اثر اکسیدان ها بر بیان ژن آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی در مردان و زنان فعال: تحت تاثیر فعالیت های شدید ورزشی

دکتر بختیار ترتیبیان: دانشیار و متخصص فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
ba.tartibian@gmail.com
***بهروز بقایی:** کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول).
behrouz_phsport@yahoo.com
بهزاد برادران: استادیار و متخصص ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. behzad_im@yahoo.com

تاریخ دریافت۹۲/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۴

چکیده

زمینه و هدف: همزمان با فعالیت هوازی حجمی از اکسیدان ها تولید می گردد که سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار می دهد، با این حال این میزان تاثیرات بر اساس جنسیت و فعال بودن متفاوت خواهد بود، لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی (Mn SOD) (Mn Superoxide Dismutase) و اثرات شاخص های اکسیدانی و التهابی در بیان ژنی آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی در مردان و زنان فعال می باشد.

روش کار: تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری‌های متعدد می‌باشد که در آن ۲۴ مرد (۱۲) و زن (۱۲) فعال (۲۴-۲۲ سال) به‌صورت داوطلبانه و پس از تکمیل فرم رضایت نامه شرکت کردند. سپس از آزمودنی‌ها در سه مرحله قبل و پس از انجام تست ورزشی (Graded exercise test-GXT) و ۳ ساعت بعد آن (ریکاوری) خون‌گیری ورید بازویی به عمل آمد و برای اندازه‌گیری mRNA Mn SOD از کیت SYBER Green PCR Master mix reagent و روش Real time-PCR و برای اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید (Malondialdehyde – MDA) و لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase) (LDH) از Eutoanalyzer استفاده گردید.

یافته‌ها: در مردان mRNA آنزیم Mn SOD افزایش معنی داری نیافت (p≥۰/۰۵)، لیکن در زنان در مرحله ریکاوری بیان ژنی این آنزیم افزایش معنی‌داری یافت (p= ۰/۰۰۶). فعالیت MDA در مردان در مرحله ریکاوری و بلافاصله بعد از فعالیت ورزشی بیشتر از حالت پایه بود (به ترتیب p=۰/۰۱۲ و p=۰/۰۱۴)، لیکن در زنان فقط در مرحله ریکاوری معنی دار گزارش شد (p=۰/۰۰۲). سطح LDH نیز فقط در گروه زنان و بلافاصله بعد از فعالیت و در مرحله ریکاوری افزایش معنی داری داشته است (p=۰/۰۰۹ و p= ۰/۰۲۶) . همچنین فقط ارتباط بین تغییرات غلظت MDA و بیان ژنی Mn SOD در مردان معنی دار گزارش شد (p= ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: از نتایج تحقیق حاضر می توان دریافت که اکسیدان ها موثر ترین عامل در تضعیف بیان ژنی Mn SOD در افراد فعال در حین فعالیت‌های هوازی شدید هستند.

کلید واژه ها: مالون دی آلدئید، لاکتات دهیدروژناز، سوپراکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی

مقدمه

فعالیت های ورزشی با تحریک فعالیت آنزیم‌ها و هورمون های مختلف، به نحوی هموستئاز و حالت پایدار بدن را تغییر داده و منجر به ایجاد سطح جدیدی از این پاسخ ها برای سازگاری بهتر با فعالیت های ورزشی می شود (۱). برخی از این تغییرات منجر به اثرات مثبت در سلول ها شده و شرایط را برای هرچه بهتر انجام دادن فعالیت ورزشی از جمله تامین نیازمندی های انرژی از طریق افزایش فعالیت آنزیم ها و هورمون های مختلف مهیا می کنند، اما در کنار این تاثیرات مثبت، عواملی نیز تاثیرات منفی بر فعالیت‌های سلول ها دارند.

نتایج گزارش های تحقیقی موید آن است فعالیت ورزشی که بیش از چند دقیقه ادامه یابد برای تداوم خود، به فراهم آوری اکسیژن نیاز فراوانی پیدا می کند (۲). با این حال در دسترس بودن اکسیژن و یا نبود آن در برخی موارد باعث ایجاد آسیب های سلولی شده و بر فعالیت یا مکانیسم مولکولی آنزیم های مختلف اثر مهمی می‌گذارد. برخی از مطالعات پیشین نشان می دهد که زنجیره انتقال الکترونی در میتوکندری محل اصلی تولید انرژی ATP در شرایط حضور اکسیژن می باشد (۳) و لذا میتوکندری به عنوان جایگاه

تولید انرژی نقش موثری در انجام این نوع از فعالیت به عهده دارد، و بیشتر اکسیژن مصرفی نیز در این محل مورد استفاده قرار می گیرد. اما مطالعات دیگری نیز نشان می دهند که در شرایطی که حضور اکسیژن در میتوکندری ها افزایش یابد، افزایش در تولید رادیکال های آزاد نیز محتمل خواهد بود (۴).

