

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید به همراه مکمل‌دهی گالیک‌اسید بر استرس اکسیداتیو بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سالمند

فاطمه فخری پای‌برجی^{۱*}، سعید شاکریان^۲، عبدالحمید حبیبی^۳، محمدرضا تابنده^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سالمندی، با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است که تحت تأثیر فعالیت بدنی و عوامل تغذیه‌ای قرار می‌گیرد. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف مکمل گالیک‌اسید بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو مانند مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، و گلوکاتایون (GSH) در بافت هیپوکمپ موش‌های سالمند بود.

روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی نر ۳ ماهه (دامنه وزنی: ۱۸۰-۲۰۰ gr) به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی شامل: کنترل سالم، سالمند+تمرین، سالمند+مکمل و سالمند+تمرین+مکمل تقسیم شدند. آلفا سالمندی با تزریق داخل صفاقی دی‌گالاکتوز با دوز ۵۰۰ mg/kg به مدت ۸ هفته انجام شد. گروه‌های دریافت‌کننده مکمل، گالیک‌اسید (۱۰۰ mg/kg) را به صورت گاوژ دریافت کردند. پروتکل تمرین تناوبی با شدت بالا به مدت ۸ هفته و با شدت ۸۰-۹۰ درصد VO2max اجرا شد. شاخص‌های استرس اکسیداتیو بافت هیپوکمپ به روش بیوشیمیایی و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند. داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه سپس تعقیبی Tukey تحلیل شدند ($P \leq 0.05$).

یافته‌ها: سالمندی باعث کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GSH، CAT، GPX و SOD و افزایش معنی‌دار MDA شد ($P < 0.0001$). تمرین، مکمل و مداخله همزمان تمرین+مکمل موجب کاهش معنی‌دار MDA نسبت به گروه سالمند شد ($P < 0.05$). همچنین مداخله‌ی همزمان تمرین+مکمل به‌طور معنی‌داری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی (GSH، CAT، GPX، SOD) را نسبت به گروه سالمند افزایش داد ($P < 0.0001$). علاوه بر این سطوح GSH و SOD در گروه سالمند+مکمل نسبت به کنترل سالمند افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف مکمل گالیک‌اسید منجر به بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکمپ موش‌های سالمند شد. این یافته‌ها حاکی از پتانسیل اثر تعاملی این مداخلات در کاهش استرس اکسیداتیو مرتبط با پیری است، اما تعمیم نتایج به جمعیت انسانی نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژگان کلیدی: سالمندی؛ استرس اکسیداتیو؛ گالیک‌اسید؛ تمرین تناوبی شدید

ارجاع: فخری پای‌برجی، فاطمه، شاکریان سعید، حبیبی عبدالحمید، تابنده محمدرضا. تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید به همراه مکمل‌دهی گالیک‌اسید بر استرس اکسیداتیو بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سالمند. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۵۳): ۳۰۴-۳۱۳.

مقدمه

جمعیت سالمندان جهان به سرعت در حال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰، تعداد افراد سالمند بالای ۶۰ سال، به ۱/۴ میلیارد نفر برسد که یک پنجم جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد (۱). پیری یکی از انواع فرایندهای زیستی طبیعی، غیرقابل برگشت و دائمی است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی رخ می‌دهد و با از

دست دادن تدریجی یکپارچگی فیزیولوژیکی و اختلال در عملکرد اندام‌ها همراه است (۲). یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های زیربنایی پیری، استرس اکسیداتیو است (۳) که به عنوان عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی تعریف می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سعید شاکریان؛ استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: s.shakeryan@scu.ac.ir

تعیین‌کننده‌ای در بهبود عملکرد هیپوکمپ و سایر مناطق مغزی ایفا می‌کند و می‌تواند به طور چشمگیری اثرات مثبت ورزش بر سلامت شناختی و عصبی را افزایش دهد و زمینه‌ساز ارتقای کیفیت زندگی در سنین بالاتر گردد (۱۲، ۱۳).

تمرین تناوبی با شدت بالا (High Intensity Interval Training) نوعی تمرین و فعالیت بدنی محبوب با زمان کارآمد است که با دوره‌های کوتاه و متناوب فعالیت بدنی شدید همراه با دوره‌های استراحت یا تمرین با شدت کم مشخص می‌شود (۱۴). نشان داده شده این نوع تمرین با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ و فاکتورهای رشد، با اثرات مضر پیری مقابله کرده، عملکرد آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و فعالیت‌های التهابی در بدن را کاهش می‌دهد (۱۲). به‌طور خاص، در مدل‌های حیوانی، تمرینات HIIT القاکننده‌ی افزایش بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت هیپوکمپ بوده است (۱۵).

امروزه پژوهشگران در حوزه فیزیولوژی ورزشی در صدد هستند با ادغام ورزش و مداخلات تغذیه‌ای، اثرات مطلوب‌تری را در پیشگیری و کاهش استرس اکسیداتیو به‌عمل آورند. این رویکرد می‌تواند منجر به ایجاد استراتژی‌های ورزشی مطلوب متناسب با نیازهای جمعیت سالمند گردد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، نقش مؤثری در جلوگیری یا کاهش تغییرات مرتبط با افزایش سن در مغز دارد (۱۶). اسیدگالیک (GA) (Gallic acid) با نام علمی اسید ۳،۴،۵-تری هیدروکسی بنزوئیک از ترکیبات تری‌فنلی با وزن مولکولی کم است که در گیاهان، سبزیجات و میوه‌های مختلف یافت می‌شود (۱۷). اسید گالیک، دارای فعالیت ضدالتهابی و ضد اکسیداتیو عالی و اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله ضدتومور، ضد باکتری، ضد دیابت، ضد چاقی، ضد اسکمی می‌باشد و با قابلیت عبور از سد خونی مغزی می‌تواند نقش مهمی در محافظت از نورون‌ها و پیشگیری از اختلالات عصبی مرتبط با سالمندی داشته باشد (۱۸، ۱۹).

با بررسی گسترده متون علمی، اگرچه اثرات جداگانه‌ی مکمل‌های پلی‌فنولی مانند اسید گالیک (۲۰، ۲۱) و تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف (۲۲-۲۴) بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف از جمله مغز مورد مطالعه قرار گرفته است، اما تا حد دانش ما، مطالعه‌ای که به‌طور همزمان به بررسی اثرات تعاملی تمرین تناوبی شدید (HIIT) و مکمل‌دهی گالیک اسید بر شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی‌اکسیدانی بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی مدل القایی سالمندی ناشی از دی‌گالاکتوز بپردازد، انجام نشده است. بنابراین بررسی اثر هم‌افزایی این دو مداخله بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت هیپوکمپ به‌عنوان حیاتی‌ترین ناحیه مغز در فرایند پیری ضروری به‌نظر می‌رسد.

پراکسید هیدروژن (Hydrogen peroxide) O_2 (Superoxide) و رادیکال هیدروکسیل $OH^\cdot$ (Hydroxyl radical) هستند که در فرایندهای متابولیکی تولید می‌شوند و می‌توانند به مولکول‌های حیاتی سلولی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب برسانند (۴). با افزایش سن، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن روی می‌دهد، این شرایط منجر به افزایش آسیب اکسیداتیو به مولکول‌های حیاتی سلولی می‌گردد (۴). در این فرایند، اسیدهای چرب غشای سلولی به‌صورت زنجیره‌ای تحت تخریب اکسیداتیو قرار گرفته و در نهایت منجر به تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (Malondialdehyde) می‌شود. MDA به عنوان نشانگری مناسب برای سنجش آسیب غشای سلولی و استرس اکسیداتیو به کار می‌رود (۵). از طرفی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Superoxide dismutase)، کاتالاز (CAT) (Catalase) و گلوکوتایون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase) (GPx) در مهار واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد و حفظ تعادل ردوکس نقش اساسی دارند (۴، ۶). چنانچه رادیکال سوپراکسید توسط SOD به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود و پراکسید هیدروژن توسط GPx و/یا CAT خنثی می‌گردد. با توجه به فعالیت محدود آنزیم کاتالاز در بافت مغز، GPx به عنوان عامل اصلی در تجزیه پراکسید هیدروژن اضافی در سلول‌های عصبی ایفای نقش می‌کند. علاوه بر این، گلوکوتایون (GSH) (Glutathione) که به عنوان فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی در مغز شناخته می‌شود، نقش کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و حفظ هموستازی اکسیداتیو ایفا می‌نماید (۷).

محافظت بالای چربی و دفاع آنتی‌اکسیدانی ضعیف، مغز را آسیب‌پذیرترین عضو در برابر استرس اکسیداتیو می‌کند و فعالیت سیستم عصبی را کاهش می‌دهد. هیپوکمپ به‌عنوان مرکز کلیدی یادگیری و حافظه، به شدت در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر است. افزایش پروآکسیدان‌ها و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها در این ناحیه، منجر به اختلال در عملکرد سیناپسی، التهاب عصبی، کاهش نوروترنژ، کاهش حافظه، زوال شناختی و ... می‌شود و خطر ابتلا به بیماری‌های عصبی مرتبط با سالمندی را افزایش می‌دهد (۸).

