

بيان ژني آنزيم Cu/Zn Superoxide Dismutase سلول هاي لنفوسيني، تغييرات آنتي اكسيدان تام و شاخص هاي استرس اكسيداتيو تحت تاثير تمرين شديد بدني در مردان جوان ورزشكار

*بهروز بقائي: کارشناسي ارشد فيزيولوژي ورزشي، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشي، دانشگاه اروميه، اروميه، ايران. (نويسنده مسئول) behrouz_phspor@yahoo.com

دكتور بهخيار ترتيبيان: دانشيار و متخصص فيزيولوژي ورزشي، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشي، دانشگاه اروميه، اروميه، ايران. ba.tartibian@gmail.com

محمد رضا على پرستي: کارشناسي ارشد ايمونولوژي، گروه ايمونولوژي، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، تبريز، ايران. aliparasty@sums.ac.ir

دكتور بهزاد برادران: استاديار ايمونولوژي، مرکز تحقیقات ايمونولوژي، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، تبريز، ايران. behzad_im@yahoo.com

شهره الماسی: کارشناسي ارشد ايمونولوژي، گروه ايمونولوژي، دانشگاه علوم پزشكى تبريز، تبريز، ايران.

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

چكیده

زمينه و هدف: هدف از تحقیق حاضر بررسی بيان ژني آنزيم Cu/Zn Superoxide Dismutase سلول هاي لنفوسيني، تغييرات آنتي اكسيدان تام و شاخص هاي استرس اكسيداتيو تحت تاثير تمرين شديد بدني در مردان جوان ورزشكار می باشد.

روش کار: تحقیق حاضر از نوع نيمه تجربی با اندازه گيري متعدد می باشد که در آن ۲۰ مرد ورزشكار می باشد. رضایت نامه در تحقیق شرکت داده شدند. در سه حالت قبل از فعالیت، پس از تست شدید ورزشي (سرعت: ۷/۵ مایل بر ساعت، شیب: ۵ درجه، زمان: ۲۰ دقیقه) و در حالت بهبودی (Recovery ۳ ساعت بعد از انجام تست تمرينی)، خون گيری وريز بازوبي از آرمودونی ها به عمل آمد. برای اندازه گيري mRNA آنزيم Cu/Zn SOD از روش Real time- Polymerase chain reaction (PCR).

یافته ها: سطح H₂O₂ بعد از تمرين شدید بدني و ۳ ساعت بعد از آن افزایش معنی داري یافت (p=۰/۰۱۲) و (p=۰/۰۱۴). غلظت mRNA آنزيم Cu/Zn SOD نیز بعد از فعالیت شدید و ۳ ساعت بعد آن، افزایش یافت، لیکن این تغییرات معنی دار گزارش نشد (p=۰/۰۸۵) و (p=۰/۰۳۷). سطح TAS نیز فقط در مرحله بهبودی افزایش معنی داري داشت (p=۰/۰۰۹) و (p=۰/۰۱۶).

نتیجه گيري: تمرين شدید بدني باعث افزایش سطح شاخص هاي استرس اكسيداتيو و تضعيف دستگاه ايمني افراد ورزشكار مرد می شود، اما اين افراد در پاسخ به تهديدات صورت گرفته از سوي راديکال هاي آزاد، فعالیت آنزيم هاي آنتي اكسيدان را افزایش می دهند و بيان ژني آنزيم Cu/Zn SOD افزایش معنی داري نمي يابد.

کليدواژه ها: آنتي اكسيدان تام، پراكسيد هيدروژن، مردان ورزشكار.

افزایش اين نوع از اكسيدان ها می شود و لذا در حین فعالیت هاي شدید بدني که با افزایش اکسیژن مصرفی روبه رو هستیم، تولید آن ها به چندین برابر افزایش می یابد (۳ و ۴). پراكسيد هيدروژن (H₂O₂) نیز یکی از زیر شاخه هاي راديکال هاي آزاد می باشد، که در ايجاد شرایط استرس اكسيداتيو نقش مهمی را ايفا می کند (۵). عموماً غشا و DNA سلولی بيشترین نقاطی از سلول هستند که از طرف H₂O₂ دچار آسيب می گردد، زيرا ساختار غشای سلولی محتوى ليپيد هاي غير اشباع يا به عبارتی پيوندهای دوگانه است که اين پيوند ها از سوي راديکال هاي آزاد مورد هدف قرار گرفته و در نتیجه

مقدمه

استرس اكسيداتيو شرایطی است که در آن بين تولید راديکال هاي آزاد، عوامل التهابي و سطح آنتي اكسيدان ها، بي نظمی به وجود می آيد که می تواند منجر به افزایش سطح راديکال هاي آزاد گردد (۱). از سوي ديگر راديکال هاي آزاد، اتم ها يا مولکول هاي با تک الکترون منفرد هستند که به دليل بي ثباتي شيميائي تمایل زيادي به واکنش با الکترون مولکول هاي ديجر همانند DNA، ليبيدها و پروتئين ها دارند و منجر به آسيب هاي بي در ساختار و عملکرد آن ها و بافت ها می شوند (۲). مطالعات نشان می دهد که حضور بيش از حد اکسیژن در دسترس، منجر به