رادیکال های آزاد یا به عبارتی اکسیدان ها مولکول هایی با قابلیت تولید در تمامی سلول های زنده هستند که جایگاه اصلی تولید آن ها میتوکندری ها می باشند که از جمله آن ها می توان به ROS، O2 و MDA و .. اشاره داشت(۵و۶). مالون دی آلدئید یا MDA (Malondialdehyde) به عنوان یک رادیکال آزاد، شکل تغییر یافته پراکسید هیدروژن (H2O2) است که در ایجاد آسیب‌های بافتی نقش موثری را ایفا می نماید (۷). اکسیدان ها به علت فقدان یک الکترون در ساختار خود و در نتیجه بی ثباتی شیمیایی، تمایل فراوان به واکنش و تصاحب الکترون سایر ملکول ها را دارند و لذا منجر به آسیب در سایر سلول ها می شوند. از طرفی عدم فراهم آوری کافی اکسیژن نیز منجر به تولید انرژی بی هوازی و در نتیجه افزایش آنزیم هایی همانند لاکتات دهیدروژناز (lactate dehydrogenase) (LDH) می شود، که در این شرایط به علت تولید لاکتات، سلول ها بازهم در معرض صدمات مختلف قرار می گیرند، و از این رو حضور لاکتات دهیدروژناز در سرم را به عنوان شاخصی از شدت آسیب های به وجود آمده در سلول ها در نظر می گیرند (۸).

با این حال سلول ها و بافت ها در برابر این عوامل آسیب رسان از روش های موثری برای کاستن شدت آسیب ها استفاده می نمایند، که از آن جمله تولید آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی (Mn superoxide dismutase) است. Mn SOD از کدهای ژنتیکی ژن موجود در میتوکندری رونویسی شده و میتوکندری ها را از طریق چندین روش محافظت می نماید، از جمله جلوگیری از شکل گیری اولیه رادیکال های آزاد و یا کاهش فعالیت آنها (۹).

با این حال اندازه تولید شاخص های آنتی اکسیدانی و نحوه مقابله دستگاه دفاعی بدن با این شاخص ها از فردی به فردی دیگر متفاوت بوده و عواملی همچون سطح آمادگی جسمانی و جنست و ... بر این روند موثر هستند. چنانچه برخی از مطالعات نشان می دهد که زنجیره انتقال الکترونی در مردان رادیکال های آزاد بیشتری را تولید می نماید و در نتیجه شدت آسیب ها در آن ها بیشتر است (۱۰ و ۱۱). برخی از مطالعات نیز موید آن هستند که برخورداری از سطح آمادگی بدنی مناسب، منجر به کاهش تولید رادیکال های آزاد و فعالیت بهتر آنزیم های آنتی اکسیدان منجر می‌گردد (۱۲). با این حال تغییرات کمّی بیان ژنی آنزیم Mn SOD در آزمودنی ها انسان و به خصوص افراد فعال در پاسخ به فعالیت های هوازی به وضوح مشخص نیست و اثر جنسیت نیز بر آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی اندازه تاثیر شاخص های اکسیدانی و التهابی نیز در بیان ژنی Mn SOD به لحاظ کمّی به روشنی مشخص نشده و به طور قطع نیز مشخص نیست که آیا آنزیم های التهابی همانند LDH نیز در بیان ژنی Mn SOD موثر هستند یا خیر؟ لذا هدف محققین در این مقاله بررسی بیان ژنی آنزیم SOD Mn در مردان و زنان فعال، و اثرات شاخص های اکسیدانی و التهابی در بیان ژنی این آنزیم می باشد.

