان به سیگنال‌های شیمیایی مختلفی اشاره کرد که می‌توانند تون عروقی، مقاومت در برابر لخته شدن خون، چسبندگی سلولی، تکثیر سلول عضله‌ی صاف و التهاب دیواره‌ی عروق را تحت الشعاع قرار دهند. اندوتلیوم با آزادسازی مواد شیمیایی وازوکانستریکتور (Vasoconstrictor) یا وازودیلاتور (Vasodilator) بر روی تونسیته‌ی عروقی، تأثیر می‌گذارد. از جمله وازودیلاتورهای مهم ترشح شده از اندوتلیوم، می‌توان به نیتریک اکسید و پروستاگلین (Prostacyclin) اشاره کرد. NO (Nitric Oxide) از ال-آرژنین (L-Arginine) و توسط عمل eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) تولید می‌شود (۶). جریان سریع خون در رگ، باعث ایجاد تنش برشی (Shear Stress) بر روی سلول‌های اندوتلیالی می‌شود. این تنش سلول‌های اندوتلیالی را در جهت جریان خون کج می‌کند، این امر باعث تحریک ترشح نیتریک اکسید از این سلول‌ها می‌شود. ترشح نیتریک اکسید باعث افزایش قطر رگ‌ها شده و جریان خون را تسهیل می‌کند. بدون این پاسخ تأثیر کنترل موضعی جریان خون به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۷). به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر نیتریک اکسید، اندازه‌گیری مستقیم آن نسبتاً مشکل است، لذا با استفاده از متابولیت‌های پایدار آن یعنی نیتریت و نیترات اندازه‌گیری می‌شود و این سنجش یک تضمین قابل قبول از برون ده نیتریک اکسید در محیط *in vivo* فراهم می‌آورد (۸). از جمله مواد منقبض کننده‌ی عروق آزاد شده از اندوتلیوم، می‌توان به اندوتلین-۱ (Endothelin-1) و آنژیوتانسین-۲ (Angiotensin II) اشاره کرد (۷). یکی از قدرتمندترین منقبض کننده‌ی عروق ترشح شده از اندوتلیوم، اندولین-۱ است. اندوتلین-۱، یک پپتید بزرگ و شامل ۲۱ اسید آمینه و دارای دو گیرنده بر روی عضلات صاف عروق به نام‌های ET_A و ET_B می‌باشد. حدود ۸۵ درصد از گیرنده‌های اندوتلین-۱ را گیرنده‌های ET_A تشکیل می‌دهند (۹). موارد مختلفی از افزایش میزان اندوتلین-۱ در نمونه‌های انسانی و حیوانی پس از قرارگیری در معرض آلودگی مشاهده شده است. همچنین، مشاهده شده است که اندوتلین-۱ به طور مستقیم در پیشرفت بیماری‌های قلبی-عروقی مؤثر است. از دیگر محرک‌های آزادسازی اندوتلین-۱، آسیب وارده به دیواره‌ی عروق و اندوتلیوم را می‌توان نام برد (۶). دو عامل NO و اندوتلین-۱ ($ET-1$) بر خلاف یک دیگر عمل می‌کنند و باعث به وجود آمدن هموستاز عروقی می‌گردند و اختلال در تولید هر یک از این دو ماده، باعث اختلال در هموستاز عروقی و در نهایت، اختلال در عملکرد اندوتلیالی می‌گردد (۷). قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا، همچنین ارتباط مستقیمی با

۱۵-۱۰ قطعه در هر میلیون (Part per million یا ppm)، دی‌اکسید نیتروژن ۰/۶-۰/۳ قطعه در هر میلیون و برای دی‌اکسید گوگرد میزان ۰/۱ ± ۰/۵ قطعه در هر میلیون در روزهای آلوده شهر اصفهان گزارش شده بود (۱۸). میزان محاسبه شده‌ی گاز برای مونوکسیدکربن، ۹۵ میلی‌لیتر، دی‌اکسید نیتروژن ۴/۳ میلی‌لیتر و برای دی‌اکسید گوگرد ۴/۸ میلی‌لیتر بود که توسط سرنگ گاز از مخازن برداشت و به محیط اتاقک ایزوله تزریق گردید. میزان غلظت آلاینده‌ها توسط دستگاه مربوط (Series 200, Aeroqual شرکت نیوزلند) با دقت ۰/۱ قطعه در هر میلیون، به طور مداوم در طول پژوهش مورد پایش قرار گرفت.