از سویی دیگر فعالیت‌های 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 می‌باشد. چنانچه در تحقیقی که بر تاثیر فعالیت بدنی بر روی بیان ژنی سوپراکسیداز دیسموتاز در موش‌های آزمایشگاهی انجام شد، افزایش معنی دار بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی را در سلول‌های عضلانی در اثر فعالیت شدید ورزشی گزارش کردند (۱۲). با این حال مطالعه دیگری افزایش معنی داری را در mRNA آنزیم SOD در آزمودنی‌های 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 شاخص‌های آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو یافت نشد، محققین پژوهش حاضر بر آن شدند که بیان ژنی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز سیتوپلاسمی و تغییرات آنتی اکسیدان تام و همچنین تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو را در مردان جوان ورزشکار نژاد ایرانی مورد بررسی قرار دهند.

روش بررسی

آزمودنی‌ها: تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری مکرر می‌باشد که جامعه آماری آن را مردان ورزشکار تشکیل می‌دهد. 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. ویژگی‌های فیزیولوژیکی آنها شامل قد (سانتمتر)، وزن (کیلوگرم)، درصد چربی (٪)، و ضربان قلب (ضربان در دقیقه) و... مورد بررسی قرار گرفت. افراد با سابقه ابتلا به بیماری‌های مزمن و افرادی که از نظر شاخص فیزیولوژیک قادر معيارهای موردنظر برای ورزشکار بودن شناخته شدند، از شرکت در تحقیق حذف گردیدند و از بین آن‌ها ۲۰ آزمودنی با دامنه سنی ۲۳-۲۱ سال در تحقیق شرکت داده شدند.

به سمتی و گستاخ پیوند هیدروژنی منجر می‌شوند. با سمت شدن پیوند بین مولکول‌های غشا، فعالیت سلول نیز چهار مشکلاتی می‌گردد (۶)؛ لذا برخی از محققین معتقدند که افزایش غلظت H2O2 در خون، وابسته به شدت ورزش می‌باشد و هر اندازه فعالیت از شدت بیشتری برخوردار باشد، تولید و رها سازی H2O2 نیز افزایش بیشتری می‌یابد (۸).

از این رو تمرین شدید بدنی نوعی فعالیت ورزشی است که در آن سرعت و شبکه مسافت با افزایش زمان فعالیت، گسترش می‌یابد و با افزایش تدریجی شدت فعالیت همراه می‌باشد. شدت فعالیت نیز نتیجه تحریک‌های عصبی است که ورزشکار هنگام تمرین به کار می‌گیرد و با توجه به نیاز بیشتر به مصرف اکسیژن در حین ورزش‌های هوایی 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 می‌گردد (۹). برای مقابله با شرایط استرس اکسیداتیو و التهابی، سیستم دفاعی بدن از آنتی اکسیدان‌ها بهره می‌گیرد. آنتی اکسیدان‌ها نیز به دو صورت آنزیمی و غیر آنزیمی وجود دارند. آنزیم‌های آنتی اکسیدان به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند که Cu/Zn SOD از نخستین آنزیم‌هایی است که در برابر رادیکال‌های آزاد و کاستن اثرات آن‌ها از سوی لنفوسيت‌ها و بافت‌های مختلف آزاد می‌شود (۱۰). هسته سلول رونویسی از ژن‌های موجود در DNA سلول حضور فعال داشته و نقش برجسته‌ای نیز در جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها بر عهده دارد. ناهنجاری در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها مانند آزایم، آسیب‌های مفاصل، مشکلات پروسنتات، آسیب‌های مغزی، بیماری‌های التهابی و التهاب شکم شده و همچنین باعث تاخیر در بهبود زخم و سوختگی‌ها می‌شود. ناهنجاری در ژن SOD باعث بروز بیماری ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) می‌گردد. ALS بیماری است که در آن سلول‌های عصبی به علت کمبود SOD در برابر رادیکال‌های آزاد چهار آسیب می‌شوند (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 ۱۵۰۰۰ 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 ۱۰X ریخته شده و توسط DEPC-treateed eater به حجم ۹ میکرولیتر میکرولیتر رسید.

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

۳- به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC- Oligi (dt) Primer و ۱ میکرولیتر treated water افزوده شد و ۵ دقیقه Random hexamer Primer در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block گردید. ۴ میکرولیتر reaction buffer ۵X و ۲ میکرولیتر Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) Ribolock ۱۰mM و ۱ میکرولیتر mix افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصراً، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید.