یکی از مؤثرترین راهکارها برای کاهش و تعویق اثرات نامطلوب مرتبط با افزایش سن، افزایش فعالیت بدنی و ورزش است (۹). ورزش تأثیرات گسترده و چندبعدی بر عملکرد مغز دارد که از جمله آنها می‌توان به فعال‌سازی مکانیسم‌های اعطاف‌پذیری عصبی، تحریک فرایندهای نوروترنژ و رگ‌زایی، ارتقای ظرفیت متابولیک و تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (۱۰، ۱۱). با این حال تنظیم بهینه‌ی شدت تمرین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین متغیرهای تمرین، نقش

روش‌ها

پژوهش حاضر به روش نیمه تجربی و از نوع کاربردی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بوده که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. جامعه‌ی آماری مطالعه‌ی حاضر شامل موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود که تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر ۳ ماهه با دامنه‌ی وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد. جهت سازگاری، موش‌ها به مدت یک هفته در فضای نگهداری جدید در قفس‌های ۵ تایی مخصوص از جنس پلی کربنات با ابعاد ۲۵ × ۵۰ سانتی‌متر و در محیطی با میانگین دمایی 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، و چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. آب آشامیدنی و غذای استاندارد موش به‌صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار داده شد. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی در ۵ گروه: ۱. کنترل سالم ($n = 8$)، ۲. کنترل سالمند ($n = 8$)، ۳. سالمند + تمرین تناوبی با شدت زیاد ($n = 8$)، ۴. سالمند + مکمل گالیک اسید ($n = 8$)، ۵. سالمند + تمرین + مکمل گالیک اسید قرار گرفتند. به‌منظور القا سالمندی، دی‌گالاکتوز با دوز 500 mg/kg وزن بدن، روزانه به مدت ۸ هفته به‌صورت درون‌صفافی به موش‌ها تزریق شد و برای یکسان‌سازی استرس، گروه کنترل روزانه محلول نرمال‌سالین دریافت کرد. پس از پایان ۸ هفته القا پیری، تمرین ورزشی و مکمل‌دهی گالیک اسید به مدت ۸ هفته اعمال شد و موش‌های گروه مکمل، گالیک اسید (BioBasic کانادا) را با دوز 100 mg/kg روزانه به‌صورت گاوآژ و به مدت ۸ هفته دریافت کردند (۲۰).

در طول اجرای پژوهش، یک نفر مسئول جابه‌جایی و کنترل موش‌ها بود. تمامی مراحل پژوهش حاضر به تصویب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز و با شناسه scu.ec.ss.403.1102 به ثبت رسید.

پروتکل تمرینی

به‌منظور آشناسازی با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان، رت‌ها به مدت دو هفته، ۵ روز در هر هفته و در هر روز به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۵ تا ۱۵ متر بر دقیقه بر روی نوارگردان دویند.

حداکثر اکسیژن مصرفی حیوانات با توجه به دسرسی نداشتن به ابزار مستقیم، با آزمون فزاینده بر روی نوارگردان ارزیابی شد. به طوری‌که ابتدا ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ در صد VO_2max انجام گرفت. سپس رت‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۲ دقیقه یک بار به میزان ۲ متر بر دقیقه تا زمان رسیدن به سرحد واماندگی حیوان، سرعت افزایش یافت. سرعت موش‌ها در زمان واماندگی ثبت و برای محاسبه میزان VO_2max در فرمول $Y = 162X - 1$ قرار داده شد. در این فرمول Y نمایانگر اکسیژن مصرفی (میلی‌لیتر در دقیقه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و X نمایانگر سرعت دویدن (متر بر ثانیه) بود. بدین ترتیب شدت تمرینی هفته اول در هر گروه مشخص شد (۲۵).

پروتکل HIIT شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن قبل از انجام تمرین بود، در هفته اول تا چهارم شامل ۳ مرحله دویدن تناوبی شدید با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد VO_2max و با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه در زمان ۴ دقیقه و ۳ مرحله دویدن تناوبی کم شدت با ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_2max و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در زمان ۳ دقیقه (استراحت فعال) بود. از هفته پنجم تا هشتم نیز شامل ۴ مرحله دویدن تناوبی شدید با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد VO_2max و با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه در زمان ۴ دقیقه و ۳ مرحله دویدن تناوبی کم شدت با ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_2max و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در زمان ۳ دقیقه بود (جدول ۱). هر دو هفته یکبار برنامه تمرینی مجدداً بررسی شد (۲۶) و حیوانات به صورت هفتگی وزن‌کشی شدند.

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه مداخلات و پس از یک شب ناشتایی، موش‌ها با ترکیبی از داروی کتامین و زایلازین (به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی آسان‌کشی شدند. پس از باز کردن جمجمه، مغز به طور کامل خارج و سپس برای جداسازی بافت هیپوکامپ از استریومیکروسکوپ برای مشاهده بهتر و دقت در برداشت بافت استفاده شد.

جدول ۱. پروتکل تمرین تناوبی شدید در هفته‌های مختلف

هفته	شعب	تعداد جلسات در هفته	تعداد تناوب شدید	زمان هر تناوب شدید (دقیقه)	سرعت در تناوب شدید (متر بر دقیقه)	شدت تناوب شدید (VO_2max)	تعداد تناوب استراحت فعال	زمان هر تناوب استراحت فعال (دقیقه)	سرعت در تناوب استراحت فعال (متر بر دقیقه)	شدت تناوب استراحت فعال (VO_2max)
۱-۴	۰	۵	۳	۴	۳۰	۹۰-۸۰	۳	۳	۲۰	۶۰-۵۰
۵-۸	۰	۵	۴	۴	۳۰	۹۰-۸۰	۳	۳	۲۰	۶۰-۵۰

تهیه‌ی هموزن بافتی

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت هیپوکامپ ابتدا به نمونه‌های بافتی ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱ اضافه و با استفاده از دستگاه هموزنایزر (Heidolph, آلمان) با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه هموزنیزه شدند. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جداسازی و جهت اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گرفت. مقدار پروتئین در نمونه هموزن بافتی با استفاده از روش برادفورد مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی مقدار مالون دی‌آلدئید بافتی

سطح مالون دی‌آلدئید در بافت مغز با استفاده از روش Esterbauer و Cheeseman و بر اساس واکنش آن با تیوباربتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر نمونه هموزن شده بافت هیپوکامپ با ۲۵۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تیوباربتوریک اسید ۰/۶۷ در صد مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول شفاف رویی جدا شد. سپس از هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به پلیت ۹۶ خانه انتقال و جذب نمونه‌ها در مقابل نمونه شاهد در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) قرائت گردید. به منظور محاسبه میزان MDA از منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف تترا اتوکسی پروپان (۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲۵، و ۵۰ نانومول/میلی لیتر) آماده‌سازی شده در اسید سولفوریک ۱ درصد استفاده شد. مقدار MDA بر اساس واحد nmol/mg پروتئین بافتی گزارش شد (۲۲).

ارزیابی فعالیت GPx

فعالیت GPx با استفاده از کیت تجاری (کیازیسست، ایران) ارزیابی گردید. فعالیت آنزیم بر اساس واحد U/mg پروتئین بافتی گزارش شد.

ارزیابی فعالیت کاتالاز

به منظور اندازه‌گیری کاتالاز از روش توصیف شده توسط Goth استفاده شد. بدین منظور مقدار ۵۰ میکرو لیتر نمونه هموزن بافتی با ۱۰۰ میکرولیتر پروکسید هیدروژن ۱۰۰ میکرومولار تهیه شده در بافر تریس ۰/۰۵ مولار مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر معرف آمونیوم مولیبدات ۴ درصد متوقف گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز معادل مقداری از آنزیم که ۱ میکرومول پروکسید هیدروژن در زمان یک دقیقه را تخریب کند در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم بر اساس واحد U/mg پروتئین بافتی گزارش شد (۲۷).

ارزیابی فعالیت SOD

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش مهار احیا نیترو بلوتترازولیوم (Nitro blue tetrazolium chloride) NBT و طبق روش توصیف شده توسط Spitz و Oberley (۱۹۸۹) ارزیابی شد. ۱۰ میکرولیتر هموزن بافتی با ۱۵۰ میکرولیتر محلول A (EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Na_2CO_3 ۵۰ میلی‌مولار با pH = ۱۰/۵)، ۳۰ میکرولیتر محلول B (NBT ۰/۵ میلی‌مولار) و ۲۰ میکرولیتر محلول C (تری‌تون X-100 ۰/۶ درصد) و ۵۰ میکرولیتر محلول D (هیدروکسیل‌آمین هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار، pH = ۶) مخلوط شد. میزان احیا NBT پس از یک دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) ثبت گردید (۲۸). یک واحد فعالیت SOD به عنوان میزان آنزیم مورد نیاز برای مهار تولید واکنش رنگی به میزان ۵۰ درصد در یک دقیقه تحت شرایط آزمایش تعریف می‌شود. فعالیت آنزیم در نمونه بافت بر اساس U/mg protein گزارش شد.

ارزیابی میزان گلوکوتایون احیا

گلوکوتایون احیاء (GSH) با استفاده از روش توصیف شده توسط Alisik و همکاران مورد سنجش قرار گرفت. به منظور انجام تست ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد (غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار GSH در اسید کلریدریک ۰/۱ مولار)، نمونه هموزن بافتی و شاهد (آب مقطر) با ۲۳۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷/۶) و ۵۰ میکرولیتر معرف ۵۵'-Dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB) ۱ میلی‌مولار مخلوط شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ثابت ۴۱۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) قرائت شد. غلظت GSH به صورت $\mu\text{mol/mg}$ پروتئین بافتی ارائه شد (۲۹).

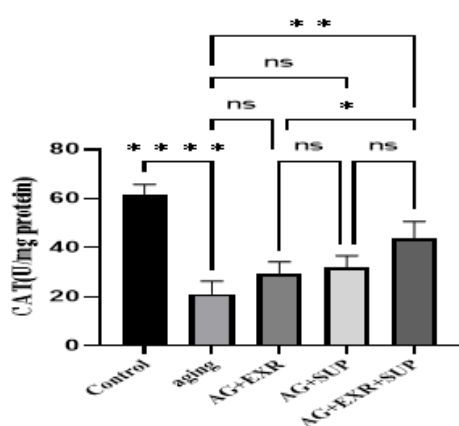
تجزیه و تحلیل آماری

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون آماری Shapiro-Wilk بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، متغیرهای تحقیق از طریق آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph-pad prism ورژن ۹ و سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند.

