

## بیان ژنی آنزیم Cu/Zn Superoxide Dismutase سلول‌های لنفوسیتی، تغییرات آنتی‌اکسیدان تام و شاخص‌های استرس اکسیداتیو تحت تاثیر تمرین شدید بدنی در مردان جوان ورزشکار

\*بهرروز بقایی: کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (نویسنده مسئول) behrouz\_phsport@yahoo.com  
 دکتر بختیار تربیبیان: دانشیار و متخصص فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. bartibian@gmail.com  
 محمدرضا علی پرستی: کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. aliparasty@sums.ac.ir  
 دکتر بهزاد برادران: استادیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. behzad\_im@yahoo.com  
 شهره الماسی: کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان ژنی آنزیم Cu/Zn Superoxide Dismutase سلول‌های لنفوسیتی، تغییرات آنتی‌اکسیدان تام و شاخص‌های استرس اکسیداتیو تحت تاثیر تمرین شدید بدنی در مردان جوان ورزشکار می‌باشد.

**روش کار:** تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری متعدد می‌باشد که در آن ۲۰ مرد ورزشکار (۲۳-۲۱ سال) به صورت داوطلبانه و پس از اخذ رضایت نامه در تحقیق شرکت داده شدند. در سه حالت قبل از فعالیت، پس از تست شدید ورزشی (سرعت: ۷/۵ مایل بر ساعت، شیب: ۵ درجه، زمان: ۲۰ دقیقه) و در حالت بهبودی (Recovery ۳ ساعت بعد از انجام تست تمرینی)، خون‌گیری ورید بازویی از آزمودنی‌ها به عمل آمد. برای اندازه‌گیری mRNA آنزیم Cu/Zn SOD از روش Real time- Polymerase chain reaction و سایر شاخص‌ها از اتو آنالیزور استفاده شد.

**یافته‌ها:** سطح  $H_2O_2$  بعد از تمرین شدید بدنی و ۳ ساعت بعد از آن افزایش معنی داری یافت ( $p=0/012$ ) و ( $p=0/014$ ) و ( $3/36 \pm 0/85$  و  $3/37 \pm 0/99$ ) (p=0/014) و ( $4/07 \pm 0/86$ ) و ( $5/03 \pm 2/37$ ) TAS سطح نیز فقط در مرحله بهبودی افزایش معنی داری داشت ( $p=0/009$ ) ( $0/86 \pm 0/16$ ).

**نتیجه‌گیری:** تمرین شدید بدنی باعث افزایش سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو و تضعیف دستگاه ایمنی افراد ورزشکار مرد می‌شود، اما این افراد در پاسخ به تهدیدات صورت گرفته از سوی رادیکال‌های آزاد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهند و بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD افزایش معنی‌داری نمی‌یابد.

**کلیدواژه‌ها:** mRNA Cu/Zn SOD، آنتی‌اکسیدان تام، پراکسید هیدروژن، مردان ورزشکار.

### مقدمه

استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن بین تولید رادیکال‌های آزاد، عوامل التهابی و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها، بی‌نظمی به وجود می‌آید که می‌تواند منجر به افزایش سطح رادیکال‌های آزاد گردد (۱). از سوی دیگر رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با تک الکترون منفرد هستند که به دلیل بی‌ثباتی شیمیایی تمایل زیادی به واکنش با الکترون مولکول‌های دیگر همانند DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها دارند و منجر به آسیب‌هایی در ساختار و عملکرد آن‌ها و بافت‌ها می‌شوند (۲). مطالعات نشان می‌دهد که حضور بیش از حد اکسیژن در دسترس، منجر به

افزایش این نوع از اکسیدان‌ها می‌شود و لذا در حین فعالیت‌های شدید بدنی که با افزایش اکسیژن مصرفی روبه‌رو هستیم، تولید آن‌ها به چندین برابر افزایش می‌یابد (۳ و ۴). پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) نیز یکی از زیر شاخه‌های رادیکال‌های آزاد می‌باشد، که در ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو نقش مهمی را ایفا می‌کند (۵). معمولاً غشا و DNA سلولی بیشترین نقاطی از سلول هستند که از طرف  $H_2O_2$  دچار آسیب می‌گردند، زیرا ساختار غشای سلولی محتوی لیپیدهای غیر اشباع یا به عبارتی پیوندهای دوگانه است که این پیوندها از سوی رادیکال‌های آزاد مورد هدف قرار گرفته و در نتیجه