محقق با استفاده از یک ماسک تمام صورت در محیط حضور داشت و بر تمرین موش‌ها نظارت می‌نمود. تمامی موش‌های گروه‌های آلودگی در زمان تمرین هر دو گروه، در آلودگی به سر می‌بردند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی، موش‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین، با نسبت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن کتامین و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم زایلازین (۱۹)، بیهوش شدند و میزان ۲/۵ میلی‌لیتر خون از اپکس قلب موش‌ها استخراج شد. نمونه‌های خون استخراج شده در بازه‌ی زمانی ۳۰ دقیقه پس از خون‌گیری، با شدت ۲۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و دور دوم سانتریفیوژ، در دمای اتاق با شدت ۲۵۰۰ g برای ۱۵ دقیقه انجام شد تا پلاسماي خون به طور کامل جدا گردد (۲۰). تمامی نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر با دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

میزان ظهور نیتریک اکسید در نمونه‌های پلازما استفاده از کیت ناتریکس با حساسیت ۰/۰۱ و بازه‌ی ۱۲۰-۰ میکرومول/میلی‌لیتر (شرکت نوند سلامت، ایران) و میزان اندوتلین-۱ با استفاده از کیت ET-1 با حساسیت ۰/۰۲ و بازه‌ی ۲۰۰-۲ نانوگرم/لیتر (شرکت Eastbiopharm، چین) اندازه‌گیری شد. هر دو کیت برای استفاده در تکنیک ELISA طراحی شده بودند.

در این تحقیق، تمامی داده‌ها به شکل میانگین و انحراف معیار توصیف شدند. از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و توصیف داده‌ها استفاده گردید. از آزمون Shapiro-Wilk برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها استفاده شد (۲۱). با توجه به طبیعی بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل آماری، از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Least significant difference (LSD) استفاده شد. در گروه‌های مورد مطالعه، سطح معنی‌داری برای تمام تحلیل‌های آماری $P < ۰/۰۵۰$ در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه‌ی ۸ انجام گرفت.

پس از تهیه‌ی موش‌های مورد نیاز برای انجام پژوهش، تمامی حیوانات مدت یک هفته را به منظور آشناسازی با محیط نگهداری سپری کردند. پس از آن، تمامی موش‌ها به مدت یک هفته (۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر/دقیقه و ۵ روز در هفته) با دویدن بر روی نوار گردان آشنا شدند. سپس، موش‌ها بعد از ۴۸ ساعت استراحت تحت آزمون سنجش بیشینه‌ی سرعت قرار گرفتند. آزمون بیشینه‌ی سرعت با سرعت ۳ متر در دقیقه شروع می‌شد و بعد از هر سه دقیقه، به میزان ۳ متر/دقیقه به سرعت افزوده می‌شد. افزایش سرعت تا زمان واماندگی نمونه‌ی حیوانی ادامه داشت. این سرعت به عنوان سرعت بیشینه‌ی نمونه ثبت گردید (۱۵). در این زمان، موش‌ها به صورت تصادفی در ۵ گروه تقسیم شدند. غذای مورد نیاز نمونه‌های حیوانی از پیش تهیه شده و در گروه‌هایی که تحت تأثیر مکمل ویتامین C بودند، ویتامین با استفاده از تکنیک گاواژ به نمونه‌ها خوراندند شد. میزان استفاده از ویتامین برای این موش‌ها، ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز بود (۱۶). آب و غذا به صورت آزاد در اختیار موش‌ها قرار داشت. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای 24 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

گروه‌های این پژوهش شامل گروه تمرین (ExCINoV)، گروه تمرین - مکمل (ExCIC)، گروه تمرین - آلودگی (ExPoNoV)، گروه تمرین - آلودگی - مکمل (ExPoC) و گروه شاهد بود.

