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

***بهروز بقایی**: کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.(*نویسنده مسئول) behrouz_phsport@yahoo.com
دکتر بختیار ترتیبیان: دانشیار و متخصص فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ba.tartibian@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 سلول های لنفوسیتی، تغییرات آنتی اکسیدان تام و شاخص های استرس اکسیداتیو تحت تاثیر تمرین شدید بدنی در مردان جوان ورزشکار می باشد.

روش کار: تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری متعدد می باشد که در آن ۲۰ مرد ورزشکار (۲۳-۲۱سال) 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: ۲۰دقیقه) و در حالت بهبودی (Recovery ۳ ساعت بعد از انجام تست تمرینی)، خون‌گیری ورید بازویی از آزمودنی ها به عمل آمد. برای اندازه‌گیریmRNA آنزیمCu/Zn SOD از روش Real time- Polymerase chain reaction و برای سایر شاخص ها از اتو آنالیزور استفاده شد.

یافته‌ها: سطح H_2O_2 بعد از تمرین شدید بدنی و۳ ساعت بعد از آن افزایش معنی داری یافت (p=۰/۰۱۲) و (p =۰/۰۱۴)(۳/۳۷±۰/۹۹ و ۰/۸۵ ±۳/۳۶). غلظتmRNA آنزیم Cu/Zn SOD نیز بعد از فعالیت شدید و۳ ساعت بعد آن، افزایش یافت, لیکن این تغییرات معنی دار گزارش نشد (۰/۸۶±۴/۰۷ و ۲/۳۷±۵/۰۳). سطح TAS نیز فقط در مرحله بهبودی افزایش معنی داری داشت (p=۰/۰۰۹) (۰/۱۶±۰/۸۶).

نتیجه‌گیری: تمرین شدید بدنی باعث افزایش سطح شاخص های استرس اکسیداتیو و تضعیف دستگاه ایمنی افراد ورزشکار مرد می شود، اما این افراد در پاسخ به تهدیدات صورت گرفته از سوی رادیکال های آزاد، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را افزایش می دهند و بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD افزایش معنی‌داری نمی یابد.

کلیدواژه‌ها: mRNA Cu/Zn SOD، آنتی اکسیدان تام، پراکسید هیدروژن، مردان ورزشکار.

مقدمه

استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن بین تولید رادیکال های آزاد، عوامل التهابی و سطح آنتی اکسیدان ها, بی نظمی به وجود می آید که می تواند منجر به افزایش سطح رادیکال‌های آزاد گردد (۱). از سوی دیگر رادیکال‌های آزاد, اتم ها یا مولکول‌هایی با تک الکترون منفرد هستند که به دلیل بی ثباتی شیمیایی تمایل زیادی به واکنش با الکترون مولکول های دیگر همانند DNA، لیپیدها وپروتئین ها دارند و منجر به آسیب هایی در ساختار و عملکرد آن ها و بافت‌ها می شوند(۲). مطالعات نشان می‌دهد که حضور بیش از حد اکسیژن در دسترس، منجر به افزایش این نوع از اکسیدان ها می شود و لذا در حین فعالیت های شدید بدنی که با افزایش اکسیژن مصرفی روبه رو هستیم، تولید آن ها به چندین برابر افزایش می‌یابد (۳ و۴). پراکسید هیدروژن (H2O2) نیز یکی از زیر شاخه های رادیکال های آزاد می‌باشد، که در ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو نقش مهمی را ایفا می کند (۵). معمولا غشا و DNA سلولی بیشترین نقاطی از سلول هستند که از طرف H2O2 دچار آسیب می گردند، زیرا ساختار غشای سلولی محتوی لیپید های غیر اشباع یا به عبارتی پیوندهای دوگانه است که این پیوند ها از سوی رادیکال های آزاد مورد هدف قرار گرفته و در نتیجه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

به سستی و گسست پیوند هیدروژنی منجر می‌شوند. با سست شدن پیوند بین مولکول های غشا، فعالیت سلول نیز دچار مشکلاتی می گردد (۶و۷)؛ لذا برخی از محققین معتقدند کـه افـزایش غلظـت H2O2در خون، وابسته به شدت ورزش می باشد و هـر انـدازه فعالیت از شدت بیشتری برخوردار باشد، تولید و رها سازی H2O2 نیز افزایش بیشتری می‌یابد (۸).