از سویی دیگر فعالیت های بدنی و سطح آمادگی افراد نیز بر بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD تاثیرگذار هستند که بر حسب نوع فعالیت و یا سطح آمادگی جسمانی ممکن است، سطح بیان ژنی این آنزیم متفاوت باشد و از این رو نتایج تحقیقات در این مورد با تناقضاتی همراه می باشد. چنانچه در تحقیقی که بر تاثیر فعالیت بدنی بر روی بیان ژنی سوپراکسیداز دیسموتاز در موش های آزمایشگاهی انجام شد، افزایش معنی دار بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی را در سلول های عضلانی در اثر فعالیت شدید ورزشی گزارش کرده اند (۱۲). با این حال مطالعه دیگری افزایش معنی داری را در mRNA آنزیم SOD در آزمودنی های مرد متعاقب فعالیت شدید نشان نداد (۱۳). از این رو با توجه به نتایج متناقض و این که تحقیقی در مورد ورزشکاران نژاد ایرانی مبنی بر بررسی بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD در کنار شاخص های آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو یافت نشد، محققین پژوهش حاضر بر آن شدند که بیان ژنی آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز سیتوپلاسمی و تغییرات آنتی اکسیدان تام و همچنین تغییرات شاخص های استرس اکسیداتیو را در مردان جوان ورزشکار نژاد ایرانی مورد بررسی قرار دهند.

### روش بررسی

آزمودنی ها: تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه گیری مکرر می باشد که جامعه آماری آن را مردان ورزشکار تشکیل می دهد. طی فراخوان به عمل آمده، ۵۰ نفر ورزشکار مرد جوان شهر ارومیه داوطلب شرکت در تحقیق شدند و پرسشنامه تندرستی و رضایت نامه شرکت در تحقیق را تکمیل نمودند. ویژگی های فیزیولوژیکی آنها شامل قد (سانتیمتر)، وزن (کیلوگرم)، درصد چربی (٪)، و ضربان قلب (ضربان در دقیقه) و... مورد بررسی قرار گرفت. افراد با سابقه ابتلا به بیماری های مزمن و افرادی که از نظر شاخص فیزیولوژیک فاقد معیارهای مورد نظر برای ورزشکار بودن شناخته شدند، از شرکت در تحقیق حذف گردیدند و از بین آن ها ۲۰ آزمودنی با دامنه سنی ۲۱-۲۳ سال در تحقیق شرکت داده شدند.

به سستی و گسست پیوند هیدروژنی منجر می شوند. با سست شدن پیوند بین مولکول های غشا، فعالیت سلول نیز دچار مشکلاتی می گردد (۷۶)؛ لذا برخی از محققین معتقدند که افزایش غلظت H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در خون، وابسته به شدت ورزش می باشد و هر اندازه فعالیت از شدت بیشتری برخوردار باشد، تولید و رها سازی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> نیز افزایش بیشتری می یابد (۸).