روش کار

پژوهش حاضر نیمه تجربی با اندازه گیری های مکرر بوده و مردان و زنان ۲۳-۲۱ سال فعال شهر ارومیه در سال۱۳۸۹ جامعه آماری آن را تشکیل می دهد. طی فراخوان به عمل آمده ۳۰ نفر مرد و زن جوان فعال شهر ارومیه داوطلب شرکت در تحقیق شدند و پرسش نامه تندرستی و رضایت نامه شرکت در تحقیق را تکمل نمودند. ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن ها شامل قد (سانتی متر)، وزن (کیلوگرم)، درصد چربی ، و ضربان قلب (ضربان در دقیقه) و شاخص توده بدنی (Body Mass Index-BMI) 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

فعال بودن و زنان در مرحله قائدگی، از شرکت در تحقیق حذف گردیدند؛ از بین آن ها ۲۴ آزمودنی مرد (۱۲) و زن (۱۲) جوان فعال در تحقیق شرکت داده شدند.

در شرایط پایه و ناشتا به منظور بررسی غلظت پایه شاخص های ژنی و خونی مورد نظر به مقدار ۴ سی سی خون وریدی جمع آوری شد. دو سی سی از این خون در لوله فالکون ۵۰ml RNase Free & DNase Free (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) محتوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته و ۲ سی سی دیگر در لوله فالکون ۱۵ ml قرار داده شد. لوله فالکون های محتوی خون در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شده و در عرض دو ساعت به آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال یافتند.

آزمون ورزشی به این صورت اجرا شد که آزمودنی‌ها ابتدا به مدت سه دقیقه روی حداقل شیب دستگاه نوار گردان (NordicTrack, USA) 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 آزمودنی ها ۲۰ دقیقه فعالیت مورد نظر را انجام دادند. پس از اتمام فعالیت و ۳ ساعت بعد از آن، مجدداً به مقدار ۴ سی سی خونگیری سوم به عمل آمد.

نحوه محاسبه Volume Oxygen (V02max) Maximum به صورت ذیل بود (۱۳):

برای جداسازی RNAی 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 می شود و با استفاده از کلرید آمونیوم RBC های آن لیز شده، و به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی گراد و ۶۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی آسپیر شده ، سلول ها با یک میلی لیتر PBS سرد شستشو داده شدند. سپس به تیوب های ۱/۵ میلی لیتری DNase Free و RNase Free منتقل شدند. در مرحله بعد یک میلی لیتر محلول RNXTM-PLUS به ازایه ۱۰۶ ×۶ سلول به میکروتیوب افزوده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفروم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی گراد و ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید.

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

به هر میکروتیوب ۲۰ میکرو لیتر DEPC-treated eater افزوده شده و برای ادامه مراحل در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

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

۱ میکرو لیتر RNA و ۱ میکرو لیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده وتوسط (Cinna gen, Iran) DEPC-treated water به حجم ۹ میکرو لیتر رسید.

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

(این فرمول اختصاص به مردان دارد) **حداکثر اکسیژن مصرفی**:

(ضربان قلب×۰/۱۴۵۳) - (سرعت به ساعت/ مایل × ۴/۴۷)+ (وزن kg× ۰/۱۹۳)- ۵۴/۰۷

(این فرمول به زنان اختصاص دارد) **حداکثر اکسیژن مصرفی**:

(ضربان قلب × ۰/۱۴۵۳) – (سرعت به ساعت / مایل × ۴/۴۷) + (وزن kg× ۰/۱۹۳) – ۵۴/۰۷

گراد قرار گرفت.

به تیوب مربوطه ۱۱ میکرو لیتر DEPC-treated water و ۱ میکرو لیتر oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer (Fermentas, Canada) افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد بر روی Dry block انکوبه گردید.

۴ میکرو لیتر reaction buffer 5X و ۲ میکرو لیتر dNTP 10mM mix و ۱ میکرو لیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor (Fermentas, Canada) به تیوب افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

۱ میکرو لیتر آنزیم RverertAid TM H Minus M-MuLV Reverse (Fermentas, Canada) به تیوب قبل افزوده شد.

برای اندازه گیری میزان بیان ژنی Mn SOD از دستگاه مربوطه Corbett- Rotor gene -6000 (Corbett, Australia) استفاده شد. جفت پرایمر های 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 ۸۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفتند.

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. در جدول ۱ توالی پرایمرهای بیان ژنی Mn SOD در پاسخ به فعالیت شدید مشخص گردیده است.

به عنوان بلانک 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 تایید شود.

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

اساس روش اندازه گیری MDA سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid-TBA) ، استخراج با بوتانل (Pars azmoon, Iran) نرمال، اندازه گیری جذب با استفاده از ئوتوآنالیزور (Roche, Germany) COBAS-MIRA plus و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می باشد.