از این رو تمرین شدید بدنی نوعی فعالیت ورزشـی است که در آن سرعت و شـیب مسـافت بـا افـزایش زمان فعالیت، گسترش می یابد و با افزایش تـدریجی شدت فعالیت همراه مـی باشـد. شـدت فعالیـت نیـز نتیجه تحریک های عصبی است که ورزشکار هنگـام تمرین به کار می‌گیرد و با توجه بـه نیـاز بیشـتر بـه مصرف اکسـیژن در حـین ورزش هـای هـوازی و در نتیجه دریافت و انتقال و جـذب اکسـیژن از محـیط بیرونی به محیط درون بدن به منظور سوخت و سـاز مواد سه گانه غـذایی، افـزایش یافتـه و باعـث تولیـد استرس اکسیداتیوهای بیشتری می‌گـردد (۹). بـرای مقابله با شرایط استرس اکسیداتیو و التهابی، سیستم دفاعی بدن از آنتی اکسیدان ها بهره می گیرد. آنتـی اکسیدان‌ها نیز به دو صورت آنزیمـی و غیـر آنزیمـی وجـود دارنـد. آنـزیم‌هـای آنتـی اکسـیدان بـه انـواع مختلفـی تقسـیم مـی‌شـوند کـه Cu/Zn SOD از نخستین آنزیم هایی است که در برابر رادیکال هـای آزاد و کاستن اثرات آن ها از سـوی لنفوسـیت هـا و بافت های مختلف آزاد می شود (۱۰). Cu/Zn SOD از ژن‌های موجود در DNA هسته سـلول رونویسـی می شـود کـه در سیتوپلاسـم سـلولی حضـور فعـال داشـته و نقـش برجسـته ای نیـز در جلـوگیری از بسیاری از بیماری هـا بـر عهـده دارد. ناهنجـاری در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسـموتاز باعـث بـروز بسیاری از بیماری هـا ماننـد آلزایمـر، آسـیب هـای مفاصل، مشـکلات پروسـتات، آسـیب هـای مغـزی، بیماری های التهابی و التهاب شکم شده و همچنـین باعث تاخیر در بهبود زخم و سوختگی ها مـی شـود. ناهنجـــاری در ژن SOD باعـــث بـــروز بیمـــاری (Amyotrophic Lateral Sclerosis) ALS نیـــز می‌گردد. ALS بیماری است که در آن سـلول هـای عصبی به علت کمبود SOD در برابر رادیکـال هـای آزاد دچار آسیب می شوند (۱۱).

از سویی دیگر فعالیت های بدنی و سـطح آمـادگی افراد نیز بر بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD تاثیرگـذار هستند که بر حسب نوع فعالیت و یا سـطح آمـادگی جسمانی ممکن است، سـطح بیـان ژنـی ایـن آنـزیم متفاوت باشد و از این رو نتایج تحقیقات در این مورد با تناقضاتی همراه می باشد. چنانچهدر تحقیقـی کـه بر تاثیر فعالیت بدنی بر روی بیان ژنی سوپراکسـیداز دیسـموتاز در مـوش‌هـای آزمایشـگاهی انجـام شـد، افـزایش معنـی دار بیـان ژنـی آنـزیم سوپراکسـیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی را در سلول‌های عضـلانی در اثر فعالیت شدید ورزشی گزارش کـرده‌انـد (۱۲). بـا این حال مطالعـه دیگـری افـزایش معنـی‌داری را در mRNA آنزیم SOD در آزمودنی های مرد متعاقـب فعالیت شدید نشان نداد (۱۳). از این رو با توجـه بـه نتایج متناقض و این که تحقیقی در مورد ورزشکاران نژاد ایرانی مبنی بر بررسی بیان ژنـی آنـزیم Cu/Zn SOD در کنار شاخص‌های آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو یافت نشد، محققین پژوهش حاضر بـر آن شدند که بیان ژنی آنزیم های سوپراکسید دیسـموتاز سیتوپلاسـمی و تغییـرات آنتـی اکسـیدان تـام وهمچنین تغییرات شاخص های استرس اکسـیداتیو را در مردان جوان ورزشکار نژاد ایرانی مـورد بررسـی قرار دهند.