از این رو تمرین شدید بدنی نوعی فعالیت ورزشی است که در آن سرعت و شیب مسافت با افزایش زمان فعالیت، گسترش می یابد و با افزایش تدریجی شدت فعالیت همراه می باشد. شدت فعالیت نیز نتیجه تحریک های عصبی است که ورزشکار هنگام تمرین به کار می گیرد و با توجه به نیاز بیشتر به مصرف اکسیژن در حین ورزش های هوازی و در نتیجه دریافت و انتقال و جذب اکسیژن از محیط بیرونی به محیط درون بدن به منظور سوخت و ساز مواد سه گانه غذایی، افزایش یافته و باعث تولید استرس اکسیداتیوهای بیشتری می گردد (۹). برای مقابله با شرایط استرس اکسیداتیو و التهابی، سیستم دفاعی بدن از آنتی اکسیدان ها بهره می گیرد. آنتی اکسیدان ها نیز به دو صورت آنزیمی و غیر آنزیمی وجود دارند. آنزیم های آنتی اکسیدان به انواع مختلفی تقسیم می شوند که Cu/Zn SOD از نخستین آنزیم هایی است که در برابر رادیکال های آزاد و کاستن اثرات آن ها از سوی لنفوسیت ها و بافت های مختلف آزاد می شود (۱۰). Cu/Zn SOD از ژن های موجود در DNA هسته سلول رونویسی می شود که در سیتوپلاسم سلولی حضور فعال داشته و نقش برجسته ای نیز در جلوگیری از بسیاری از بیماری ها بر عهده دارد. ناهنجاری در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز باعث بروز بسیاری از بیماری ها مانند آلزایمر، آسیب های مفاصل، مشکلات پروستات، آسیب های مغزی، بیماری های التهابی و التهاب شکم شده و همچنین باعث تاخیر در بهبود زخم و سوختگی ها می شود. ناهنجاری در ژن SOD باعث بروز بیماری ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) نیز می گردد. ALS بیماری است که در آن سلول های عصبی به علت کمبود SOD در برابر رادیکال های آزاد دچار آسیب می شوند (۱۱).

و ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز رویی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شد. به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه شد و سپس در دمای ۴ درجه و ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی بیرون ریخته شد و سپس یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه گردید.

به هر میکروتیوب ۲۰ میکرولیتر Diethylpyrocabonate-treated water افزوده شد و برای ادامه مراحل در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید.

ساخت cDNA از کیت RevertAID™ First Standard cDNA synthesis (Fermentas) برای ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر استفاده شد:

۱- ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید.

۲- ۱ میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت.

۳- به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر Oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر 5X reaction buffer و ۲ میکرولیتر Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) 10mM mix و ۱ میکرولیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید.

۴- ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse به تیوب از قبل افزوده شد.

*Real-time PCR* برای اندازه گیری میزان بیان

در شرایط پایه و ناشتا، به منظور بررسی غلظت پایه شاخص های خونی مورد نظر به مقدار ۴ سی سی خون وریدی جمع آوری شد. ۲ سی سی از این خون در لوله فالکون (Falcon tube) ۵۰ میلی محتوی ماده ضد انعقاد (Ethyelne diamine tetra acetic) EDTA (acid) ریخته و ۲ سی سی دیگر در لوله فالکون ۱۵ میلی قرار داده شد. لوله فالکون های محتوی خون در دمای ۴ درجه نگهداری شده و به آزمایشگاه انتقال یافتند.

**برنامه فعالیت بدنی:** تمرین شدید بدنی بر اساس تست GXT (Graded Exercise Test) اجرا شد که آزمودنی ها ابتدا به مدت سه دقیقه روی حداقل شیب نوار گردان شروع به راه رفتن کردند. سپس در مرحله بعد با افزایش زمان فعالیت، شیب و سرعت فعالیت افزایش یافت و حداکثر به شیب ۵ درجه و سرعت ۷/۵ مایل در ساعت رسید و افراد ۲۰ دقیقه فعالیت مورد نظر را انجام دادند. پس از اتمام فعالیت نمونه خون به مقدار ۴ سی سی جمع آوری گردید. بعد از ۳ ساعت از تمرین شدید بدنی، مجدداً خون گیری سوم به مقدار ۴ سی سی به عمل آمد.

### روش آزمایشگاهی بیان ژنی Cu/Zn SOD

**جداسازی RNA:** برای جداسازی RNA توتال از پروتئین محیطی و cDNA استخراج شده از خون محیطی به روش زیر عمل شد:

۵ میلی لیتر خون محیطی در ضد انعقاد EDTA گرفته شده و با استفاده از کلرید آمونیوم RBC های آن لیز (Lysis) شده، و به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۶۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی تخلیه (Aspiration) شد و سلول ها با یک میلی لیتر Phosphate Buffered Saline (PBS) سرد شستشو داده شدند. سپس به لوله های ۱/۵ میلی لیتری Deoxyribonuclease Free Ribonuclease Free منتقل شدند. در مرحله بعد یک میلی لیتر محلول RNXTM-PLUS به ازای هر ۶×۱۰۶ سلول به میکروتیوب (microtube) افزوده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه

به میزان ۲ میلی لیتر بوتانل نرمال اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۲ دقیقه ورتکس نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و پس از جدا کردن فاز آلی (محلول رویی) اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بوتانل نرمال به عنوان بلانک انجام گرفته و  $H_2O_2$  سرمی نمونه های حاصل، پس از انتقال به منحنی استاندارد تترامتوکسی پروپان ( $C_7H_{16}O_4$ ) در ۶ غلظت مختلف ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ نانو مول در میلی لیتر با استفاده از حل کردن در آب دیونیزه تهیه و جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت، غلظت  $H_2O_2$  سرمی نمونه ها تعیین گردید.