یافته‌ها

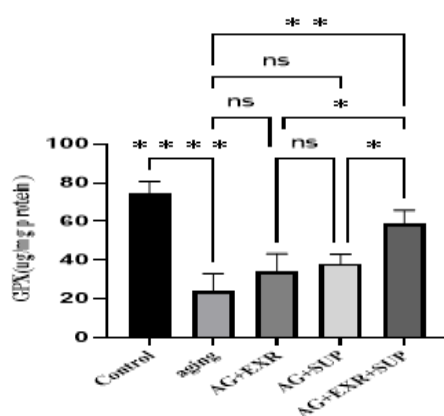
نتایج آزمون آماری نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های پژوهش حاضر در شاخص‌های MDA ($P = ۰/۰۰۰۱$)، $F(۴ و ۱۰) = ۲۴/۵۹$ ، SOD ($P = ۰/۰۰۰۱$)، $F(۴ و ۱۰) = ۲۸/۴۸$ ، کاتالاز ($P = ۰/۰۰۰۱$)، GSH ($P = ۰/۰۰۰۱$)، $F(۴ و ۱۰) = ۱۸/۸۲$ و $F(۴ و ۱۰) = ۲۶/۹۴$.

همچنین سالمندی با کاهش معنی‌دار SOD، CAT، GPx و GSH همراه بود ($P < 0/0001$) و اجرای ورزش توأم با مصرف مکمل و مصرف مکمل به‌تنهایی منجر به افزایش معنی‌دار SOD نسبت به گروه سالمند شد (به‌ترتیب با $P < 0/0001$ و $P < 0/05$) ولی گروه تمرین تغییرات معنی‌داری را در این شاخص نشان نداد (شکل ۲). افزایش معنی‌دار شاخص CAT، GPx و GSH نیز در گروه تمرین-مکمل ($P < 0/0001$) و شاخص GSH در گروه مکمل ($P < 0/05$) نسبت به گروه سالمند مشاهده شد ولی تغییرات شاخص CAT و GPx در گروه تمرین و گروه مکمل نسبت به گروه سالمند معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) (شکل ۳-۵).



شکل ۳. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار شاخص CAT در بافت

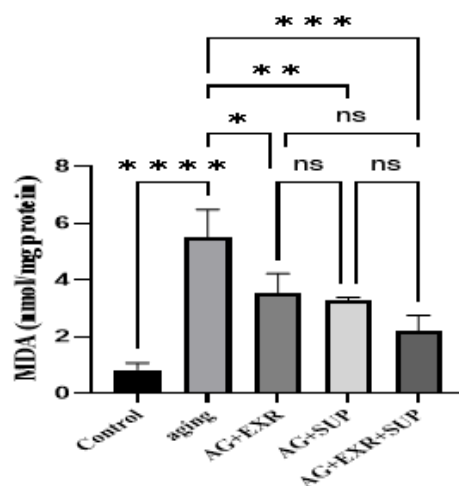
هیپوکمپ. اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف: * سطح معنی‌داری $P < 0/05$; ** $P < 0/01$; *** $P < 0/001$; **** $P < 0/0001$ نشان داده شد. Ns: عدم اختلاف آماری معنی‌دار



شکل ۴. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار شاخص GPX در بافت

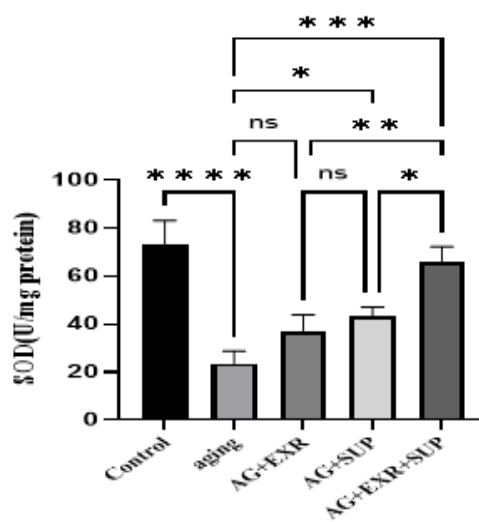
هیپوکمپ. اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف: * سطح معنی‌داری $P < 0/05$; ** $P < 0/01$; *** $P < 0/001$; **** $P < 0/0001$ نشان داده شد. Ns: عدم اختلاف آماری معنی‌دار

و GPx ($P = 0/0001$, $F(4, 10) = 22/31$) در بافت هیپوکمپ وجود دارد. آزمون تعقیبی Tukey نشان داد سالمندی منجر به افزایش معنی‌دار MDA ($P < 0/0001$) می‌گردد و اجرای ورزش ($P < 0/0001$)، مصرف مکمل ($P < 0/0001$) و مصرف مکمل توأم با ورزش ($P < 0/0001$) منجر به کاهش معنی‌دار این شاخص نسبت به گروه کنترل سالمند گردید (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار شاخص MDA در بافت

هیپوکمپ. اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف: * سطح معنی‌داری $P < 0/05$; ** $P < 0/01$; *** $P < 0/001$; **** $P < 0/0001$ نشان داده شد. Ns: عدم اختلاف آماری معنی‌دار



شکل ۲. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار شاخص SOD در بافت

هیپوکمپ. اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف: * سطح معنی‌داری $P < 0/05$; ** $P < 0/01$; *** $P < 0/001$; **** $P < 0/0001$ نشان داده شد. Ns: عدم اختلاف آماری معنی‌دار

پیری افزایش می‌یابد همسو بود (۳۲، ۳۳).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ورزش و فعالیت بدنی می‌تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از بی‌حرکتی را در ماکرومولکول‌های لیپیدی، پروتئینی و سایر ساختارهای سلولی کاهش دهد (۳۱، ۳۴).

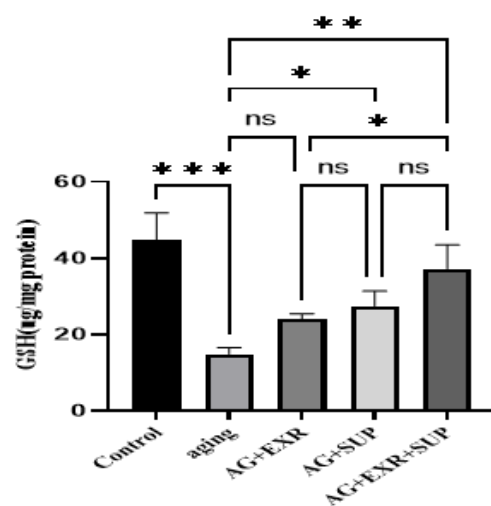
همچنین Freitas و همکاران گزارش دادند، ۶ هفته تمرین تناوبی شدید موجب کاهش آسیب اکسیداتیو، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در بافت هیپوکمپ می‌گردد (۱۵) که همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. نشان داده شده است تمرینات تناوبی شدید به دلیل شدت بالا و دوره‌های ریکاوری فعال، نسبت به تمرینات تداومی، سازگاری‌های فیزیولوژیکی قابل‌توجهی ایجاد می‌کنند که شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۵، ۳۶). این سازگاری‌ها می‌توانند به بهبود عملکرد شناختی و کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در بافت مغز کمک کنند.

با این حال، برخی مطالعات نتایج متناقضی با یافته‌های پژوهش حاضر ارائه داده‌اند. مانند Abbasi و همکاران، عدم تغییر معنی‌دار MDA را در گروه تمرین HIIT را نشان داد (۳۷). که این اختلاف ممکن است ناشی از تفاوت در رژیم غذایی (رژیم معمولی در مقابل رژیم پرچرب) و همچنین تفاوت سنی نمونه‌ها (سالمند در برابر جوان) باشد.

علاوه بر این، Freitas و همکاران، پس از ۶ هفته تمرین HIIT، افزایش میزان MDA بافت مخچه و عدم تغییر آن در قشر مغز را گزارش کردند (۳۶). به نظر می‌رسد اثر فعالیت بدنی و ورزش بر وضعیت ردوکس به منطقه مغزی مورد بررسی و وضعیت فیزیکی افراد (سالم، کم‌تحرك، بیمار و...) بستگی داشته باشد.

Feter و همکاران نیز تأثیر یک دوره فعالیت بدنی و ورزش مختلف را بر حافظه و تعادل ردوکس در قشر مغز و هیپوکمپ موش‌های جوان مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آنان نشان داد تمرینات HIIT تأثیر معنی‌داری در سطح استرس اکسیداتیو و SOD و کاتالاز نداشتند در حالی که تمرین مقاومتی موجب افزایش سطح ROS در هیپوکمپ شده است. این تفاوت با یافته‌های پژوهش حاضر احتمالاً ناشی از تفاوت در شاخص‌های مورد اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید است؛ به‌طوری‌که مطالعه‌ی حاضر به طور خاص بر MDA به عنوان نشانگر پراکسیداسیون لیپید تمرکز دارد، در حالی که مطالعه مذکور شاخص‌های کلی‌تری مانند TBARS را ارزیابی نموده است (۳۸).

همچنین Ramez و همکاران، افزایش غیرمعنی‌دار MDA و افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را پس از ۵ روز متوالی تمرین HIIT گزارش داد (۳۹). نشان داده شده است، مدت زمان



شکل ۵. مقایسه‌ی میانگین $\pm$ انحراف معیار شاخص GSH در بافت

هیپوکمپ موش.

اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف: * سطح معنی‌داری $P < 0.01$ ، **** $P < 0.0001$ ، * نشان داده شد. ns: عدم اختلاف آماری معنی‌دار عدم اختلاف آماری معنی‌دار: ns

بحث

پژوهش حاضر به بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) همراه با مصرف مکمل گالیک اسید بر استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت هیپوکمپ موش‌های سالمند پرداخت. یافته‌ها نشان داد که سالمندی القا شده توسط دی‌گالاکتوز موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون (GSH) و افزایش مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی گردید. مداخله‌ی همزمان تمرین-مکمل منجر به کاهش معنی‌دار MDA و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه سالمند بدون مداخله شد. همچنین مصرف مکمل به‌تنهایی باعث کاهش معنی‌دار MDA و افزایش شاخص‌های SOD و GSH و تمرین تنها با کاهش MDA و افزایش غیرمعنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه بود. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثرات هم‌افزایی ورزش و مکمل در بهبود تعادل ردوکس است.

سطح تغییرات اکسیداتیو در مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA عموماً به‌عنوان نشانگرهای آسیب اکسیداتیو استفاده می‌شوند و از عوامل ایجادکننده‌ی بیماری‌های مرتبط با سالمندی از جمله اختلالات عصبی است (۳۰، ۳۱). چنانچه در مطالعه‌ی حاضر افزایش سطح MDA و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ناحیه هیپوکمپ پس از سالمندی ناشی از دی‌گالاکتوز نشان داده شد که با نتایج پژوهش‌های قبلی که نشان داده‌اند پراکسیداسیون لیپیدی با روند

تمرینات ورزشی از عوامل مهمی است که می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر استرس اکسیداتیو و وضعیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. علاوه بر این، اندازه‌گیری سطح پلاسمایی در مقایسه با مقادیر بافتی نیز می‌تواند منجر به تفاوت در نتایج شود.

در مطالعه‌ای دیگر Tsakiris و همکاران نشان دادند، شنا به مدت ۲ ساعت و در مدت زمان‌های طولانی‌تر با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است (۴۰). تحقیقات نشان داده‌اند، ورزش شدید و خسته‌کننده، ممکن است باعث ایجاد استرس اکسیداتیو گردد. چنانچه فعالیت ورزشی سنتز دوپامین در مغز را افزایش داده که این امر منجر به تولیدگونه اکسیژن فعال از طریق متابولیسم دوپامین توسط مونوآمین اکسیداز یا فرایند آتواکسیداسیون می‌شود. همچنین فعالیت بدنی، منجر به افزایش سطح گلوکوکورتیکوئید سرمی به‌ویژه کورتیکوسترون می‌شود که سمیت مولدهای گونه‌های اکسیژن را افزایش داده و منجر به افزایش سطوح پایه گونه اکسیژن فعال و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مغز می‌گردد. که نشان‌دهنده‌ی این است که بافت‌های مختلف بدن به‌ویژه بافت مغز تحت تأثیر متغیرهای تمرینی نظیر حجم و شدت تمرین است و تنظیم دقیق این متغیرها برای کاهش استرس اکسیداتیو ضروری است (۶).

طی پژوهشی دیگر قاسمیان و همکاران، گزارش کردند که ۸ هفته تمرین تناوبی شدید باعث افزایش معنی‌دار SOD و کاهش معنی‌دار MDA شده است (۳۵). چنانچه در پژوهش حاضر، اگرچه کاهش معنی‌دار MDA گزارش شد ولی تغییرات شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی غیرمعنی‌دار بود که این روند افزایشی مشاهده شده می‌تواند بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دهد. با این حال تحقیقات نشان داده‌اند گاهی تغییرات در کیفیت یا کارایی آنزیم‌ها (مثلاً افزایش اتصال به سوبسترا یا بهبود شرایط محیطی آنزیم‌ها) می‌تواند باعث کاهش آسیب‌اکسیداتیو شود بدون اینکه میزان فعالیت آنزیمی به‌طور معنی‌داری افزایش یابد و بیان شده است ورزش شدید می‌تواند محتوای اسید اسکوریک پلاسمایی را با آزادسازی غدد فوق کلیوی افزایش دهد (۴۱) این مسئله می‌تواند دسترسی مغز را افزایش داده و سلامت مغز را القا کند، بنابراین به نظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید می‌تواند با تأثیر بر عوامل آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نیز منجر به کاهش استرس اکسیداتیو گردد (۱۵).

علاوه بر فعالیت بدنی، مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور گسترده‌ای برای مقابله با استرس اکسیداتیو توصیه می‌شوند (۳۴). آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها دارای پتانسیل تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است. اسید گالیک (GA)، به‌عنوان یک پلی‌فنول طبیعی به‌دست آمده از گیاهان خوراکی، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و عصبی شناخته شده

است که قابلیت عبور از سد خونی-مغزی را دارد. عملکردهای مرتبط با سلامتی گالیک‌اسید، عمدتاً به توانایی مهار رادیکال‌های آزاد آن نسبت داده شده که به جلوگیری و کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌کند (۴۲). مطالعات نشان داده‌اند که اسید گالیک با مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تحریک فعالیت عوامل آنتی‌اکسیدانی درون‌زا مانند SOD، CAT و GPx قادر است استرس اکسیداتیو مخچه و اختلال شناختی ناشی از استریتوتوسین را در موش‌ها بهبود بخشد (۲۱) و با مهار استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE)، فراموشی ناشی از اسکوپولامین را در مغز موش‌ها معکوس کند (۴۳). این مکمل در مدل‌های دیابت نوع ۲ نیز تأثیرات مثبتی بر تخریب عصبی هیپوکامپ داشته و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح GSH را در ناحیه هیپوکامپ و قشر جلوی مغز معکوس کرد (۴۲) که این یافته‌ها تأییدی بر اثرات محافظتی و آنتی‌اکسیدانی گالیک اسید است.

همچنین، Ogunlade و همکاران نشان دادند که مصرف مکمل گالیک اسید می‌تواند کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش نشانگرهای MDA و H2O2 ناشی از استرس اکسیداتیو آلومینیوم کلراید را به‌حالت طبیعی بازگردانده و یکپارچگی مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی هیپوکامپ را در برابر نوروتوکسین محیطی حفظ کند (۴۴).

مطالعه‌ی حاضر نیز در راستای پژوهش‌های مذکور نشان داد، مصرف مکمل گالیک اسید می‌تواند شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GSH را در موش‌های مدل سالمند ناشی از دی‌گالاکتوز بهبود بخشد و استرس اکسیداتیو را در بافت هیپوکامپ کاهش دهد. اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنولی نظیر اسید گالیک عمدتاً به مهار یا غیرفعال کردن مسیرهای سیگنالینگ از جمله مسیر تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا با فاکتور هسته‌ای سلول‌های B فعال (NF-κB)، آمینو کاپا کیناز c-Jun و مسیر ترمینال کیناز (IKK/JNK) مربوط می‌شود که در فرآیند اکسیداسیون نقش دارند (۴۵). علاوه بر این، مولکول‌های پلی‌فنولی قادرند فعالیت آنزیم‌های مسئول تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سیکلواکسیژناز، لیپواکسیژناز و گزانتین اکسیداز را مهار کنند. اثرات پلی‌فنول‌ها می‌تواند بر فعال شدن مسیرهای آنتی‌اکسیدانی ناشی از ورزش نیز تأثیر گذار باشند (۳۴) و ترکیب ورزش با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به هر یک از مداخلات به‌تنهایی می‌تواند اثربخشی بیشتری در بهبود وضعیت تعادل اکسیداتیو ایجاد کند (۴۶، ۴۷). در مطالعه‌ی حاضر نیز مکمل گالیک اسید توازن اثرات تمرینات HIIT را در بهبود عوامل آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT، GPx و GSH) تقویت کرده و به نظر می‌رسد می‌تواند به محافظت از عملکرد عصبی در بافت هیپوکامپ موش‌های سالمند کمک کند.

از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم بررسی مسیرهای مولکولی، مدت زمان نسبتاً کوتاه مداخله و استفاده از مدل

همراه با مصرف مکمل گالیک اسید می‌تواند منجر به بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکمپ موش‌های سالمند گردد. این نتایج حاکی از پتانسیل اثر تعاملی این مداخلات در کاهش استرس اکسیداتیو مرتبط با سالمندی است، اما تعمیم این نتایج به جمعیت انسانی نیازمند مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری با کد ۶۹۳۱۳ مصوب معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد. بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی از مسئولین آن معاونت به‌عمل می‌آید.