روش بررسی

آزمودنی‌ها: تحقیق حاضر از نـوع نیمـه تجربـی بـا اندازه‌گیری مکرر می باشد کـه جامعـه آمـاری آن را مردان ورزشکار تشکیل می دهـد. طـی فراخـوان بـه عمل آمده، ۵۰ نفر ورزشکار مرد جوان شـهر ارومیـه داوطلـب شـرکت در تحقیـق شـدند و پرسشـنامه تندرستی و رضایت نامه شرکت در تحقیق را تکمیل نمودند. ویژگی‌هـای فیزیولـوژیکی آنهـا شـامل قـد (سـانتیمتر)، وزن (کیلـوگرم)، درصـد چربـی (٪)، و ضربان قلب (ضربان در دقیقه) و... مورد بررسی قـرار گرفت. افراد با سابقه ابتلا به بیمـاری هـای مـزمن و افرادی که از نظر شاخص فیزیولوژیک فاقد معیارهای مورد نظر بـرای ورزشـکار بـودن شـناخته شـدند، از شرکت در تحقیق حذف گردیدند و از بین آن ها ۲۰ آزمـودنی بـا دامنـه سـنی ۲۱-۲۳ سـال در تحقیـق شرکت داده شدند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

در شرایط پایه و ناشتا، به منظور بررسی غلظت پایه شاخص های خونی مورد نظر به مقدار ۴سی‌سی خون وریدی جمع آوری شد. ۲ سی سی از این خود در لوله فالکون (Falcon tube) ۵۰ میلی محتوی ماده ضد انعقاد (Ethyelne diamine tetra acetic acid) EDTA 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، مجددا 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 و Ribonuclease Freeمنتقل 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 میکرولیترکلروفروم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه g 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 g۱۵۰۰۰ 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 Diethylpyrocarbonate –treated water افزوده شد و برای ادامه مراحل در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید.

ساخت cDNA: از کیت RevertAID TM Firs 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 10Xدر یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده وتوسط DEPC-traeted eater به حجم ۹ میکرولیتر ۹ میکرولیتررسید.

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

۳- به تیوب مربوطه ۱۱میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر Oligi (dt) Primerیا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر reaction buffer 5X و ۲ میکرولیتر Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) mix 10mM و ۱میکرولیتر 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 ^{TM} H Minus M-MuLV Reverse به تیوب از قبل افزوده شد.

Real-time PCR برای اندازه گیری میزان بیان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

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، ΔCt (Ct of target gene- Ct of β-actin gene) ژن در هر نمونه از افتراق Ct (Cycle Threshold)ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان مرجع محاسبه شد.

روش آزمایشگاهی اندازه‌گیری H_2O_2

اساس روش اندازه گیری H2O2 سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric Acid)(TBA))، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه‌گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری (Spectrophotometry) و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می باشد.

اندازه‌گیری H_2O_2 با حل کردن ۵۰۰ میکرو لیتر سرم در ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (شرکت مرک) ۱٪ آغاز می‌گردد. پس از ورتکس (Vortex) کردن به میزان ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪ (شرکت مرک) به لوله آزمایش اضافه شده و درادامه 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، 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 نمونه‌ها تعیین گردید.