روش آزمایشگاهی اندازه گیری آنتی اکسیدان تام  $TAS$  (*Total antioxidant status*): اندازه گیری  $TAS$  با استفاده از کیت (Randox, Uk) و دستگاه اتوآنالیزور COBAS-MIRA plus (ساخت کمپانی Roche) انجام یافت.

نحوه محاسبه حداکثر اکسیژن مصرفی  $(Volume\ of\ O_2\ maximum = V_{O2max})$  (این فرمول اختصاص به مردان دارد) (۱۴):  
حداکثر اکسیژن مصرفی:

$$\left( \frac{4}{47} \right) + \left( \text{وزن (کیلوگرم)} \times \frac{0}{193} \right) - \left( \text{سرعت ساعت / مایل} \times \frac{0}{1453} \right) - \left( \frac{54}{07} + \frac{7}{062} \right)$$

### تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در تحقیق حاضر توزیع طبیعی داده ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov مشخص گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده ها نیز با استفاده از Mixed Model از آزمون آماری اندازه گیری های مکرر استفاده شد. از آزمون بونفرونی (Bonferoni) نیز برای تعقیب و مشخص نمودن محل وجود تفاوت ها استفاده گردید. در این پژوهش، ارتباط شاخص ها توسط رگرسیون خطی (Regression Linear) مشخص گردید. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و در سطح معنی داری  $p \leq 0/05$  انجام گرفت.

ژنی Cu/Zn SOD از دستگاه مربوطه Corbett-Rotor (gene -6000) استفاده شد. جفت پرایمرهای (Primer) مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شده و توسط بایونیر (-Bioneer Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی نانومتر ۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند.

### پرایمرها

واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می کند. به عنوان بلانک (Blanch) از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. در پایان قبل از آنالیز داده ها، منحنی ذوب (Melting curve)، به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر (Dimer) تایید شود. برای آنالیز داده ها ابتدا،  $\Delta Ct$  (Ct of target gene- Ct of  $\beta$ -actin gene) (Cycle Threshold) ژن مربوطه و Ct ژن  $\beta$ -actin به عنوان مرجع محاسبه شد.

### روش آزمایشگاهی اندازه گیری $H_2O_2$

اساس روش اندازه گیری  $H_2O_2$  سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric Acid) (TBA)، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه گیری جذب با روش اسپکتروفوتومتری (Spectrophotometry) و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می باشد.

اندازه گیری  $H_2O_2$  با حل کردن ۵۰۰ میکرو لیتر سرم در ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (شرکت مرک) ۱٪ آغاز می گردد. پس از ورتکس (Vortex) کردن به میزان ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪ (شرکت مرک) به لوله آزمایش اضافه شده و در ادامه به مدت ۴۵ دقیقه در داخل یک بن ماری در حال جوش قرار داده می شود. پس از اتمام مدت لازم، لوله های آزمایش را زیر آب سرد خنک کرده،

## یافته‌ها

یافته‌های فیزیولوژیکی مردان ورزشکار در جدول ۱ نشان داده شده است و جدول ۲ نیز توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بیان ژنی Cu/Zn SOD را مشخص کرده است. در بررسی سطح شاخص‌های پلاسمایی و ژنی، مشخص شد که بعد از فعالیت، سطح  $H_2O_2$  افزایش معنی داری را در مردان ورزشکار جوان داشت ( $p \leq 0.05$ ) ( $3/37 \pm 0/99$ )، و ۳ ساعت بعد از تمرین شدید بدنی نیز سطح این شاخص خونی همچنان افزایش یافت که تفاوت آن با حالت پایه از نظر آماری معنی دار گزارش شد ( $p \leq 0.014$ ) ( $3/36 \pm 0/85$ ) (جدول ۳).