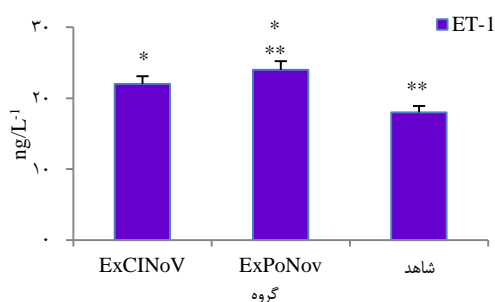
تمرین هوازی در گروه‌های تمرینی این پژوهش، شامل گرم کردن به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰-۴۰ درصد سرعت بیشینه بر روی نوار گردان و سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۶۵ درصد سرعت بیشینه و در انتها نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۵-۳۵ درصد سرعت بیشینه، عملیات سرد کردن را انجام دادند. شدت تمرین برای رعایت اصل اضافه بار پس از سه هفته تمرین به ۷۰ درصد افزایش پیدا کرد. پس از پایان هفته‌ی ششم، تمرینات با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین، بار دیگر بر روی حیوانات آزمون واماندساز انجام شد و شدت تمرینات تا پایان هفته‌ی نهم، میزان ۶۵ درصد سرعت بیشینه‌ی به دست آمده از آزمون دوم و پس از آن تا پایان هفته‌ی ۱۲، معادل ۷۵ درصد سرعت بیشینه‌ی جدید بود (۱۷). ترمیم در اتاقک ایزوله به ابعاد $165 \times 200 \times 273$ سانتی‌متر مکعب و حجم ۹ مترمکعب قرار داشت. آلودگی ایجاد شده در این پژوهش از سیلندرهای گاز خالص (شرکت ترکیب گاز پارس، اصفهان، ایران) استخراج گردید. میزان گاز مورد نیاز جهت رسیدن به غلظت آلاینده مطابق آلاینده‌های روزهای آلوده‌ی سال در شهر اصفهان توسط مهندسین شرکت ترکیب گاز از طریق فرمول $PV = nRT$ محاسبه گردید. در این محاسبه، از متغیرهای حجم اتاق، دمای محیط و فشار هوا بهره گرفته شد. میزان گازهای آلاینده‌ی مونوکسیدکربن،

جدول ۱. نتایج آزمون ANOVA برای مقایسه‌ی سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱ و اکسید نیتریک بین گروه‌ها

مقدار P	F	گروه			متغیر
		تمرین	تمرین-مکمل	تمرین-آلودگی	
< ۰/۰۰۱	۱۹/۴۵	۲۵/۱۶ ± ۰/۷۸	۲۲/۰۲ ± ۲/۹۷	۲۹/۳۰ ± ۳/۰۱	اندوتلین-۱ (pg/l)
< ۰/۰۰۳	۴/۸۷	۱۷/۶۵ ± ۴/۸۱	۱۸/۵۳ ± ۴/۳۲	۲۳/۹۸ ± ۳/۲۴	نیتریک اکسید (μmol/l)

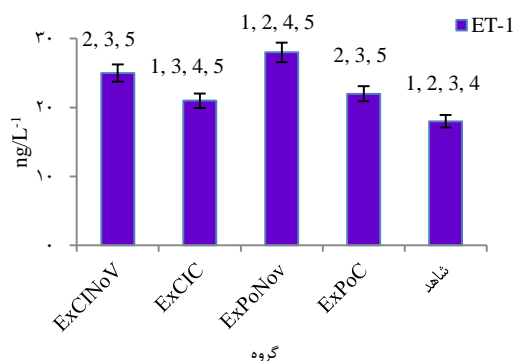
داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.
سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵۰$. * تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها

شکل ۲. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) در عین حال، دو گروه تمرین-مکمل و گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.