روش آزمایشگاهی اندازه گیری آنتی اکسیدان تام (Total antioxidant status) TAS: اندازه‌گیری 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 O2 maximum=V02max) (این فرمول اختصاص به مردان دارد) (۱۴):

حداکثر اکسیژن مصرفی:

(تعداد ضربان قلب × ۰/۱۴۵۳) − (سرعت ساعت / مایل × ۴/۴۷) + (وزن (کیلوگرم) × ۰/۱۹۳) - (۷/۰۶۲ + ۵۴/۰۷)

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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 اندازه‌گیری‌های مکرر استفاده شد. از آزمون بونفرونی (Bonferoni) نیز برای تعقیب و مشخص نمودن محل وجود تفاوت‌ها 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 $p\leq ۰/۰۵$ انجام گرفت.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

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 شاخص های پلاسمایی و ژنی، مشخص شد که بعد از فعالیت، سطح H_2O_2 افزایش معنی داری را در مردان ورزشکار جوان داشت (۳/۳۷±۰/۹۹)($p\leq$۰/۰۵)، و ۳ ساعت بعد از تمرین شدید بدنی نیز سطح این شاخص خونی همچنان افزایش یافت که تفاوت آن با حالت پایه از نظر آماری معنی‌دار گزارش شد (۳/۳۶± ۰/۸۵) ($p\leq$۰/۰۱۴) (جدول ۳).

از سوی دیگر سطح mRNA آنزیم Cu/Zn SOD نیز بعد از تمرین شدید بدنی و ۳ ساعت بعد، تاحدی افزایش یافت، لیکن با بررسی های آماری مشخص گردید که این تغییرات معنادار نبوده است (۴/۰۷±۰/۸۶و ۲/۷ ۵/۰۳±) ($p\geq$۰/۹۹ و $p\geq$ ۰/۳۴۶) (نمودار ۱). همچنین بررسی نمونه های خونی نشان داد که سطح TAS بعد از فعالیت، در مردان ورزشکار با افزایش معنی‌داری همراه نبوده است ($p\geq$۰/۴۳۷) (۰/۸۲±۰/۱۲). با این حال در مرحله بهبودی این افزایش معنی‌دار گزارش شد ($p\leq$۰/۰۰۹) (۰/۸۶±۰/۱۶) (نمودار ۲). (لازم به ذکر تمام p value ها در مقایسه با حالت پایه به دست آمده‌اند).

جدول۱- ویژگی های فیزیولوژیکی مردان ورزشکار جوان

شاخص های فیزیولوژیکی	Mean± SD
قد	۱۷۷/۵۹± ۷/۰۲
وزن	۵۴/۷۰ ± ۶/۱
درصد چربی	۱۱/۱۶ ±۴/۷۳
VO2max	۵۵/۹۷ ±۱/۳۵
شاخص توده بدنی	۲۲/۵ ± ۱/۵

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 ۰/۰۱- واحد کاهش یافته است، لیکن هیچ کدام این ارتباط ها و تغییرات معنی داری گزارش نشد ($p\geq$۰/۰۵)(جدول۴).

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی های 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 می دهد، لذا افزایش در غلظت H_2O_2 را می‌توان در مصرف بالای اکسیژن توسط بافت ها 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- توالی های 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 β-actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATTGGCAAT-3'
H β-actin Reverse	5'-TCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

جدول ۳- تغییرات پراکسید هیدروژن در سه مرحله از فعالیت

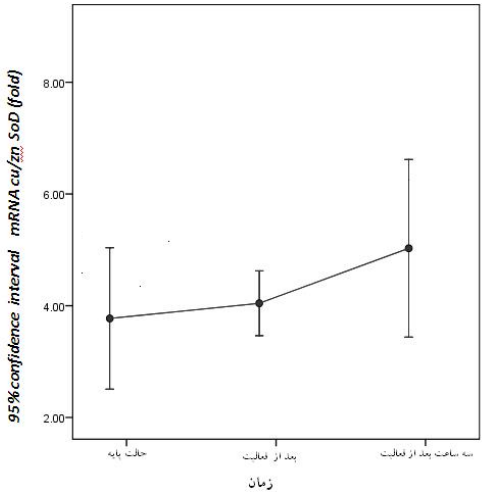
متغییر	Mean ± SD	سطح معنی داری
H_2O_2 (µm)	حالت پایه ۲/۹۵ ± ۰/۸۴	$p_1\leq$۰/۰۱۲
	بعد از فعالیت ۳/۳۷ ± ۰/۹۹	
	بهبودی ۳/۳۶ ± ۰/۸۵	$p_2\leq$۰/۰۱۴