اندازه گیری MDA با حل کردن ۵۰۰ میکرو لیتر سرم در ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (Merck, Germany) ۱٪ آغاز می گردد. پس از ورتکس کردن به میزان ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ ٪ (Merck, Germany) به لوله آزمایش اضافه شده و پس از ورتکس کامل 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 دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ نموده 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 غلظت H_2O_2 سرمی نمونه ها حاصل پس از انتقال به منحنی استاندارد (۱ و ۱ و ۳ و ۳ تترامتوکسی پروپان (C7H16O4)) 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

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در بیان ژنی Mn SOD

H Mn SOD Forward	5'-GAGAAGTACCAGGAGGCGTTG-3
H Mn SOD Reverse	5'-CAAGCCAACCCCAACCTGAGC-3'
H β-actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATTGGCAAT-3'
H β-actin Reverse	5'-TCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت ، غلظت H_2O_2 سرمی نمونه ها تعیین گردید.

اندازه گیری سطح آنزیم LDH از ائوتوآنالیزور COBAS-MIRA plus (Roche, Germany) انجام گرفت.

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 آنالیز واریانس اندازه گیرهای مکرر استفاده شد. از آزمون بونفرونی نیز برای تعقیب و مشخص نمودن محل وجود تفاوت ها استفاده گردید. در این پژوهش، ارتباط شاخص ها توسط Linear Regression مشخص گردید. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵≤ انجام گرفت.

یافته‌ها

جدول ۲ شاخص های فیزیولوژیک در را مردان و زنان فعال مشخص کرده است. بررسی های آماری تحقیق حاضر نشان داد که سطح mRNA آنزیم Mn SOD در مردان فعال در اثر فعالیت شدید ورزشی افزایش یافت و این افزایش در مرحله ریکاوری نیز مشاهده گردید، با این حال هیچ یک این تغییرات معنی دار گزارش نشد (p=۰/۹۹) (نمودار ۱). علاوه بر این آزمون آماری آنالیز واریانس اندازه گیرهای مکرر و آزمون تعقیبی بونفرونی مشخص کرد که غلظت MDA بلافاصله بعد از فعالیت افزایش معنی داری داشته است (p=۰/۰۱۲)، اما در مرحله ریکاوری با وجود اندکی کاهش در سطح آن، همچنان بیشتر از حالت پایه بوده و تفاوت آن معنی دار گزارش گردید (p=۰/۰۱۴) (جدول ۳). غلظت آنزیم LDH نیز بلافاصله بعد از فعالیت افزایش یافت (p=۰/۹۹)، لیکن در مرحله ریکاوری کاهش یافت و تفاوت آن با قبل از فعالیت معنی دار گزارش نشد (p=۰/۹۹) (جدول ۳).

همچنین بررسی های آماری در گروه زنان فعال نشان داد که Mn mRNA بلافاصله بعد از فعالیت

جدول ۲- ویژگی های فیزیولوژیکی مردان فعال

شاخص های فیزیولوژیک	Mean± SD	
	زنان	مردان
سن (سال)	۲۳ ±۱	۲۳±۱
قد(سانتی متر)	۱۶۰/۸ ± ۴/۳۴	۱۷۷/۵۹±۷/۰۲
وزن(کیلوگرم)	۵۳/۱ ± ۵/۸۷	۷۰/۵۴±۶/۱
VO2 max(ml/kg/min)	۵۲/۶ ±۱/۸۳	۵۵/۹۷±۱/۳۵
BMI (kg/m^2)	۲۰/۵۱ ± ۱/۶۱	۲۲/۵±۱/۵

افزایش معنی داری نداشته است (p= ۰/۴۲۱)، با این حال در مرحله ریکاوری بیان ژنی این آنزیم افزایش معنی داری یافت (p= ۰/۰۰۶) (نمودار ۱). سطح LDH نیز بلافاصله بعد از فعالیت فزاینده در زنان فعال افزایش معنی داری داشته است (p=۰/۰۰۹) که در مرحله ریکاوری با وجود اندکی کاهش، اما همچنان در مقایسه با حالت پایه تفاوت آن معنی داری گزارش شد (p= ۰/۰۲۶) (جدول ۳). با این حال غلظت در زنان MDA بلافاصله بعد از فعالیت با افزایش معنی داری همراه نبود (p=۰/۲۵۵)، لیکن ۳ ساعت بعد از تمرین شدت فزآینده سطح این شاخص خونی افزایش معنی‌داری یافت (p=۰/۰۲۹) (جدول ۳).