شکل ۲. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) بین گروه‌های همراه با مکمل و گروه شاهد

در شکل ۳، بین گروه تمرین و گروه‌های تمرین-مکمل، تمرین-آلودگی و گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۱$, $\eta^2 = ۰/۶۸$, $\delta = ۱/۰۰$). همچنین، بین گروه تمرین-آلودگی و دیگر گروه‌های پژوهش، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در هر دو مورد، گروه‌هایی که ویتامین مصرف کرده بودند، میزان کمتری از اندوتلین-۱ را نشان دادند. در گروه تمرین-آلودگی، بیشترین مقدار از اندوتلین-۱ گزارش شده است. بین گروه‌های تمرین و تمرین-آلودگی-مکمل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



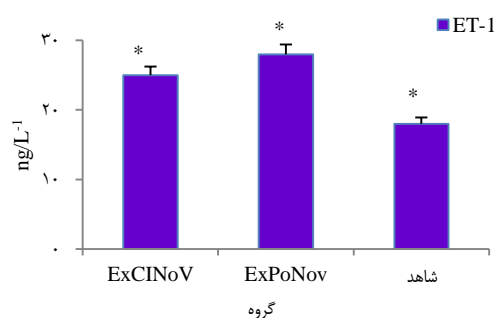
شکل ۳. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) برای متغیر سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱ بین تمامی گروه‌ها

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید به تفکیک گروه‌ها به همراه نتایج آزمون ANOVA در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که یافته‌های جدول ۱ نشان می‌دهد، بین سطوح پلاسمایی ET-1 و NO در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. با توجه به تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها، برای مقایسه‌ی زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آن در اشکال ۱-۶ قابل مشاهده است.

برای ارزیابی جزئیات تفاوت بین گروه‌ها برای هر متغیر، در ادامه، ابتدا به بررسی تفاوت بین گروه‌های بدون مصرف ویتامین و گروه شاهد پرداخته می‌شود. سپس، تفاوت بین گروه‌های همراه با مصرف ویتامین و گروه شاهد پرداخته خواهد شد و در نهایت، تفاوت بین تمام گروه‌ها بررسی می‌گردد.

سطوح پلاسمایی اندوتلین-۱: در شکل ۱، بین تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود ($\delta = ۱/۰۰$, $\eta^2 = ۰/۸۰$, $P < ۰/۰۰۱$). گروه‌های تمرینی میزان بالاتری از ET-1 را نسبت به گروه شاهد گزارش کردند. همچنین، گروه تمرین-آلودگی، بیشترین میزان از متغیر را شاهد بود.



شکل ۱. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) بین گروه‌های بدون مکمل و گروه شاهد

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص شده است، گروه تمرین-آلودگی-مکمل با دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری داشت و میانگین بیشتری نسبت به آن‌ها به دست آورد ($\delta = ۰/۹۲$).

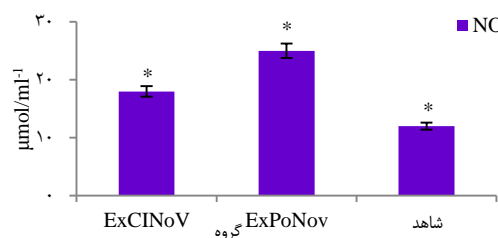
بحث

این مطالعه با هدف بررسی اثر ۱۲ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده و مصرف مکمل ویتامین C بر روی سطوح سرمی اندوتلین-۱ و نیتریک اکسید در موش‌های نر نژاد Wistar انجام شد. نتایج این تحقیق، بیانگر افزایش میزان اندوتلین-۱ در گروه‌های در معرض آلودگی هوا و کاهش کلی میزان اندوتلین-۱ در گروه‌هایی که ویتامین C مصرف می‌کردند، بود. نتایج این پژوهش در رابطه با متغیر نیتریک اکسید، افزایش چشم‌گیر میزان نیتریک اکسید در گروه تمرین-آلودگی را نشان داد. همچنین، بین گروه‌های تمرین-مکمل و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در بررسی گروه‌های بدون مصرف ویتامین، گروه‌های تمرین و تمرین-آلودگی، تفاوت معنی‌دار مثبتی با گروه شاهد داشتند.