حیوانی اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی در مدل‌های حیوانی با دوره‌های مداخله بلندمدت‌تر بررسی شود. همچنین با توجه به تفاوت‌های زیستی و محیطی بین گونه‌ها و محدودیت دسترسی به نمونه‌های بافت مغز انسان، انجام مطالعات بالینی با استفاده از روش‌های غیرتهاجمی پیشرفته مانند تصویربرداری عصبی، اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی و ارزیابی‌های رفتاری-شناختی، برای اعتبارسنجی و تعمیم این نتایج به انسان ضروری است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به‌نظر می‌رسد، تمرین تناوبی شدید

References

- Jeefoo WP, Phachonpai W, Duangjai A, Ontawong A, Amornlerdpison D. Purple Eggplant (*Solanum melongena* L.) Ameliorates D-Galactose-Induced Cognitive Impairment Through Inhibition of Oxidative Stress and Acetylcholinesterase in the Hippocampus of an Aging Rat Model. *Trends in Sciences* 2024; 21(1): 7245.
- Wang D, Wang T, Li Z, Guo Y, Granato D. Green tea polyphenols upregulate the Nrf2 signaling pathway and suppress oxidative stress and inflammation markers in D-galactose-induced liver aging in mice. *Front Nutr* 2022; 9: 836112.
- Mehdi MM, Solanki P, Singh P. Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: The current perspective in the biology of aging. *Arch Gerontol Geriatr* 2021; 95: 104413.
- Rami M, Habibi A, Khajehlandi M. The effect of moderate intensity exercise on the activity of catalase enzyme and malondialdehyde in hippocampus area of diabetic male Wistar rats [in Persian]. *Feyz Med Sci J* 2018; 22(6): 555-63.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4): 405-12.
- Beiksay Afshar F, Nasiri E, Samadi A. The effect of eight-week sprint interval training on hippocampal oxidative stress markers in adult male wistar rats [in Persian]. *Metabolism and Exercise* 2022; 12(1): 59-72.
- Mandal PK, Saharan S, Tripathi M, Murari G. Brain glutathione levels—a novel biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2015; 78(10): 702-10.
- Bettio LE, Rajendran L, Gil-Mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci Biobehav Rev* 2017; 79: 66-86.
- Kalache A, Aboderin I, Hoskins I. Compression of morbidity and active ageing: key priorities for public health policy in the 21st century. *Bull World Health Organ* 2002; 80(3): 243-4.
- Eckstrom E, Neukam S, Kalin L, Wright J. Physical activity and healthy aging. *Clin Geriatr Med* 2020; 36(4): 671-83.
- Rendeiro C, Rhodes JS. A new perspective of the hippocampus in the origin of exercise-brain interactions. *Brain Struct Funct* 2018; 223(6): 2527-45.
- Kianizadegan F, Rami M, Alizadeh A, Awang Daud DM. The effect of six weeks of high-intensity interval training with hawthorn extract supplementation on the changes of bax/bcl-2 indices in the hippocampus tissue of aged male Wistar rats [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2024; 42(769): 750-60.
- Gao Y, Syed M, Zhao X. Mechanisms underlying the effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 2023; 33(4): 373-90.
- Ojo OA, Rotimi DE, Ojo AB, Ogunlakin AD, Ajiboye BO. Gallic acid abates cadmium chloride toxicity via alteration of neurotransmitters and modulation of inflammatory markers in Wistar Rats. *Sci Rep* 2023; 13(1): 1577.
- Freitas DA, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, Mendonça VA, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav* 2018; 184: 6-11.
- Mensink M, Hesselink MKC, Russell AP, Schaart G, Sels JP, Schrauwen P. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 α and PPAR β/δ gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31(8): 1302-10.
- Nouri A, Heibati F, Heidarian E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2021; 394(1): 1-9.
- Mori T, Koyama N, Yokoo T, Segawa T, Maeda M, Sawmiller D, et al. Gallic acid is a dual α/β -secretase modulator that reverses cognitive impairment and remediates pathology in Alzheimer mice. *J Biol Chem* 2020; 295(48): 16251-66.
- Ding Y, He J, Kong F, Sun D, Chen W, Luo B, et al. Gallic Acid Alleviates Cognitive Impairment by Promoting Neurogenesis via the GSK3 β -Nrf2

- Signaling Pathway in an APP/PS1 Mouse Model. *J Alzheimers Dis Rep* 2024; 8(1): 461-77.
۲۰. Meftahi GH, Aboutaleb N. Gallic acid ameliorates behavioral dysfunction, oxidative damage, and neuronal loss in the prefrontal cortex and hippocampus in stressed rats. *J Chem Neuroanat* 2023; 134: 102364.
 ۲۱. Kahkeshani N, Farzaei F, Fotouhi M, Alavi SS, Bahramsoltani R, Naseri R, et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22(3): 225-37.
 ۲۲. Radak Z, Suzuki K, Higuchi M, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* 2016; 98: 187-96.
 ۲۳. Weston KS, Wisløff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2014; 48(16): 1227-34.
 ۲۴. Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 171-7.
 ۲۵. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-60.
 ۲۶. Costa LR, Castro CA, Marine DA, Fabrizzi F, Furino VD, Malavazi I, et al. High-Intensity interval training does not change vaspin and omentin and does not reduce visceral adipose tissue in obese rats. *Front Physiol* 2021; 12: 564862.
 ۲۷. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51.
 ۲۸. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179(1): 8-18.
 ۲۹. Alisik M, Neselioglu S, Erel O. A colorimetric method to measure oxidized, reduced and total glutathione levels in erythrocytes. *Journal of Laboratory Medicine* 2019; 43(5): 269-77.
 ۳۰. Head E. Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochem Res* 2009; 34: 670-8.
 ۳۱. Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radic Res* 2014; 48(1): 84-92.
 ۳۲. Cao G, Cutler RG. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys* 1995; 320(1): 106-14.
 ۳۳. Cao G, Cutler RG. Protein oxidation and aging. II. Difficulties in measuring alkaline protease activity in tissues using the fluorescamine procedure. *Arch Biochem Biophys* 1995; 320(1): 195-201.
 ۳۴. Galli D, Carubbi C, Masselli E, Vaccarezza M, Presta V, Pozzi G, et al. Physical activity and redox balance in the elderly: Signal transduction mechanisms. *Appl Sci* 2021; 11(5): 2228.
 ۳۵. Ghasemian SO, Seyyed A, Bazdar Teshnizi M, Mostajir M, Karimi-Dehkordi M. Effect of high-intensity interval training on cardiac oxidative stress parameters and blood serum biochemical profile in ovariectomized aged rats [in Persian]. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)* 2023; 36(3): 226-39.
 ۳۶. Freitas DA, Rocha-Vieira E, De Sousa RAL, Soares BA, Rocha-Gomes A, Chaves Garcia BC, et al. High-intensity interval training improves cerebellar antioxidant capacity without affecting cognitive functions in rats. *Behav Brain Res* 2019; 376: 112181.
 ۳۷. Abbasi B, Samadi A, Bazgir B. The combined effect of high-intensity interval training and intermittent fasting on lipid profile and peroxidation in Wistar rats under high-fat diet. *Sport Sci Health* 2020; 16: 645-52.
 ۳۸. Feter N, Spanevello RM, Soares MS, Spohr L, Pedra NS, Bona NP, et al. How does physical activity and different models of exercise training affect oxidative parameters and memory? *Physiol Behav* 2019; 201: 42-52.
 ۳۹. Ramez M, Nasirinezhad F, Rajabi H, Aboutaleb N, Naderi N. Short-term exercise training increases plasma levels of klotho and total antioxidant capacity in male Wistar rats. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2019; 21(1): 25-30.
 ۴۰. Tsakiris T, Angelogianni P, Tesseromatis C, Tsakiris S, Tsopanakis C. Alterations in antioxidant status, protein concentration, acetylcholinesterase, Na⁺, K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase activities in rat brain after forced swimming. *Int J Sports Med* 2006; 27(1): 19-24.
 ۴۱. Umegaki K, Daohua P, Sugisawa A, Kimura M, Higuchi M. Influence of one bout of vigorous exercise on ascorbic acid in plasma and oxidative damage to DNA in blood cells and muscle in untrained rats. *J Nutr Biochem* 2000; 11(7-8): 401-7.
 ۴۲. Xu Y, Tang G, Zhang C, Wang N, Feng Y. Gallic acid and diabetes mellitus: Its association with oxidative stress. *Molecules* 2021; 26(23): 7115.
 ۴۳. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: in vivo behavioral and biochemical studies for protection against scopolamine-induced amnesia. *Drug Deliv* 2013; 20(3-4): 112-9.
 ۴۴. Ogunlade B, Adelakun SA, Agie JA. Nutritional supplementation of gallic acid ameliorates Alzheimer-type hippocampal neurodegeneration and cognitive impairment induced by aluminum chloride exposure in adult Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(2): 651-62.
 ۴۵. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 2018; 10(11): 1618.
 ۴۶. Guo P, Anderson JD, Bozell JJ, Zivanovic S. The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide. *Carbohydr Polym* 2016; 140: 171-80.
 ۴۷. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother* 2021; 133: 110985.

The Effect of a Period of High Intensity Interval Training with Gallic Acid Supplementation on Oxidative Stress in Hippocampal Tissue of Aged Male Wistar Rats