علاوه بر این مدل رگرسیون خطی نیز نشان داد که بین تغییرات سطوح Mn SOD و MDA در مردان ارتباط معنی داری وجود دارد (p= ۰/۰۰۱)، به طوری که به ازای هر یک واحد افزایش در سطح مالون دی آلدئید، بیان ژنی Mn SOD ۳/۶۹- واحد کاهش می یابد (جدول ۴). با این حال ارتباط بین تغییرات سطوح mRNA Mn SOD و تغییرات LDH معنی دار گزارش نشد (p=۰/۸۵۲) و به ازای هریک واحد افزایش در سطح LDH، mRNA آنزیم Mn SOD هیچ تغییری نیافت (جدول ۴). با این حال بین تغییرات Mn SOD بـMDA و LDH در زنان ورزشکار ارتباط معنی داری وجود نداشت (به ترتیب: p= ۰/۸۳۶ و p =۰/۱۶۰)، و به ازای یک واحد افزایش در سطح MDA زنان، بیان ژنی Mn SOD ۰/۱۴- واحد کاهش یافت. با این حال به ازای هر یک واحد افزایش در سطح LDH، Mn SOD mRNA تغییری نیافت.

جدول ۳- تغییرات MDA و LDH در مراحل مختلف فعالیت در مردان و زنان فعال (مقایسه بعد از فعالیت با حالت پایه = و مقایسه ریکاوری با حالت پایه =)

متغیر		مردان		زنان		
		Mean ± SD		Mean ± SD	p (مقایسه مرحله فعالیت با حالت پایه)	p بین گروهی (مقایسه مردان با زنان)
MDA (µm)	حالت پایه	۲/۹۵ ± ۰/۸۴		۲/۵ ± ۱/۲۴	---	۰/۵۱۲
	بعد از فعالیت	۳/۳۷ ± ۰/۹۹	۰/۰۱۲=	۲/۸۴ ± ۱/۳۸	۰/۲۵۵=	۰/۳۴۹
	ریکاوری	۳/۳۶ ± ۰/۸۵	۰/۰۱۴=	۳/۰۴ ± ۱/۱۶	۰/۰۲۹=	۰/۶۰۵
LDH (µm)	حالت پایه	۸۰± ۳۳۵		۵۷۳ ± ۱۱۵	---	۰/۰۰۱
	بعد از فعالیت	۹۸ ±۳۷۱	۰/۹۹=	۸۹۱ ± ۲۱۳	۰/۰۰۹=	۰/۰۰۱
	ریکاوری	۱۴۹ ± ۳۶۳	۰/۹۹=	۸۴۷ ± ۲۷۷	۰/۰۲۶=	۰/۰۰۱

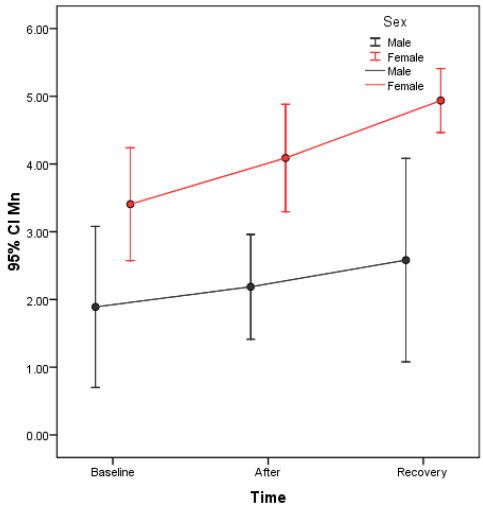
بحث و نتیجه گیری

برخی از بررسی های تحقیقی بر این نکته تاکید دارد که مردان فعال و ورزشکار از فعالیت بیشتری از زنجیره انتقال الکترونی و نیز آنزیم Xanthine oxide در مقایسه با زنان برخوردار هستند (۱۰)، که منجر به تولید رادیکال های آزاد بیشتری در آنان می شود و لذا این دو قسمت از سلول نقش موثری در مصرف اکسیژن و تولید MDA به عهده دارند. در تحقیق حاضر سطح MDA در مردان و زنان فعال در اثر فعالیت شدید افزایش معنی داری داشت، لیکن مردان از سطح بیشتری از MDA برخوردار بودند که در این مورد نقش دستگاه قلبی و تنفسی نیز مهم به نظر می‌رسید. از آنجایی که مردان ورزشکار از دستگاه قلبی و تنفسی کار آمدتری برخوردار هستند و چگالی مویرگی و میتوکندری این گروه از افراد نیز توسعه زیادی یافته است (۱۴)، لذا میزان فراهم آوری O2 و نیز مدت زمان حضور آن در بافت ها بسیار زیاد می باشد (۱۵ و ۱۶)، لذا افزایش بیشتر رادیکال های آزاد در مردان دور از انتظار نخواهد بود.