از سوی دیگر سطح mRNA آنزیم Cu/Zn SOD نیز بعد از تمرین شدید بدنی و ۳ ساعت بعد، تا حدی افزایش یافت، لیکن با بررسی‌های آماری مشخص گردید که این تغییرات معنادار نبوده است ( $p \geq 0/99$  و  $p \geq 0/346$ ) ( $4/07 \pm 0/86$  و  $5/03 \pm 2/7$ ) (نمودار ۱). همچنین بررسی نمونه‌های خونی نشان داد که سطح TAS بعد از فعالیت، در مردان ورزشکار با افزایش معنی داری همراه نبوده است ( $p \geq 0/437$ ) ( $0/82 \pm 0/12$ ). با این حال در مرحله بهبودی این افزایش معنی دار گزارش شد ( $p \leq 0/009$ ) ( $0/86 \pm 0/16$ ) (نمودار ۲). (لازم به ذکر تمام p value ها در مقایسه با حالت پایه به دست آمده‌اند).

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیولوژیکی مردان ورزشکار جوان

Mean $\pm$ SD	شاخص‌های فیزیولوژیکی
177/59 $\pm$ 7/02	قد
54/70 $\pm$ 6/1	وزن
11/16 $\pm$ 4/73	درصد چربی
55/97 $\pm$ 1/35	VO2max
22/5 $\pm$ 1/5	شاخص توده بدنی

علاوه بر این آزمون آماری رگرسیون خطی نیز نشان داد که به ازای هر یک واحد افزایش در سطح  $H_2O_2$ ، بیان ژنی Cu/Zn SOD ۲/۶۲- درصد و غلظت TAS ۰/۱- واحد کاهش یافته است، لیکن هیچ کدام این ارتباط‌ها و تغییرات معنی داری گزارش نشد ( $p \geq 0/05$ ) (جدول ۴).

## بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های آماری پژوهش حاضر موید افزایش سطح  $H_2O_2$  در مردان ورزشکار جوان در اثر تمرین شدید بدنی است. نظر به اینکه برنامه تمرینی مورد استفاده در این تحقیق را فعالیت هوازی و شدید تشکیل می‌دهد، لذا افزایش در غلظت  $H_2O_2$  را می‌توان در مصرف بالای اکسیژن توسط بافت‌ها و یا آسیب عضلات در طی فعالیت ورزشی شدید دانست. چنانچه مطالعات پیشین نیز نشان داده است، افزایش غلظت  $H_2O_2$ ، وابسته به شدت ورزش بوده و هر

جدول ۲- توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای بیان ژن Cu/Zn SOD

H Cu/Zn-SOD Forward	5'-AAGGCCGTGTGCGTGCTGAA-3'
H Cu/Zn-SOD Reverse	5'-CAAGTCTCCAACATGCCTCT-3'
H $\beta$ -actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATTGGCAAT-3'
H $\beta$ -actin Reverse	5'-TCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

جدول ۳- تغییرات پراکسید هیدروژن در سه مرحله از فعالیت

متغیر	Mean $\pm$ SD	سطح معنی داری
$H_2O_2$ ( $\mu$ m)	حالت پایه	$0/84 \pm 2/95$
	بعد از فعالیت	$3/37 \pm 0/99$
	بهبودی	$3/36 \pm 0/85$

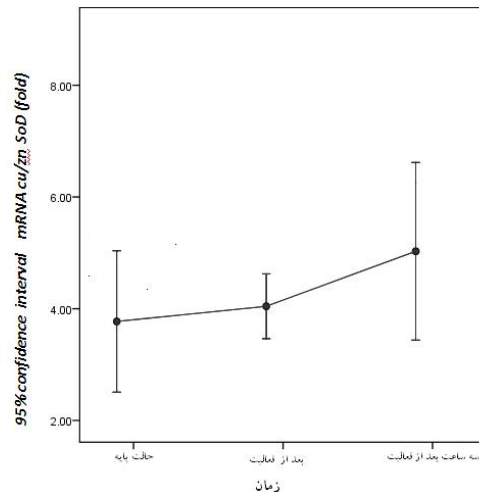
(مقایسه بعد از فعالیت با حالت پایه = p1 و مقایسه مرحله بهبودی با حالت پایه = p2 (بر اساس آنالیز آماری اندازه‌گیری‌های مکرر و آزمون تعقیبی بونفرونی)