افزایش میزان اندوتلین-۱ در گروه‌های در معرض آلودگی هوا با نتایج مطالعه Calderon-Garciduenas و همکاران هم‌خوانی داشت. آن‌ها در پژوهش خود افزایش اندوتلین-۱ را در کودکانی که در معرض آلودگی بودند، مشاهده کردند (۶). مکانسیم احتمالی افزایش اندوتلین-۱ در اثر آلودگی، می‌تواند نشأت گرفته از تأثیرات سم‌شناسی آلودگی هوا بر روی موش‌ها یا تأثیر آلودگی بر روی تنظیم PreproET-1 در شش‌ها و تغییر میزان پیشنده‌های اندوتلین-۱ در گردش باشد. همچنین، تأثیر آلودگی بر افزایش بیان ژن ET-1 در شش‌ها، می‌تواند دلیل افزایش میزان اندوتلین-۱ پلازما باشد (۱۳). گونه‌های آزاد اکسیژن تولید شده در بافت نیز به واسطه‌ی آلودگی هوا می‌تواند در افزایش بیان ژن ET-1 نقش داشته باشند (۲۲). ذرات آلودگی نیز می‌توانند جفت شدن اندوتلین-۱ و گیرنده‌های ET_B را مختل نمایند و به این وسیله، نیمه‌عمر اندوتلین-۱ را افزایش دهند (۲۳). یافته‌های این پژوهش، حاکی از آن است که امکان دارد ویتامین C تأثیرات سرکوب‌کننده‌ی علیه ترشح اندوتلین-۱ داشته باشد. از آن جایی که ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان است، می‌تواند تأثیرات اکسیدانی آلودگی هوا و ورزش را کاهش دهد که به خودی خود، می‌تواند نقص عملکرد اندوتلیوم و میزان کلی اندوتلین-۱ را کاهش دهد (۲۴).

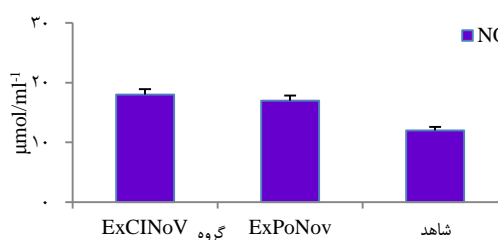
در گروه‌های تمرینی، افزایش میزان اکسید نیتریک در مقابل گروه شاهد دیده شد. مکانسیم دقیق افزایش نیتریک اکسید پس از تمرین مشخص نیست (۲۵). نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS)، در پاسخ به استرس برشی حاصل از جریان خون و آگونیست‌های بی‌شماری مشتق از وقایع سلولی مانند افزایش Ca²⁺ داخل سلولی، تعامل با مواد و عوامل مشترک (Co-factors) و همچنین، پروتئین‌های تنظیم‌کننده و فسفوریلاسیون پروتئین فعال می‌شود. این وقایع، به احتمال زیاد، در هنگام تمرین هوازی باعث افزایش میزان نیتریک اکسید می‌گردند (۲۶). بیشترین

سطوح پلاسمایی نیتریک اکسید: در شکل ۴ تفاوت معنی‌داری بین تمام گروه‌ها مشاهده گردید ($\delta = 1/0.0$, $\eta^2 = 0/66$, $P < 0/001$). گروه‌های تمرینی میزان بیشتری از NO را گزارش کردند و بیشترین میزان مربوط به گروه تمرین-آلودگی بود.