از طرفی سایر بررسی های نیز نشان می دهد که هورمون های مختلف از جمله کورتیزول، اپی نفرین، نورا اپی نفرین و استروژن نیز در روند تولید این شاخص های اکسیدانی اثر مهمی دارند (۱۷و۱۸) و با توجه به برخورداری مردان از سطوح بالای کورتیزول و اپی نفرین، افراد این جنس در معرض تولید بیشتری از عوامل اکسیدانی قرار دارند (۱۹). این احتمال وجود دارد که هورمون کورتیزول از طریق اتصال به گیرنده های سلولی منجر به فعال کردن بیان ژنی MDA می شود. علاوه بر این گزارش های تحقیقی موید آن است هورمون استروژن زنانه از طریق جلوگیری از تولید رادیکال های آزاد در زنان مانع از افزایش عوامل آسیب رسان به سلول ها می شود (۲۰).

جدول ۴- ارتباط بین فعالیت MDA و LDH با بیان ژنی Mn SOD در مردان و زنان فعال

پاسخ	متغیر	B (فاصله اطمینان ۹۵٪)
		مردان
Mn SOD	MDA	۰/۰۰۱ (۱/۸- به ۵/۵۷-) ۳/۶۹-
	LDH	۰/۸۵۲ (۰/۰۱- به ۰/۰۱) ۰
		زنان
	MDA	۰/۸۳۶ (۱/۲۳ به ۱/۵-) ۰/۱۴-
	LDH	۰/۱۶۰ (۰ به ۰) ۰



نمودار۱- تغییرات بیان ژنی Mn SOD مردان و زنان در سه مرحله از فعالیت شدید ورزشی

علاوه بر این بررسی های آماری تحقیق حاضر نشان داد که سطح لاکتات دهیدروژناز در مردان در اثر فعالیت شدید افزایش اندکی یافته است، لیکن این تغییران در زنان چشمگیر بود. در توجیه این فرآیند می توان به سوگیری فعالیت به سمت تولید انرژی بی هوازی در لحاظ آخر فعالیت اشاره داشت، به طوری که در لحظات پایانی، فعالیت به سمت بی هوازی تمایل پیدا کرده و منجر به افزایش این آنزیم شده است که این روند در زنان بیشتر بوده است.

با این حال تحقیقات گذشته اندازه ارتباط تغییرات این شاخص ها را با بیان ژنی آنزیم های آنتی اکسیدان به خصوص Mn SOD به لحاظ کمی گزارش نکرده اند. اما نتایج تحقیق حاضر مشخص ساخت که افزایش سطح MDA منجر به ۳/۶۹- واحد در کاهش بیان ژنی Mn SOD در مردان و ۰/۱۴- واحد کاهش در زنان می شود)، که از لحاظ ایمونولوژیکی مهم به نظر می رسد، زیرا هر اندازه پاسخ دستگاه ایمنی تضعیف شود، صدمات ناشی از آن نیز بیشتر خواهد بود. با این حال مشخص شد که LDH در بیان ژنی Mn SOD در مردان و زنان ورزشکار هیچ تاثیری نداشت و می توان به این نکته اشاره داشت که به دلیل برخورداری افراد ورزشکار از VO2max نسبتا مناسب، و تولید اندک لاکتات دهیدروژناز در فعالیت های هوازی، لذا این آنزیم در بیان ژنی Mn SOD نقش موثری را ایفا نمی نمایند. البته ذکر این نکته حائز اهمیت خواهد که نتایج حاضر مربوط به افراد فعال می باشد، اما افراد غیر ورزشکار و کم تحرک به دلیل آمادگی جسمانی پایین، دارای سطح LDH وMDA بیشتری در مقایسه با افراد تمرین کرده هم در حالت پایه و هم در حین فعالیت هوازی شدید هستند. لذا این انتظار وجود دارد که در کنار افزایش بیش از حد این شاخص ها در افراد غیر ورزشکار، بیان ژنی Mn SOD نیز دستخوش تغییرات متفاوت با افراد ورزشکار قرار گیرد.