جدول ۴- ارتباط بین تغییرات TAS و بیان ژنی SOD با سطح  $H_2O_2$  (بر اساس آزمون آماری رگرسیون خطی)

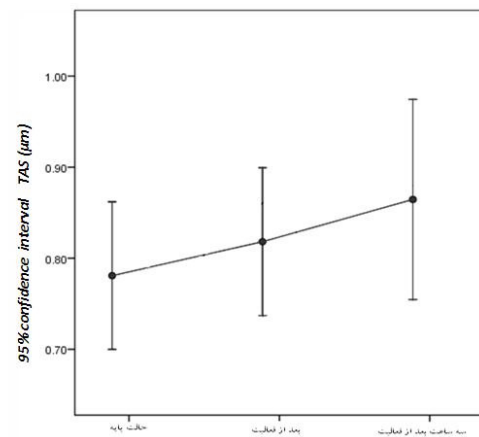
پاسخ	متغیر	P	B (95% confidence interval)
Total antioxidant status	$H_2O_2$	۰/۹۳۹	- ۰/۰۱
mRNA Cu/Zn SOD		۰/۰۵۱	-۲/۶۲

بیشتری در مقایسه با زنان دست می یابند. چنانچه در بررسی حامدی پپ مبنی بر تاثیر فعالیت‌های هوازی در تولید رادیکال‌های آزاد، گزارش گردید که مردان در اثر فعالیت‌های شدید هوازی، سطح بیشتری از رادیکال‌های آزاد را تجربه می کنند، به طوری که افزایش هورمون استرس مانند کورتیزول و اپی نفرین نیز علت این فرایند، گزارش شده است (۱۵).

همچنین بررسی های ملکولی تحقیق حاضر، نشان دهنده افزایش در بیان ژنی آنزیم SOD Cu/Zn در اثر تمرین شدید بدنی بود، لیکن این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار گزارش نشد. در این مورد افزایش رادیکال‌های آزاد از جمله  $H_2O_2$  و نیاز بدن به محافظت از بافت‌هایی مانند لنفوسیت‌ها را می توان احتمال وقوع چنین تغییرات، هر چند اندک در سطح بیان ژنی SOD Cu/Zn دانست، زیرا گزارش شده است که سطح این آنزیم، توسط اکسیدان‌ها به ویژه  $H_2O_2$ ، در یک فعالیت بدنی حاد تحت تاثیر قرار می گیرد. با این حال برخی تحقیقات یافته های مشابه و متناقضی را گزارش کرده اند. از آن جمله برخی گزارش نمودند که غلظت mRNA آنزیم SOD Cu/Zn متعاقب فعالیت‌های هوازی شدید در موش‌های آزمایشگاهی افزایش یافته است (۱۶). در حالی که عده ای دیگر گزارش نمودند، سطح بیان ژنی SOD Cu/Zn در بازیکنان حرفه ای فوتبال بعد از فعالیت نسبتاً شدید روی دستگاه نوار گردان افزایش معنی داری را نداشته است (۱۷). هر یک از تحقیقات دلایل مختلفی را برای یافته های خود گزارش کرده اند، که از آن جمله سطح آمادگی جسمانی افراد، مدت زمان اجرای فعالیت ورزشی و سازگاری دستگاه دفاعی بدن افراد ورزشکار نسبت به تولید رادیکال‌های آزاد در فعالیت های شدید بدنی از دلایل موثر مبنی بر عدم افزایش معنی دار یا غیر معنی دار در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی ذکر شده است. مطالعه دیگری نیز در بررسی بیان ژنی SOD Cu/Zn در ورزشکاران گزارش کرد، که در یک مرحله تمرین شدید بدنی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله SOD Cu/Zn در افراد ورزشکار در برابر افزایش رادیکال های آزاد افزایش می یابد و این در حالی است که هم