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

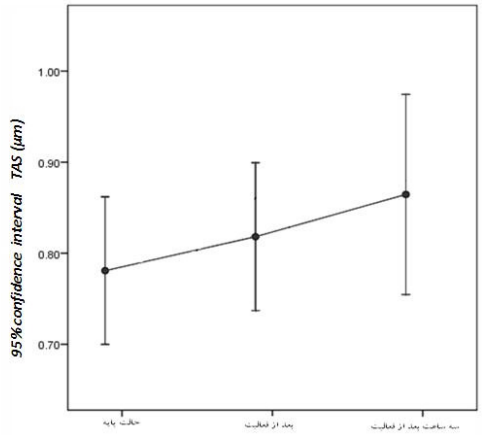
جدول ۴- ارتباط بین تغییرات TAS وبیان ژنی SOD با سطح H_2O_2 (بر اساس آزمون آماری رگرسیون خطی)

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]



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



نمودار۲- تغییرات TAS در سه مرحله از فعالیت

اندازه فعالیت از شدت فزاینده تری بهره منـد باشـد، تولید و رها سازی H_2O_2 نیز افزایش بیشتری می‌یابد (۸). از طرفی دیگر یافتـه برخـی از محققـین نشـان دهنده آن است که افراد ورزشکار نسبت به افراد کم تحرک افزایش انـدکی را در غلظـت H_2O_2 در حـین فعالیت بدنی تجربه می نمایند(۵). احتمالا این مزیت ناشی از سازگاری دستگاه دفاعی بدن افراد ورزشـکار برای مقابله با رادیکال‌های آزاد مـی باشـد. بـا وجـود این، افزایش سطوح پلاسـمایی H_2O_2 ممکـن اسـت تحت تاثیر نوع فعالیـت بـدنی، مـدت زمـان اجـرای فعالیت بدنی و جنس آزمودنی نیز قـرار گیـرد (۱۵). چنانچه پیش‌تر نیز گفته شد، آزمودنی های تحقیـق حاضر را مردان ورزشکار تشـکیل مـی‌دهـد. در ایـن خصوص برخی از پژوهش‌ها نشان داده اند که مردان در اثر فعالیت‌های هوازی به تولید رادیکال های آزاد بیشتری در مقایسه با زنان دست می یابند. چنانچـه در بررسی حامدی پپ مبنی بـر تـاثیر فعالیـت‌هـای هوازی در تولید رادیکال‌های آزاد، گزارش گردید کـه مـردان در اثـر فعالیـت‌هـای شـدید هـوازی، سـطح بیشتری از رادیکال هـای آزاد را تجربـه مـی کننـد، به‌طوری که افزایش هورمون استرس مانند کورتیزول و اپی نفرین نیز علت این فرایند، گزارش شده اسـت (۱۵).