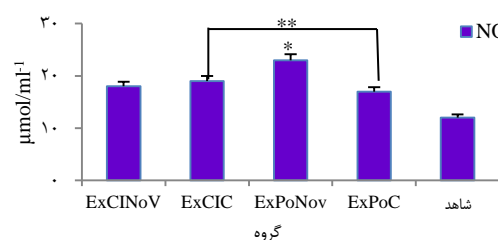
شکل ۴. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) کمترین تفاوت برای متغیر اکسید نیتریک بین گروه‌های بدون مکمل و گروه شاهد

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های همراه با مکمل و گروه شاهد وجود نداشت ($\delta = 0/40$, $\eta^2 = 0/17$, $P < 0/050$).



شکل ۵. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) کمترین تفاوت برای متغیر اکسید نیتریک بین گروه‌های همراه با مکمل و گروه شاهد

در شکل ۶، تفاوت معنی‌داری بین گروه تمرین-آلودگی با تمامی دیگر گروه‌های این پژوهش مشهود است ($\delta = 0/93$, $\eta^2 = 0/35$, $P < 0/010$). میزان نیتریک اکسید در این گروه بالاتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین، بین گروه تمرین-مکمل و گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری وجود داشت.



شکل ۶. نتایج آزمون تعقیبی (LSD) کمترین تفاوت برای متغیر سطوح پلاسمایی اکسید نیتریک بین تمامی گروه‌ها

نتیجه گیری

طبق نتایج این پژوهش، ورزش توانست میزان پپتید منقبض کننده ی عروق (عامل اندوتلین-1) را کاهش دهد، اما آلودگی هوا باعث افزایش آن شد. در عین حال، ویتامین C تأثیرات آلودگی هوا را تا حد زیادی از بین برده و تفاوت بین گروه های تمرین - آلودگی - مکمل و تمرین را به حداقل رسانده بود. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که تمرین، باعث بالا بردن میزان نیتریک اکسید گردیده است و تمرین در آلودگی بیشترین میزان افزایش نیتریک اکسید را باعث شده است. این میزان بالا در گروه تمرین - آلودگی، احتمال دارد به دلیل مکانیسم جبرانی در مقابل میزان بالای اندوتلین-1 باشد. امکان دارد میزان بالاتر نیتریک اکسید در گروه تمرین - آلودگی، نه تنها آثار مفید نداشته باشد؛ بلکه اثرات پاتولوژیک ایجاد نماید. این مهم نیاز به پژوهش و بررسی بیشتری دارد.

در این پژوهش، مصرف مکمل ویتامین C توانست میزان اندوتلین-1 را کاهش دهد. همچنین، تمرین در هوای آلوده، باعث افزایش چشم گیر نیتریک اکسید گردید و ویتامین C توانست باعث کاهش این متغیر گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله ی حاضر، برگرفته از پایان نامه ی دوره ی دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی است که با کد پژوهشی ۱۲۰ مورخ ۱۳۹۶/۱۰/۰۵ در دانشکده ی علوم ورزشی دانشگاه اصفهان به تصویب رسید. بدین وسیله، از همه ی دست اندر کاران اجرای این مطالعه، سپاسگزاری می گردد.

افزایش مربوط به گروه تمرین - آلودگی بود که می تواند بر اثر مکانیسم جبرانی افزایش اندوتلین-1 در همین گروه باشد (۲۷). ساز و کار احتمالی این افزایش، می تواند افزایش جریان خون بر اثر ورزش و به دنبال آن، افزایش میزان هورمون ها، پپتیدهای ناتورپوریتیک دهلیزی، کاتکولامین ها، آدنوزین و آدنوزین تری فسفات در گردش را به همراه داشته باشد که امکان دارد در افزایش ترشح نیتریک اکسید تأثیرگذار باشد (۲۸).