نمودار ۱- بیان ژن Cu/Zn SOD در سه مرحله از فعالیت



نمودار ۲- تغییرات TAS در سه مرحله از فعالیت

اندازه فعالیت از شدت فزاینده تری بهره مند باشد، تولید و رها سازی  $H_2O_2$  نیز افزایش بیشتری می یابد (۸). از طرفی دیگر یافته برخی از محققین نشان دهنده آن است که افراد ورزشکار نسبت به افراد کم تحرک افزایش اندکی را در غلظت  $H_2O_2$  در حین فعالیت بدنی تجربه می نمایند (۵). احتمالاً این مزیت ناشی از سازگاری دستگاه دفاعی بدن افراد ورزشکار برای مقابله با رادیکال‌های آزاد می باشد. با وجود این، افزایش سطوح پلاسمایی  $H_2O_2$  ممکن است تحت تاثیر نوع فعالیت بدنی، مدت زمان اجرای فعالیت بدنی و جنس آزمودنی نیز قرار گیرد (۱۵). چنانچه پیش تر نیز گفته شد، آزمودنی های تحقیق حاضر را مردان ورزشکار تشکیل می دهد. در این خصوص برخی از پژوهش‌ها نشان داده اند که مردان در اثر فعالیت‌های هوازی به تولید رادیکال‌های آزاد

می‌شود در تحقیقات بعدی اندازه‌گیری آن از سوی محققین مورد توجه قرار گیرد.

### منابع

1. Limaye PV. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 243: 147-152.
2. Fukai T. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Online European Society of Cardiology* 2010; 12: 1755-3245.
3. Ihara YÂ, Hayabara TÂ. Free radicals and superoxide dismutase in blood of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia 1997; 232:4532-4323.
4. Nevin Atalay G. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *Journal of Sports Science and Medicine* 2007;12:6417-422.
5. Valado A, Pereira L, Paula C. Tavares and Carlos Fontes Ribeiro. Effect of the intense anaerobic exercise on nitric oxide and malondialdehyde in studies of oxidative stress. *International journal of biology and biomedical engineer* 2007; 121: 78 2-4.
6. Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* 1999; 87: 2032-2036.
7. Dugan LL, Choi DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Annals of Neurology*. 1994; 35:17-21.
8. Sureda A, Ferrer M, Tauler P, et al. Lymphocyte antioxidant response and H2O2 production after a swimming session: Gender differences. *Free Radic Res* 2008; 42: 312-9.
9. Yano T, Yonoki T, Matsuura R. Excessive Oxygen Uptake during Exercise and Recovery in Heavy Exercise. *Physiol Res* 2007; 56: 721-725.
10. Chan PH. Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *J Neurotrauma* 1992; 2:417-423
11. Frutiger K. Gender difference in levels of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2008; 54:184-7.
12. Hitomi Y, Watanabe S, Kizaki T, Sakurai T, et al. Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta. *Redox Rep* 2008; 13:213-6.
13. Fisher G, Schwartz DD, Quindry JC, Barberio M D, Foster EB. Lymphocyte Enzymatic Antioxidant Responses to Oxidative Stress Following High-Intensity Interval Exercise. *J Appl Physiol* 2010;3: 730-737.

زمان با این فرایند، بیان ژنی این آنزیم تغییر معناداری پیدا نمی‌کند (۱۳). در یافته‌های ما نیز این موضوع مشاهده شد و سطح آنتی‌اکسیدان تام در اثر تمرین شدید در مرحله بهبودی، افزایش معنی داری را نشان داد. این احتمال وجود دارد که افراد ورزشکار در پاسخ به افزایش رادیکال‌های آزاد فعالیت آنزیم Cu/Zn SOD را افزایش می‌دهند، لذا افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان لزوماً به معنای افزایش در بیان ژنی آن‌ها نیست و به نوعی افراد ورزشکار در برابر شرایط استرس اکسیداتیو سازگاری پیدا کرده‌اند.