همچنین بررسی های ملکولی تحقیق حاضر، نشان دهنده افزایش در بیان ژنـی آنـزیمCu/Zn SOD در اثر تمرین شدید بـدنی بـود، لـیکن ایـن تغییـرات از لحاظ آماری معنـی‌دار گـزارش نشـد. در ایـن مـورد افزایش رادیکال های آزاد از جمله H_2O_2 و نیاز بـدن به محافظت از بافت هایی مانند لنفوسیت هـا را مـی توان احتمال وقوع چنین تغییرات، هرچند انـدک در سطح بیان ژنی Cu/Zn SOD دانست، زیـرا گـزارش شده است که سطح این آنزیم، توسط اکسیدان ها به ویژه H2O2، در یک فعالیت بدنی حـاد تحـت تـاثیر قرار می گیرد. با این حال برخی تحقیقات یافته های مشابه و متناقضی را گزارش کـرده انـد. از آن جملـه برخـی گـزارش نمودنـد کـه غلظـت mRNA آنزیمCu/Zn SOD متعاقب فعالیت‌های هوازی شدید در موش‌های آزمایشگاهی افزایش یافته اسـت (۱۶). در حالی که عده ای دیگرگزارش نمودند، سطح بیان ژنی Cu/ZnSODدر بازیکنان حرفه ای فوتبال بعـد از فعالیـت نسـبتا شـدید روی دسـتگاه نـوار گـردان افزایش معنی داری را نداشته است (۱۷). هر یـک از تحقیقات دلایل مختلفی را بـرای یافتـه هـای خـود گزارش کرده انـد، کـه از آن جملـه سـطح آمـادگی جسمانی افراد، مدت زمان اجرای فعالیـت ورزشـی و سازگاری دستگاه دفاعی بدن افراد ورزشکار نسبت به تولید رادیکال‌های آزاد در فعالیت های شدید بدنی از دلایل موثر مبنی بر عدم افزایش معنـی دار یـا غیـر معنی دار در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسـموتاز سیتوپلاسمی ذکر شده است. مطالعه دیگری نیـز در بررسـی بیـان ژنـی Cu/Zn SOD در ورزشـکاران گزارش کرد، که در یک مرحله تمرین شـدید بـدنی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسـیدان از جملـه Cu/Zn SOD در افراد ورزشکار در برابر افزایش رادیکال های آزاد افزایش می یابد و این در حـالی اسـت کـه هـم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

زمان با این فرایند، بیان ژنی این آنزیم تغییر معناداری پیدا نمی‌کند (۱۳). در یافته های ما نیز این موضوع مشاهده شد و سطح آنتی اکسیدان 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 رادیکال های آزاد فعالیت آنزیم Cu/Zn SOD را افزایش می دهند، لذا افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان لزوما به معنای افزایش در بیان ژنی آن‌ها نیست و به نوعی افراد ورزشکار در برابر شرایط استرس اکسیداتیو سازگاری پیدا کرده اند.

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 پاسخ ها تا چه اندازه معنادار بوده و در چه حدی قرار دارند، برای بررسی های ایمونولوژیکی و فیزیولوژیکی از اهمیت فراوان برخوردار است. همان طور که قبلا نیز بیان شد، بین بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SODو 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 سطحH_2O_2، 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 آنزیم های آنتی اکسیدان می شوند، اما تضعیف فعالیت آنتی اکسیدان ها در اثر H_2O_2 در مقایسه با بیانی ژنی Cu/Zn SOD، تاثیر کمتری را متحمل می شود.

در پایان با توجه به مطالب ذکر شده، می توان گفت که عوامل استرس اکسیداتیو در اثر تمرین شدید ورزشی منجر به تضعیف دستگاه ایمنی مردان ورزشکار می شود، اما این افراد به تهدیدات صورت گرفته از سوی شرایط استرس اکسیداتیو سازگاری پیدا کرده اند و در پاسخ به این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش می دهند و لذا بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD افزایش معنی داری نمی‌یابد.

در تحقیق حاضر سطح هورمون های کورتیزول و اپی نفرین اندازه گیری نشده است که پیشنهاد 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 streptozotocininduced 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]

Original Article

Cu/Zn Superoxide Dismutaseenzyme of lymphocytic cell gene expression, total antioxidant status and oxidative stress variation fallowing 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: H2O2 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 ± 0.84 and 3.37 ± 0.99) but this changes were not reported significant, but TAS levels areeffectively ,raised only in recovery state (p=0/009) (0.86 ± 0.16).
Conclusions: Intensive exercise increases oxidative stress markers and can weakens the immune system of men athletes, but they raisethe 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, H2O2, Men Athletes.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-10]