Fatemeh Fakhri Pay Borji¹, ², ³, ⁴, ⁵, ⁶, ⁷, ⁸, ⁹, ¹⁰, ¹¹, ¹², ¹³, ¹⁴, ¹⁵, ¹⁶, ¹⁷, ¹⁸, ¹⁹, ²⁰, ²¹, ²², ²³, ²⁴, ²⁵, ²⁶, ²⁷, ²⁸, ²⁹, ³⁰, ³¹, ³², ³³, ³⁴, ³⁵, ³⁶, ³⁷, ³⁸, ³⁹, ⁴⁰, ⁴¹, ⁴², ⁴³, ⁴⁴, ⁴⁵, ⁴⁶, ⁴⁷, ⁴⁸, ⁴⁹, ⁵⁰, ⁵¹, ⁵², ⁵³, ⁵⁴, ⁵⁵, ⁵⁶, ⁵⁷, ⁵⁸, ⁵⁹, ⁶⁰, ⁶¹, ⁶², ⁶³, ⁶⁴, ⁶⁵, ⁶⁶, ⁶⁷, ⁶⁸, ⁶⁹, ⁷⁰, ⁷¹, ⁷², ⁷³, ⁷⁴, ⁷⁵, ⁷⁶, ⁷⁷, ⁷⁸, ⁷⁹, ⁸⁰, ⁸¹, ⁸², ⁸³, ⁸⁴, ⁸⁵, ⁸⁶, ⁸⁷, ⁸⁸, ⁸⁹, ⁹⁰, ⁹¹, ⁹², ⁹³, ⁹⁴, ⁹⁵, ⁹⁶, ⁹⁷, ⁹⁸, ⁹⁹, ¹⁰⁰, ¹⁰¹, ¹⁰², ¹⁰³, ¹⁰⁴, ¹⁰⁵, ¹⁰⁶, ¹⁰⁷, ¹⁰⁸, ¹⁰⁹, ¹¹⁰, ¹¹¹, ¹¹², ¹¹³, ¹¹⁴, ¹¹⁵, ¹¹⁶, ¹¹⁷, ¹¹⁸, ¹¹⁹, ¹²⁰, ¹²¹, ¹²², ¹²³, ¹²⁴, ¹²⁵, ¹²⁶, ¹²⁷, ¹²⁸, ¹²⁹, ¹³⁰, ¹³¹, ¹³², ¹³³, ¹³⁴, ¹³⁵, ¹³⁶, ¹³⁷, ¹³⁸, ¹³⁹, ¹⁴⁰, ¹⁴¹, ¹⁴², ¹⁴³, ¹⁴⁴, ¹⁴⁵, ¹⁴⁶, ¹⁴⁷, ¹⁴⁸, ¹⁴⁹, ¹⁵⁰, ¹⁵¹, ¹⁵², ¹⁵³, ¹⁵⁴, ¹⁵⁵, ¹⁵⁶, ¹⁵⁷, ¹⁵⁸, ¹⁵⁹, ¹⁶⁰, ¹⁶¹, ¹⁶², ¹⁶³, ¹⁶⁴, ¹⁶⁵, ¹⁶⁶, ¹⁶⁷, ¹⁶⁸, ¹⁶⁹, ¹⁷⁰, ¹⁷¹, ¹⁷², ¹⁷³, ¹⁷⁴, ¹⁷⁵, ¹⁷⁶, ¹⁷⁷, ¹⁷⁸, ¹⁷⁹, ¹⁸⁰, ¹⁸¹, ¹⁸², ¹⁸³, ¹⁸⁴, ¹⁸⁵, ¹⁸⁶, ¹⁸⁷, ¹⁸⁸, ¹⁸⁹, ¹⁹⁰, ¹⁹¹, ¹⁹², ¹⁹³, ¹⁹⁴, ¹⁹⁵, ¹⁹⁶, ¹⁹⁷, ¹⁹⁸, ¹⁹⁹, ²⁰⁰, ²⁰¹, ²⁰², ²⁰³, ²⁰⁴, ²⁰⁵, ²⁰⁶, ²⁰⁷, ²⁰⁸, ²⁰⁹, ²¹⁰, ²¹¹, ²¹², ²¹³, ²¹⁴, ²¹⁵, ²¹⁶, ²¹⁷, ²¹⁸, ²¹⁹, ²²⁰, ²²¹, ²²², ²²³, ²²⁴, ²²⁵, ²²⁶, ²²⁷, ²²⁸, ²²⁹, ²³⁰, ²³¹, ²³², ²³³, ²³⁴, ²³⁵, ²³⁶, ²³⁷, ²³⁸, ²³⁹, ²⁴⁰, ²⁴¹, ²⁴², ²⁴³, ²⁴⁴, ²⁴⁵, ²⁴⁶, ²⁴⁷, ²⁴⁸, ²⁴⁹, ²⁵⁰, ²⁵¹, ²⁵², ²⁵³, ²⁵⁴, ²⁵⁵, ²⁵⁶, ²⁵⁷, ²⁵⁸, ²⁵⁹, ²⁶⁰, ²⁶¹, ²⁶², ²⁶³, ²⁶⁴, ²⁶⁵, ²⁶⁶, ²⁶⁷, ²⁶⁸, ²⁶⁹, ²⁷⁰, ²⁷¹, ²⁷², ²⁷³, ²⁷⁴, ²⁷⁵, ²⁷⁶, ²⁷⁷, ²⁷⁸, ²⁷⁹, ²⁸⁰, ²⁸¹, ²⁸², ²⁸³, ²⁸⁴, ²⁸⁵, ²⁸⁶, ²⁸⁷, ²⁸⁸, ²⁸⁹, ²⁹⁰, ²⁹¹, ²⁹², ²⁹³, ²⁹⁴, ²⁹⁵, ²⁹⁶, ²⁹⁷, ²⁹⁸, ²⁹⁹, ³⁰⁰, ³⁰¹, ³⁰², ³⁰³, ³⁰⁴, ³⁰⁵, ³⁰⁶, ³⁰⁷, ³⁰⁸, ³⁰⁹, ³¹⁰, ³¹¹, ³¹², ³¹³, ³¹⁴, ³¹⁵, ³¹⁶, ³¹⁷, ³¹⁸, ³¹⁹, ³²⁰, ³²¹, ³²², ³²³, ³²⁴, ³²⁵, ³²⁶, ³²⁷, ³²⁸, ³²⁹, ³³⁰, ³³¹, ³³², ³³³, ³³⁴, ³³⁵, ³³⁶, ³³⁷, ³³⁸, ³³⁹, ³⁴⁰, ³⁴¹, ³⁴², ³⁴³, ³⁴⁴, ³⁴⁵, ³⁴⁶, ³⁴⁷, ³⁴⁸, ³⁴⁹, ³⁵⁰, ³⁵¹, ³⁵², ³⁵³, ³⁵⁴, ³⁵⁵, ³⁵⁶, ³⁵⁷, ³⁵⁸, ³⁵⁹, ³⁶⁰, ³⁶¹, ³⁶², ³⁶³, ³⁶⁴, ³⁶⁵, ³⁶⁶, ³⁶⁷, ³⁶⁸, ³⁶⁹, ³⁷⁰, ³⁷¹, ³⁷², ³⁷³, ³⁷⁴, ³⁷⁵, ³⁷⁶, ³⁷⁷, ³⁷⁸, ³⁷⁹, ³⁸⁰, ³⁸¹, ³⁸², ³⁸³, ³⁸⁴, ³⁸⁵, ³⁸⁶, ³⁸⁷, ³⁸⁸, ³⁸⁹, ³⁹⁰, ³⁹¹, ³⁹², ³⁹³, ³⁹⁴, ³⁹⁵, ³⁹⁶, ³⁹⁷, ³⁹⁸, ³⁹⁹, ⁴⁰⁰, ⁴⁰¹, ⁴⁰², ⁴⁰³, ⁴⁰⁴, ⁴⁰⁵, ⁴⁰⁶, ⁴⁰⁷, ⁴⁰⁸, ⁴⁰⁹, ⁴¹⁰, ⁴¹¹, ⁴¹², ⁴¹³, ⁴¹⁴, ⁴¹⁵, ⁴¹⁶, ⁴¹⁷, ⁴¹⁸, ⁴¹⁹, ⁴²⁰, ⁴²¹, ⁴²², ⁴²³, ⁴²⁴, ⁴²⁵, ⁴²⁶, ⁴²⁷, ⁴²⁸, ⁴²⁹, ⁴³⁰, ⁴³¹, ⁴³², ⁴³³, ⁴³⁴, ⁴³⁵, ⁴³⁶, ⁴³⁷, ⁴³⁸, ⁴³⁹, ⁴⁴⁰, ⁴⁴¹, ⁴⁴², ⁴⁴³, ⁴⁴⁴, ⁴⁴⁵, ⁴⁴⁶, ⁴⁴⁷, ⁴⁴⁸, ⁴⁴⁹, ⁴⁵⁰, ⁴⁵¹, ⁴⁵², ⁴⁵³, ⁴⁵⁴, ⁴⁵⁵, ⁴⁵⁶, ⁴⁵⁷, ⁴⁵⁸, ⁴⁵⁹, ⁴⁶⁰, ⁴⁶¹, ⁴⁶², ⁴⁶³, ⁴⁶⁴, ⁴⁶⁵, ⁴⁶⁶, ⁴⁶⁷, ⁴⁶⁸, ⁴