اما تعیین ارتباط بین بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD و نیز غلظت TAS از ارزش فراوانی برخوردار است. مشخص کردن اینکه، این ارتباط و پاسخ‌ها تا چه اندازه معنادار بوده و در چه حدی قرار دارند، برای بررسی‌های ایمونولوژیکی و فیزیولوژیکی از اهمیت فراوان برخوردار است. همان‌طور که قبلاً نیز بیان شد، بین بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD و سطح TAS در ارتباط با H2O2 رابطه منفی وجود دارد، به طوری که به ازای هر یک واحد افزایش H2O2، بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD، ۲/۶۲- واحد کاهش و به ازای هر واحد افزایش سطح H2O2، سطح TAS ۰/۰۱- واحد کاهش داشته است. از این تاثیر می‌توان نتیجه گرفت که در اثر تمرینات شدید در مردان ورزشکار، عوامل استرس اکسیداتیو باعث تضعیف دستگاه ایمنی از نظر بیان ژنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند، اما تضعیف فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در اثر H2O2 در مقایسه با بیانی ژنی Cu/Zn SOD، تاثیر کمتری را متحمل می‌شود.

در پایان با توجه به مطالب ذکر شده، می‌توان گفت که عوامل استرس اکسیداتیو در اثر تمرین شدید ورزشی منجر به تضعیف دستگاه ایمنی مردان ورزشکار می‌شود، اما این افراد به تهدیدات صورت گرفته از سوی شرایط استرس اکسیداتیو سازگاری پیدا کرده‌اند و در پاسخ به این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌دهند و لذا بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD افزایش معنی‌داری نمی‌یابد.

در تحقیق حاضر سطح هورمون‌های کورتیزول و اپی‌نفرین اندازه‌گیری نشده است که پیشنهاد

14. Tartibian B. Assessment of physiological index in sport. 1st ed. Tehran: Teymourzade Press; 2006. 39-41.
15. Hamdi P, Sukru Serdar B, Serkan Revan. Comparison of Oxidative Stress and Antioxidant Capacity Before and After Running Exercises in Both Sexes. *Gender Medicine* 2009; 6: 4-8.
16. Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, CuriR, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007; 128: 267-275.
17. Morikawa A, Inamizu T, Han Y, Nagata M. Effects of Exercise Training on Superoxide Dismutase Gene Expression in Human Lymphocytes. *International Journal of Sport and Health Science* 2004; 2: 187-194.



## Cu/Zn Superoxide Dismutase enzyme of lymphocytic cell gene expression, total antioxidant status and oxidative stress variation following to intensive exercise in young men athletes

\*Behrooz Baghaiee, MSc. Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Urmia University, Urmia, Iran.

(\*Corresponding author). behrouz\_phsport@yahoo.com

Bakhtiar Tartibian, PhD. Associate Professor of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Urmia University, Urmia, Iran. ba.tartibian@gmail.com

Mohammad Reza Aliparasty, MSc. Immunologist, Immunology Department, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. aliparasty@sums.ac.ir.

Behzad Baradaran, PhD. Assistant Professor of Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. behzad\_im@yahoo.com.

Shohreh Almasy, MSc. Immunologist, Immunology Department, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

### Abstract

**Background:** The aim of this research is investigation of Cu/Zn Superoxide Dismutase enzyme of lymphocytic cell gene expression, total antioxidant status and oxidative stress changes following intensive exercise in young men athletes.

**Methods:** This study was a semi-experimental research with a repeated measures design. 20 young men athletes (age range of 21-23 years) participated in this study after signing an informed consent form. Blood sample were collected in pre intensive exercise (grade: 5%, speed: 7/5 mile/h, time: 20 minutes) immediately and recovery (3 hours after exercise test), and Real time-polymerase chain reaction was used for evaluation of Cu/Zn SOD gene expression and autoanalyzer for other markers.

**Results:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level and mRNA of Cu/Zn SOD were both increased, immediately and 3 hours after of exercise ( $p=0/012$ ,  $p=0/014$ ), ( $2.95 \pm 0.84$  and  $3.37 \pm 0.99$ ) but this changes were not reported significant, but TAS levels are effectively raised only in recovery state ( $p=0/009$ ) ( $0.86 \pm 0.16$ ).

**Conclusions:** Intensive exercise increases oxidative stress markers and can weakens the immune system of men athletes, but they raise the activity of antioxidant enzymes in response to threat of free radicals, so Cu/Zn SOD gene expression does not significantly increased.

**Keywords:** Cu/Zn SOD mRNA, TAS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Men Athletes.