همچنین، دیگر ساز و کار احتمالی افزایش نیتریک اکسید می تواند بر اثر تنش برشی ایجاد شده در دیواره ی عروق بر اثر ورزش باشد. گزارش شده است که تغییر شکل مکانیکی اندوتلیوم توسط ورزش، می تواند بیان ژن نیتریک اکسید سنتاز را افزایش دهد که در نتیجه، باعث افزایش میزان نیتریک اکسید در گردش خون می گردد (۲۸، ۱۲). با این که نیتریک اکسید به عنوان عامل رگ گشای قوی در بدن به ایفای نقش می پردازد و تأثیر به سزایی در عملکرد اندوتلیالی عروق دارد (۲۹)، افزایش بیش از اندازه ی نیتریک اکسید مفید نیست و می تواند باعث پاتوژنز کم فشاری خون گردد (۳۰). به نظر می رسد در گروه های تمرین در هوای پاک، ویتامین C تأثیر محسوسی بر میزان نیتریک اکسید نداشته باشد و در گروه های تمرین در هوای آلوده، گروه تمرین - آلودگی - مکمل، به طور معنی داری میزان پایین تری نسبت به گروه تمرین - آلودگی را شاهد بوده است.

این پژوهش، دارای چندین محدودیت بود. محدودیت های احتمالی این پژوهش از جمله تعداد کم آزمودنی ها، شدت، مدت و نوع تمرین انتخاب شده، الزام تزریق مواد بیهوشی، محدودیت در تعداد آلاینده ها و نسبت آلاینده ها بودند.

References

1. Reilly T, Waterhouse JM, Waterhouse J, Budgett R. Sport, exercise and environmental physiology. London, UK: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
2. Gunga HC. Human physiology in extreme environments. Cambridge, MA: Academic Press; 2014.
3. Kargarfard M, Shariat A, Shaw BS, Shaw I, Lam ET, Kheiri A, et al. Effects of polluted air on cardiovascular and hematological parameters after progressive maximal aerobic exercise. Lung 2015; 193(2): 275-81.
4. Nadadur SS, Hollingsworth JW. Air pollution and health effects. London, UK: Springer London; 2015.
5. Brook RD. Is air pollution a cause of cardiovascular disease? Updated review and controversies. Rev Environ Health 2007; 22(2): 115-37.
6. Calderon-Garciduenas L, Vincent R, Mora-Tiscareno A, Franco-Lira M, Henriquez-Roldan C, Barragan-Mejia G, et al. Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. Environ Health Perspect 2007; 115(8): 1248-53.
7. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Saint Louis, MO: Elsevier Health Sciences; 2015.
8. Higashi Y, Yoshizumi M. New methods to evaluate endothelial function: Method for assessing endothelial function in humans using a strain-gauge plethysmography: Nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. J Pharmacol Sci 2003; 93(4): 399-404.
9. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. Circulation 2007; 115(10): 1285-95.
10. Briet M, Collin C, Laurent S, Tan A, Azizi M, Agharazii M, et al. Endothelial function and chronic exposure to air pollution in normal male subjects. Hypertension 2007; 50(5): 970-6.
11. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. Can J Physiol Pharmacol 2008; 86(8): 485-98.
12. Farrell PA, Joyner MJ, Caiozzo VJ, American College of Sports Medicine. ACSM's advanced exercise physiology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2012.