⁶⁹, ⁴⁷⁰, ⁴⁷¹, ⁴⁷², ⁴⁷³, ⁴⁷⁴, ⁴⁷⁵, ⁴⁷⁶, ⁴⁷⁷, ⁴⁷⁸, ⁴⁷⁹, ⁴⁸⁰, ⁴⁸¹, ⁴⁸², ⁴⁸³, ⁴⁸⁴, ⁴⁸⁵, ⁴⁸⁶, ⁴⁸⁷, ⁴⁸⁸, ⁴⁸⁹, ⁴⁹⁰, ⁴⁹¹, ⁴⁹², ⁴⁹³, ⁴⁹⁴, ⁴⁹⁵, ⁴⁹⁶, ⁴⁹⁷, ⁴⁹⁸, ⁴⁹⁹, ⁵⁰⁰, ⁵⁰¹, ⁵⁰², ⁵⁰³, ⁵⁰⁴, ⁵⁰⁵, ⁵⁰⁶, ⁵⁰⁷, ⁵⁰⁸, ⁵⁰⁹, ⁵¹⁰, ⁵¹¹, ⁵¹², ⁵¹³, ⁵¹⁴, ⁵¹⁵, ⁵¹⁶, ⁵¹⁷, ⁵¹⁸, ⁵¹⁹, ⁵²⁰, ⁵²¹, ⁵²², ⁵²³, ⁵²⁴, ⁵²⁵, ⁵²⁶, ⁵²⁷, ⁵²⁸, ⁵²⁹, ⁵³⁰, ⁵³¹, ⁵³², ⁵³³, ⁵³⁴, ⁵³⁵, ⁵³⁶, ⁵³⁷, ⁵³⁸, ⁵³⁹, ⁵⁴⁰, ⁵⁴¹, ⁵⁴², ⁵⁴³, ⁵⁴⁴, ⁵⁴⁵, ⁵⁴⁶, ⁵⁴⁷, ⁵⁴⁸, ⁵⁴⁹, ⁵⁵⁰, ⁵⁵¹, ⁵⁵², ⁵⁵³, ⁵⁵⁴, ⁵⁵⁵, ⁵⁵⁶, ⁵⁵⁷, ⁵⁵⁸, ⁵⁵⁹, ⁵⁶⁰, ⁵⁶¹, ⁵⁶², ⁵⁶³, ⁵⁶⁴, ⁵⁶⁵, ⁵⁶⁶, ⁵⁶⁷, ⁵⁶⁸, ⁵⁶⁹, ⁵⁷⁰, ⁵⁷¹, ⁵⁷², ⁵⁷³, ⁵⁷⁴, ⁵⁷⁵, ⁵⁷⁶, ⁵⁷⁷, ⁵⁷⁸, ⁵⁷⁹, ⁵⁸⁰, ⁵⁸¹, ⁵⁸², ⁵⁸³, ⁵⁸⁴, ⁵⁸⁵, ⁵⁸⁶, ⁵⁸⁷, ⁵⁸⁸, ⁵⁸⁹, ⁵⁹⁰, ⁵⁹¹, ⁵⁹², ⁵⁹³, ⁵⁹⁴, ⁵⁹⁵, ⁵⁹⁶, ⁵⁹⁷, ⁵⁹⁸, ⁵⁹⁹, ⁶⁰⁰, ⁶⁰¹, ⁶⁰², ⁶⁰³, ⁶⁰⁴, ⁶⁰⁵, ⁶⁰⁶, ⁶⁰⁷, ⁶⁰⁸, ⁶⁰⁹, ⁶¹⁰, ⁶¹¹, ⁶¹², ⁶¹³, ⁶¹⁴, ⁶¹⁵, ⁶¹⁶, ⁶¹⁷, ⁶¹⁸, ⁶¹⁹, ⁶²⁰, ⁶²¹, ⁶²², ⁶²³, ⁶²⁴, ⁶²⁵, ⁶²⁶, ⁶²⁷, ⁶²⁸, ⁶²⁹, ⁶³⁰, ⁶³¹, ⁶³², ⁶³³, ⁶³⁴, ⁶³⁵, ⁶³⁶, ⁶³⁷, ⁶³⁸, ⁶³⁹, ⁶⁴⁰, ⁶⁴¹, ⁶⁴², ⁶⁴³, ⁶⁴⁴, ⁶⁴⁵, ⁶⁴⁶, ⁶⁴⁷, ⁶⁴⁸, ⁶⁴⁹, ⁶⁵⁰, ⁶⁵¹, ⁶⁵², ⁶⁵³, ⁶⁵⁴, ⁶⁵⁵, ⁶⁵⁶, ⁶⁵⁷, ⁶⁵⁸, ⁶⁵⁹, ⁶⁶⁰, ⁶⁶¹, ⁶⁶², ⁶⁶³, ⁶⁶⁴, ⁶⁶⁵, ⁶⁶⁶, ⁶⁶⁷, ⁶⁶⁸, ⁶⁶⁹, ⁶⁷⁰, ⁶⁷¹, ⁶⁷², ⁶⁷³, ⁶⁷⁴, ⁶⁷⁵, ⁶⁷⁶, ⁶⁷⁷, ⁶⁷⁸, ⁶⁷⁹, ⁶⁸⁰, ⁶⁸¹, ⁶⁸², ⁶⁸³, ⁶⁸⁴, ⁶⁸⁵, ⁶⁸⁶, ⁶⁸⁷, ⁶⁸⁸, ⁶⁸⁹, ⁶⁹⁰, ⁶⁹¹, ⁶⁹², ⁶⁹³, ⁶⁹⁴, ⁶⁹⁵, ⁶⁹⁶, ⁶⁹⁷, ⁶⁹⁸, ⁶⁹⁹, ⁷⁰⁰, ⁷⁰¹, ⁷⁰², ⁷⁰³, ⁷⁰⁴, ⁷⁰⁵, ⁷⁰⁶, ⁷⁰⁷, ⁷⁰⁸, ⁷⁰⁹, ⁷¹⁰, ⁷¹¹, ⁷¹², ⁷¹³, ⁷¹⁴, ⁷¹⁵, ⁷¹⁶, ⁷¹⁷, ⁷¹⁸, ⁷¹⁹, ⁷²⁰, ⁷²¹, ⁷²², ⁷²³, ⁷²⁴, ⁷²⁵, ⁷²⁶, ⁷²⁷, ⁷²⁸, ⁷²⁹, ⁷³⁰, ⁷³¹, ⁷³², ⁷³³, ⁷³⁴, ⁷³⁵, ⁷³⁶, ⁷³⁷, ⁷³⁸, ⁷³⁹, ⁷⁴⁰, ⁷⁴¹, ⁷⁴², ⁷⁴³, ⁷⁴⁴, ⁷⁴⁵, ⁷⁴⁶, ⁷⁴⁷, ⁷⁴⁸, ⁷⁴⁹, ⁷⁵⁰, ⁷⁵¹, ⁷⁵², ⁷⁵³, ⁷⁵⁴, ⁷⁵⁵, ⁷⁵⁶, ⁷⁵⁷, ⁷⁵⁸, ⁷⁵⁹, ⁷⁶⁰, ⁷⁶¹, ⁷⁶², ⁷⁶³, ⁷⁶⁴, ⁷⁶⁵, ⁷⁶⁶, ⁷⁶⁷, ⁷⁶⁸, ⁷⁶⁹, ⁷⁷⁰, ⁷⁷¹, ⁷⁷², ⁷⁷³, ⁷⁷⁴, ⁷⁷⁵, ⁷⁷⁶, ⁷⁷⁷, ⁷⁷⁸, ⁷⁷⁹, ⁷⁸⁰, ⁷⁸¹, ⁷⁸², ⁷⁸³, ⁷⁸⁴, ⁷⁸⁵, ⁷⁸⁶, ⁷⁸⁷, ⁷⁸⁸, ⁷⁸⁹, ⁷⁹⁰, ⁷⁹¹, ⁷⁹², ⁷⁹³, ⁷⁹⁴, ⁷⁹⁵, ⁷⁹⁶, ⁷⁹⁷, ⁷⁹⁸, ⁷⁹⁹, ⁸⁰⁰, ⁸⁰¹, ⁸⁰², ⁸⁰³, ⁸⁰⁴, ⁸⁰⁵, ⁸⁰⁶, ⁸⁰⁷, ⁸⁰⁸, ⁸⁰⁹, ⁸¹⁰, ⁸¹¹, ⁸¹², ⁸¹³, ⁸¹⁴, ⁸¹⁵, ⁸¹⁶, ⁸¹⁷, ⁸¹⁸, ⁸¹⁹, ⁸²⁰, ⁸²¹, ⁸²², ⁸²³, ⁸²⁴, ⁸²⁵, ⁸²⁶, ⁸²⁷, ⁸²⁸, ⁸²⁹, ⁸³⁰, ⁸³¹, ⁸³², ⁸³³, ⁸³⁴, ⁸³⁵, ⁸³⁶, ⁸³⁷, ⁸³⁸, ⁸³⁹, ⁸⁴⁰, ⁸⁴¹, ⁸⁴², ⁸⁴³, ⁸⁴⁴, ⁸⁴⁵, ⁸⁴⁶, ⁸⁴⁷, ⁸⁴⁸, ⁸⁴⁹, ⁸⁵⁰, ⁸⁵¹, ⁸⁵², ⁸⁵³, ⁸⁵⁴, ⁸⁵⁵, ⁸⁵⁶, ⁸⁵⁷, ⁸⁵⁸, ⁸⁵⁹, ⁸⁶⁰, ⁸⁶¹, ⁸⁶², ⁸⁶³, ⁸⁶⁴, ⁸⁶⁵, ⁸⁶⁶, ⁸⁶⁷, ⁸⁶⁸, ⁸⁶⁹, ⁸⁷⁰, ⁸⁷¹, ⁸⁷², ⁸⁷³, ⁸⁷⁴, ⁸⁷⁵, ⁸⁷⁶, ⁸⁷⁷, ⁸⁷⁸, ⁸⁷⁹, ⁸⁸⁰, ⁸⁸¹, ⁸⁸², ⁸⁸³, ⁸⁸⁴, ⁸⁸⁵, ⁸⁸⁶, ⁸⁸⁷, ⁸⁸⁸, ⁸⁸⁹, ⁸⁹⁰, ⁸⁹¹, ⁸⁹², ⁸⁹³, ⁸⁹⁴, ⁸⁹⁵, ⁸⁹⁶, ⁸⁹⁷, ⁸⁹⁸, ⁸⁹⁹, ⁹⁰⁰, ⁹⁰¹, ⁹⁰², ⁹⁰³, ⁹⁰⁴, ⁹⁰⁵, ⁹⁰⁶, ⁹⁰⁷, ⁹⁰⁸, ⁹⁰⁹, ⁹¹⁰, ⁹¹¹, ⁹¹², ⁹¹³, ⁹¹⁴, ⁹¹⁵, ⁹¹⁶, ⁹¹⁷, ⁹¹⁸, ⁹¹⁹, ⁹²