با در نظر گرفتن این اطلاعات و برسی های سایر محققین باید چندین عامل را در عدم معنی دار بودن تغییرات بیان ژنی Mn SOD در مردان فعال نظر گرفت؛ لیکن آنچه که مهم و موثر به نظر می رسد که در تحقیقات قبلی تا این اندازه روشن بیان نشده بود، و آن اینکه افزایش شاخص های اکسیدانی منجر به تضعیف بیان ژنی Mn SOD در حین فعالیت ورزشی می‌شود، و در نهایت دومین عامل را باید به هورمون کورتیزول نسبت داد. با توجه به افزایش چندین برابری تولید کورتیزول در فعالیت های هوازی، محققین به این نتیجه رسیده‌اند که این هورمون قابلیت تضعیف دستگاه ایمنی را داشته و در نتیجه این احتمال وجود دارد که این هورمون از طریق کاهش فعالیت لنفوسیت‌ها و احتمالاً کاهش بیان ژنی آنزیم های آنتی‌اکسیدان منجر به تضعیف دستگاه ایمنی شود (۲۱). از طرفی دیگر در معنی دار بودن افزایش بیان ژنی Mn SOD در زنان می توان استروژن را موثر دانست. چنانچه گزارش شده است سلول های دستگاه ایمنی از جمله لنفوسیت ها و دیگر سلول های زنان دارای گیرنده های هورمون استروژن هستند. این گیرنده ها به زیر رده ERa و ERb تقسیم می شود که در سلول های دستگاه ایمنی گیرنده ERb غالب تر بوده و فعالیت لنفوسیت ها و آنزیم های آنتی اکسیدان را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۲). از این رو برخی از نیز معتقدند که بیان ژنی آنزیم های آنتی اکسیدان در عضلات از آن جمله Mn SOD تحت تاثیر گیرنده های Era قرار می گیرد. این محققین در بررسی های خود گزارش کردند که استروژن علاوه بر نقش موثر خود در افزایش بیان ژن گیرنده های Era، ارتباط مستقیمی نیز با بیان ژنی آنزیم های آنتی اکسیدان دارد، به طوری که هورمون استروژن از طریق افزایش بیان ژنی این گیرنده، باعث افزایش بیان ژنی آنزیم های آنتی اکسیدان در عضلات نیز می شود (۲۳). چنانچه در مقایسه سطح mRNA آنزیم Mn SOD در بین دو گروه زن و مرد می توان به اثر هورمون استرژن پی برد، بطوری که در تمامی مراحل تحقیق زنان از سطح بیشتری از بیان ژنی سوپر اکسیداز دیسموتاز میتوکندریایی در مقایسه با مردان برخوردار بودند.

در نهایت از نتایج پژوهش حاضر می توان دریافت که در افراد فعال، اکسیدان ها موثر ترین

عامل در تضعیف بیان ژنی Mn SOD در حین فعالیت های هوازی شدید هستند، و عوامل التهابی هیچ تاثیری در مکانیسم ملکولی Mn SOD ندارند.

در مقاله حاضر فعالیت آنزیم Mn SOD و سطح کورتیزول و استروژن اندازه گیری نشده است، که پیشنهاد می گردد درتحقیقات بعدی مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه شماره ۵۴۹-۲ الف دانشگاه ارومیه می‌باشد. در پایان نویسندگان مقاله مراتب سپاسگذاری خود را از افراد شرکت کننده در این پژوهش اعلام می دارند.

منابع

1. Bronikowski A, Morgan T, Garland T, Carter P. Antioxidant gene expression in active and sedentary house mice (Mus domesticus) selected for high voluntary wheel-running behavior. J GSA.2002; 161:1763–9.

2. Borsheim E, Bahr R. Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. J Sports Med. 2003; 33:1037-60.

3. Bo H, Zhang Y, Ji L. Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. J Ann N Y Acad Sci. 2010; 12:121-8.

4. Schneider CD, Alvaro RO. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. J Rev Bras Med Esporte. 2004; 10 (4):314-8.

5. Leelarugrayub N, Sutabhaha T, Pothongsunun P. Exhaustive Exercise Test and Oxidative Stress Response in Athletic and Sedentary Subjects. J CMU. 2005; 4:183-5.

6. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. J Dyn Med. 2009; 8:1-5.

7. Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodríguez-Marroyo JA, Villa G, and et al. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. J Nutr Biochem. 2006; 17:665-71.