13. Thomson E, Goegan P, Kumarathasan P, Vincent R. Air pollutants increase gene expression of the vasoconstrictor endothelin-1 in the lungs. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689(1): 75-82.
14. Moser MA, Chun OK. Vitamin C and heart health: A review based on findings from epidemiologic studies. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8): 1328.
15. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 2007; 21(3): 751-6.
16. Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanli B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol Cell Biochem* 2005; 280(1): 135-8.
17. American Physiological Society. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. Rockville, MD: American Physiological Society; 2006.
18. Isfahan Department of environment. Air quality of Isfahan [Online]. [cited 2019]; Available from: URL: http://www.isfahan-doe.ir/Index.aspx?page_=form&lang=1&sub=0&tempname=default&PageID=5
19. Archer CR, Robinson EL, Drawnel FM, Roderick HL. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cell Signal* 2017; 36: 240-54.
20. Tammen H. Specimen Collection and Handling. In: Vlahou A, editor. *Clinical proteomics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 35-42.
21. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (Complete samples). *Biometrika* 1965; 52(3/4): 591-611.
22. Kaehler J, Sill B, Koester R, Mittmann C, Orzechowski HD, Muenzel T, et al. Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103 Suppl 48: 176S-8S.
23. Calderon-Garciduenas L, Gambling TM, Acuna H, Garcia R, Osnaya N, Monroy S, et al. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part 2. Cardiac pathology. *Toxicol Sci* 2001; 61(2): 356-67.
24. Bohm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis* 2007; 190(2): 408-15.
25. Powers SK, Howley ET. *Exercise physiology: Theory and Application to fitness and performance*. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.
26. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch* 2010; 459(6): 793-806.
27. Thomson EM, Kumarathasan P, Calderon-Garciduenas L, Vincent R. Air pollution alters brain and pituitary endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase gene expression. *Environ Res* 2007; 105(2): 224-33.
28. Ignarro LJ. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2009.
29. Kasimay O, Ergen N, Bilsel S, Kacar O, Deyneli O, Gogas D, et al. Diet-supported aerobic exercise reduces blood endothelin-1 and nitric oxide levels in individuals with impaired glucose tolerance. *J Clin Lipidol* 2010; 4(5): 427-34.
30. Pereira AC, Araujo AV, Paulo M, Andrade FA, Silva BR, Vercesi JA, et al. Hypotensive effect and vascular relaxation in different arteries induced by the nitric oxide donor RuBPY. *Nitric Oxide* 2017; 62: 11-6.

The Effects of Aerobic Training in Polluted Air and Vitamin C Supplementation on Serum Levels of Endothelin-1 and Nitric Oxide in Wistar Rats

Amin Eatemady-Boroujeni¹, Mehdi Kargarfard², Hojatallah Alaei³

Original Article

Abstract

Background: There is little information on the effects of exercise in polluted air and vitamin C intake on plasma factors. The aim of this study was to investigate the effect of twelve weeks of aerobic training in polluted air and vitamin C supplementation on serum levels of endothelin-1 and nitric oxide in Wistar rats.

Methods: 50 male Wistar rats were randomly divided into five groups of training, training-supplementation, training-pollution, training-pollution-supplementation, and control. Training protocol consisted of aerobic training for 40 minutes with intensity of 65%-80% of maximal speed for 12 weeks and 5 sessions per week. The amount of vitamin C consumed in each rat was 20 mg/kg/day used orally. Plasma levels of endothelin-1 and nitric oxide were measured at the end of the study. Data were analyzed using one-way analysis of variance.

Findings: Endothelin-1 levels significantly increased in polluted air groups; vitamin C was able to decrease endothelin-1 levels ($P < 0.05$). The level of nitric oxide increased significantly in training in polluted air groups. These results were significantly different from the training-pollution-supplementation group ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the results of this study, vitamin C intake is effective in decreasing plasma levels of endothelin-1 during exposure to air pollution. The effect of exercise and polluted air on nitric oxide was significant, and vitamin C alone reduced nitric oxide in training in polluted air group.

Keywords: Endothelin-1; Nitric oxide; Air pollution; Vitamin C; Aerobic training

Citation: Eatemady-Boroujeni A, Kargarfard M, Alaei H. The Effects of Aerobic Training in Polluted Air and Vitamin C Supplementation on Serum Levels of Endothelin-1 and Nitric Oxide in Wistar Rats. J Isfahan Med Sch 2020; 38(576): 339-46.

1- PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Medical Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Amin Eatemady-Boroujeni, PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran; Email: eatemady@gmail.com