⁰, ⁹²¹, ⁹²², ⁹²³, ⁹²⁴, ⁹²⁵, ⁹²⁶, ⁹²⁷, ⁹²⁸, ⁹²⁹, ⁹³⁰, ⁹³¹, ⁹³², ⁹³³, ⁹³⁴, ⁹³⁵, ⁹³⁶, ⁹³⁷, ⁹³⁸, ⁹³⁹, ⁹⁴⁰, ⁹⁴¹, ⁹⁴², ⁹⁴³, ⁹⁴⁴, ⁹⁴⁵, ⁹⁴⁶, ⁹⁴⁷, ⁹⁴⁸, ⁹⁴⁹, ⁹⁵⁰, ⁹⁵¹, ⁹⁵², ⁹⁵³, ⁹⁵⁴, ⁹⁵⁵, ⁹⁵⁶, ⁹⁵⁷, ⁹⁵⁸, ⁹⁵⁹, ⁹⁶⁰, ⁹⁶¹, ⁹⁶², ⁹⁶³, ⁹⁶⁴, ⁹⁶⁵, ⁹⁶⁶, ⁹⁶⁷, ⁹⁶⁸, ⁹⁶⁹, ⁹⁷⁰, ⁹⁷¹, ⁹⁷², ⁹⁷³, ⁹⁷⁴, ⁹⁷⁵, ⁹⁷⁶, ⁹⁷⁷, ⁹⁷⁸, ⁹⁷⁹, ⁹⁸⁰, ⁹⁸¹, ⁹⁸², ⁹⁸³, ⁹⁸⁴, ⁹⁸⁵, ⁹⁸⁶, ⁹⁸⁷, ⁹⁸⁸, ⁹⁸⁹, ⁹⁹⁰, ⁹⁹¹, ⁹⁹², ⁹⁹³, ⁹⁹⁴, ⁹⁹⁵, ⁹⁹⁶, ⁹⁹⁷, ⁹⁹⁸, ⁹⁹⁹, ¹⁰⁰⁰, ¹⁰⁰¹, ¹⁰⁰², ¹⁰⁰³, ¹⁰⁰⁴, ¹⁰⁰⁵, ¹⁰⁰⁶, ¹⁰⁰⁷, ¹⁰⁰⁸, ¹⁰⁰⁹, ¹⁰¹⁰, ¹⁰¹¹, ¹⁰¹², ¹⁰¹³, ¹⁰¹⁴, ¹⁰¹⁵, ¹⁰¹⁶, ¹⁰¹⁷, ¹⁰¹⁸, ¹⁰¹⁹, ¹⁰²⁰, ¹⁰²¹, ¹⁰²², ¹⁰²³, ¹⁰²⁴, ¹⁰²⁵, ¹⁰²⁶, ¹⁰²⁷, ¹⁰²⁸, ¹⁰²⁹, ¹⁰³⁰, ¹⁰³¹, ¹⁰³², ¹⁰³³, ¹⁰³⁴, ¹⁰³⁵, ¹⁰³⁶, ¹⁰³⁷, ¹⁰³⁸, ¹⁰³⁹, ¹⁰⁴⁰, ¹⁰⁴¹, ¹⁰⁴², ¹⁰⁴³, ¹⁰⁴⁴, ¹⁰⁴⁵, ¹⁰⁴⁶, ¹⁰⁴⁷, ¹⁰⁴⁸, ¹⁰⁴⁹, ¹⁰⁵⁰, ¹⁰⁵¹, ¹⁰⁵², ¹⁰⁵³, ¹⁰⁵⁴, ¹⁰⁵⁵, ¹⁰⁵⁶, ¹⁰⁵⁷, ¹⁰⁵⁸, ¹⁰⁵⁹, ¹⁰⁶⁰, ¹⁰⁶¹, ¹⁰⁶², ¹⁰⁶³, ¹⁰⁶⁴, ¹⁰⁶⁵, ¹⁰⁶⁶, ¹⁰⁶⁷, ¹⁰⁶⁸, ¹⁰⁶⁹, ¹⁰⁷⁰, ¹⁰⁷¹, ¹⁰⁷², ¹⁰⁷³, ¹⁰⁷⁴, ¹⁰⁷⁵, ¹⁰⁷⁶, ¹⁰⁷⁷, ¹⁰⁷⁸, ¹⁰⁷⁹, ¹⁰⁸⁰, ¹⁰⁸¹, ¹⁰⁸², ¹⁰⁸³, ¹⁰⁸⁴, ¹⁰⁸⁵, ¹⁰⁸⁶, ¹⁰⁸⁷, ¹⁰⁸⁸, ¹⁰⁸⁹, ¹⁰⁹⁰, ¹⁰⁹¹, ¹⁰⁹², ¹⁰⁹³, ¹⁰⁹⁴, ¹⁰⁹⁵, ¹⁰⁹⁶, ¹⁰⁹⁷, ¹⁰⁹⁸, ¹⁰⁹⁹, ¹¹⁰⁰, ¹¹⁰¹, ¹¹⁰², ¹¹⁰³, ¹¹⁰⁴, ¹¹⁰⁵, ¹¹⁰⁶, ¹¹⁰⁷, ¹¹⁰⁸, ¹¹⁰⁹, ¹¹¹⁰, ¹¹¹¹, ¹¹¹², ¹¹¹³, ¹¹¹⁴, ¹¹¹⁵, ¹¹¹⁶, ¹¹¹⁷, ¹¹¹⁸, ¹¹¹⁹, ¹¹²⁰, ¹¹²¹, ¹¹²², ¹¹²³, ¹¹²⁴, ¹¹²⁵, ¹¹²⁶, ¹¹²⁷, ¹¹²⁸, ¹¹²⁹, ¹¹³⁰, ¹¹³¹, ¹¹³², ¹¹³³, ¹¹³⁴, ¹¹³⁵, ¹¹³⁶, ¹¹³⁷, ¹¹³⁸, ¹¹³⁹, ¹¹⁴⁰, ¹¹⁴¹, ¹¹⁴², ¹¹⁴³, ¹¹⁴⁴, ¹¹⁴⁵, ¹¹⁴⁶, ¹¹⁴⁷, ¹¹⁴⁸, ¹¹⁴⁹, ¹¹⁵⁰, ¹¹⁵¹, ¹¹⁵², ¹¹⁵³, ¹¹⁵⁴, ¹¹⁵⁵, ¹¹⁵⁶, ¹¹⁵⁷, ¹¹⁵⁸, ¹¹⁵⁹, ¹¹⁶⁰, ¹¹⁶¹, ¹¹⁶², ¹¹⁶³, ¹¹⁶⁴, ¹¹⁶⁵, ¹¹⁶⁶, ¹¹⁶⁷, ¹¹⁶⁸, ¹¹⁶⁹, ¹¹⁷⁰, ¹¹⁷¹, ¹¹⁷², ¹¹⁷³, ¹¹⁷⁴, ¹¹⁷⁵, ¹¹⁷⁶, ¹¹⁷⁷, ¹¹⁷⁸, ¹¹⁷⁹, ¹¹⁸⁰, ¹¹⁸¹, ¹¹⁸², ¹¹⁸³, ¹¹⁸⁴, ¹¹⁸⁵, ¹¹⁸⁶, ¹¹⁸⁷, ¹¹⁸⁸, ¹¹⁸⁹, ¹¹⁹⁰, ¹¹⁹¹, ¹¹⁹², ¹¹⁹³, ¹¹⁹⁴, ¹¹⁹⁵, ¹¹⁹⁶, ¹¹⁹⁷, ¹¹⁹⁸, ¹¹⁹⁹, ¹²⁰⁰, ¹²⁰¹, ¹²⁰², ¹²⁰³, ¹²⁰⁴, ¹²⁰⁵, ¹²⁰⁶, ¹²⁰⁷, ¹²⁰⁸, ¹²⁰⁹, ¹²¹⁰, ¹²¹¹, ¹²¹², ¹²¹³, ¹²¹⁴, ¹²¹⁵, ¹²¹⁶, ¹²¹⁷, ¹²¹⁸, ¹²¹⁹, ¹²²⁰, ¹²²¹, ¹²²², ¹²²³, ¹²²⁴, ¹²²⁵, ¹²²⁶, ¹²²⁷, ¹²²⁸, ¹²²⁹, ¹²³⁰, ¹²³¹, ¹²³², ¹²³³, ¹²³⁴, ¹²³⁵, ¹²³⁶, ¹²³⁷, ¹²³⁸, ¹²³⁹, ¹²⁴⁰, ¹²⁴¹, ¹²⁴², ¹²⁴³, ¹²⁴⁴, ¹²⁴⁵, ¹²⁴⁶, ¹²⁴⁷, ¹²⁴⁸, ¹²⁴⁹, ¹²⁵⁰, ¹²⁵¹, ¹²⁵², ¹²⁵³, ¹²⁵⁴, ¹²⁵⁵, ¹²⁵⁶, ¹²⁵⁷, ¹²⁵⁸, ¹²⁵⁹, ¹²⁶⁰, ¹²⁶¹, ¹²⁶², ¹²⁶³, ¹²⁶⁴, ¹²⁶⁵, ¹²⁶⁶, ¹²⁶⁷, ¹²⁶⁸, ¹²⁶⁹, ¹²⁷⁰, ¹²⁷¹, ¹²⁷², ¹²⁷³, ¹²⁷⁴, ¹²⁷⁵, ¹²⁷⁶, ¹²⁷⁷, ¹²⁷⁸, ¹²⁷⁹, ¹²⁸⁰, ¹²⁸¹, ¹²⁸², ¹²⁸³, ¹²⁸⁴, ¹²⁸⁵, ¹²⁸⁶, ¹²⁸⁷, ¹²⁸⁸, ¹²⁸⁹, ¹²⁹⁰, ¹²⁹¹, ¹²⁹², ¹²⁹³, ¹²⁹⁴, ¹²⁹⁵, ¹²⁹⁶, ¹²⁹⁷, ¹²⁹⁸, ¹²⁹⁹, ¹³⁰⁰, ¹³⁰¹, ¹³⁰², ¹³⁰³, ¹³⁰⁴, ¹³⁰⁵, ¹³⁰⁶, ¹³⁰⁷, ¹³⁰⁸, ¹³⁰⁹,