8. Groussard C, Rannou BF, Machefer G. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. Eur J Appl Physiol. 2003; 89:14-20.

9. Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. J Mech Ageing Dev .2007; 6:267–75.

10. Traverse JH, Nesmelov YE, Crampton M, Lindstrom P, Thomas DD, Bache RJ. Measurement of myocardial free radical production during exercise using EPR spectroscopy. J Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290:2453-8.

11. Sanz A, Hiona S, Kujoth GC, Seo AY, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R and et al. Evaluation of gender differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. J Exp Gerontol. 2007; 42:173-82.

12. Córdova A, Sureda A, Tur JA. Immune response to exercise in elite sportsmen during the competitive season. J Physiol Biochem. 2010; 66:1–6.

13. Tartibian B. Assessment of physiological index in sport. 1st ed. Tehran: Teymourzade Press; 2006.p.39-41.

14. Deschenes MR, Hilard M., Wilson JA, Dubina MI, Eason MK. Effects of gender on physiological responses during submaximal exercise and recovery. J Med Sci Sports Exerc. 2006; 38:1304-10.

15. Guenette JA, Witt JD, McKenzie DC, Road JD, Sheel AW. Respiratory mechanics during exercise in endurancetrained men and women. J Physiol. 2007; 581:1309–22.

16. Gomez-Cabrera M, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. J Free Radic Biol Med. 2008;

44:126–31.
17. mBrownlee K, Moore AW, Hackney A. Relationship between circulating cortisol and testosterone: influence of physical exercise. J JSSM. 2005; 4 (1):76-83.
18. Engström BE, Karlsson FA, Wide L. Gender differences in diurnal growth hormone and epinephrine values in young adults during ambulation. Clin Chem. 1999; 45:1235-9.
19. Kivlighan KT, Granger DA, Booth A. Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. Psychoneuroendocrinology. 2005; 30:58-71.
20. Ji L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc Soc Exp Biol Med. 1999; (222):283-92.
21. Pool AJ, Whipp BJ, Skasick AJ , Alavi A, Bland JM, Axford JS. Serum cortisol reduction and abnormal prolactin and CD4/CD8 T-cell response as a result of controlled exercise in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematous despite unaltered muscle energetic. J Rheumatology. 2004;43:43-8
22. Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland IH, Chaudry IH.. Androgen and estrogen recep- tors in splenic T lymphocytes: effect of flutamide and trauma-hemorrhage. Shock. 2000; (14):465-70.
23. Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. 2010; (4):e10164.

Effect of oxidants on the mitochondrial superoxide dismutase enzyme gene expression in active men and women: influenced by intensive aerobic exercise

Bakhtiar Tartibian, PhD. Associate Professor of Exercise Pysilogy Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. ba.tartibian@gmail.com
***Behrouz Baghaiee,** MSc of Exercise Physilogy. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran (*Corresponding author). behrouz_phsport@yahoo.com
Behzad Baradaran, PhD. Assistant Professor of Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. behzad_im@yahoo.com

Abstract

Background: The aim of this research was to determine the Mn superoxide dismutase (Mn SOD) gene expression and the impact of oxidant and inflammatory markers on Mn SOD gene expression in active men and women.
Methods: This research was a semi-experimental with repetitious measurement, and 24 active men (12) and women (12) (21-23 years) voluntarily participated in this research after completing the consent form. Venous blood samples were taken in three stages; prior to exercise test, immediately and 3 hr after exercise test (Recovery). SYBER Green PCR Master mix reagent Kit and Real-time PCR method were used for Mn SOD gene expression and Eutoanalyzer for measurement of malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) levels.
Results: The mRNA Mn SOD did not significantly increase at any time of exercise in men ($p \geq 0.05$). But mRNA Mn SOD significant increased in the recovery state in women (= 0.006). In the men group, MDA activity was higher than the basal state in recovery and immediately of exercise (respectively, p= 0.012 and p= 0.014), but significantly increased in recovery state in women (p= 0.002). LDH levels significantly increased immediately and in the recovery state only in women group (p= 0.009 and p= 0.026). Also there was a significant relationship between MDA activity and Mn SOD gene expression in active men (p= 0.001).
Conclusions: From the results of this study it can be found that the oxidants are effective factors on attenuation of Mn SOD gene expression during intensive exercise in active individual.

Keywords: Malondialdehyde, Mn superoxide dismutase, Lactate dehydrogenase