۴- ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse

برای اندازه گیری میزان بیان Real-time PCR

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 خود در لوله فالکون (Falcon tube) ۵۰ میلی محتوی 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 شبیب نوار گردان شروع به راه رفتند. سپس در مرحله بعد با افزایش زمان فعالیت، شبیب و سرعت فعالیت افزایش یافت و حداکثر به شبیب 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 Phosphate Buffered Saline یک میلی لیتر PBS (PBS) سرد شستشو داده شدند. سپس به لوله های ۱/۵ میلی لیتری Deoxyribonuclease Free و Ribonuclease Free منتقل شدند. در مرحله بعد یک میلی لیتر محلول RNXTM-PLUS به ازای هر ۱۰۶ × ۶ سلول به میکروتیوب (microtube) افزوده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفروم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه

به میزان ۲ میلی لیتر بوتائل نرمال اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۲ دقیقه ورتكس نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و پس از جدا کردن فاز آبی (محلول رویی) اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بوتائل نرمال به عنوان بلانک انجام گرفته و مقابله بوتائل نرمال H₂O₂ سرمی نمونه های حاصل، پس از انتقال به منحنی استاندارد 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 جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت، غلظت H₂O₂ سرمی نمونه ها تعیین گردید.

روش آزمایشگاهی اندازه گیری آنتی اکسیدان تمام 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 حداقل اکسیژن مصرفی (Volume of O₂ maximum=V_{02max}) (این فرمول اختصاص به مردان دارد) (۱۴):

حداقل اکسیژن مصرفی:

$$\text{تعداد ضربان قلب} \times 0.1453 - (\text{سرعت ساعت} / \text{مايل} \times 54.07 + 7.062) - (وزن (\text{کیلوگرم}) \times 0.193) / 47$$

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 Model Mixed از آزمون آماری اندازه گیری های مکرر استفاده شد. از آزمون بونفرونی (Bonferroni) نیز برای تعقیب و مشخص نمودن محل وجود تفاوت ها استفاده گردید. در این پژوهش، ارتباط شاخص ها توسط رگرسیون خطی (Regression) مشخص گردید. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و در سطح معنی داری p ≤ 0.05 انجام گرفت.

زنی Cu/Zn SOD- Corbett Rotor (gene-6000) استفاده شد. جفت پرایمرهای (Primer) مربوط به هر زن با استفاده از نرم افزار Pioneer 3 Primer (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 رشتہ 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 تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. در پایان Melting (قبل از آنالیز داده ها، منحنی ذوب Real-time curve)، به دست آمده از هر واکنش PCR بررسی شد تا پیک مربوط به زن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر (Dimer) تایید شود. برای آنالیز داده ها ابتداء از actin gene (Ct) در هر نمونه از افتراق β-actin Ct (Cycle Threshold) مربوطه و Ct به عنوان مرجع محاسبه شد.

روش آزمایشگاهی اندازه گیری H₂O₂

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

اندازه گیری H₂O₂ با حل کردن ۵۰۰ میکرو لیتر سرم در ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (شرکت مرک) ۱٪ آغاز می گردد. پس از ورتكس (Vortex) کردن به میزان ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰.۶٪ (شرکت مرک) به لوله آزمایش اضافه شده و درآدامه 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،

جدول ۱- ویژگی های فیزیولوژیکی مردان ورزشکار جوان

Mean± SD	شاخص های فیزیولوژیکی
۱۷۷/۵۹± ۷/۰۲	قد
۵۴/۷۰ ± ۶/۱	وزن
۱۱/۱۶ ± ۴/۷۳	درصد چربی
۵۵/۹۷ ± ۱/۳۵	VO2max
۲۲/۵ ± ۱/۵	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 ۰/۰۱ واحد کاهش یافته است، لیکن هیچ کدام این ارتباط ها و تغییرات معنی داری گزارش نشد ($p \geq 0/05$) (جدول ۴).

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 هوایی و شدید تشکیل می دهد، لذا افزایش در غلظت H_2O_2 را می توان 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

یافته ها

یافته های 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 ($p \leq 0/05$) (۳/۳۷±۰/۹۹)، 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 ($p \leq 0/014$) (۳/۳۶±۰/۸۵) (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 ($p \geq 0/99$ و $p \geq 0/346$ و $p \geq 0/407 \pm 0/۴۰۷$) (۵/۰۳±۲/۷) (نمودار ۱). همچنین بررسی نمونه های خونی نشان داد که سطح TAS بعد از فعالیت، در مردان ورزشکار با افزایش معنی داری همراه نبوده است ($p \geq 0/437$) (۰/۰۸۲±۰/۱۲). با این حال در مرحله بهبودی این افزایش معنی دار گزارش شد ($p \leq 0/009$) ($p \leq 0/016$) (نمودار ۲). (لازم به ذکر تمام value ها در مقایسه با حالت پایه به دست آمده اند).

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

H Cu/Zn-SOD Forward	5'-AAGGCCGTGCGTGCTGAA-3'
H Cu/Zn-SOD Reverse	5'-CAAGTCTCCAACATGCCTCT-3'
H β -actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATGGCAAT-3'
H β -actin Reverse	5'-TCTTGCGGATGTCCACGT-3'

جدول ۳- تغییرات پراکسید هیدروژن در سه مرحله از فعالیت

سطح معنی داری	Mean ± SD	متغیر
$p \leq 0/012$	$0/84 \pm 2/95$	حالت پایه H_2O_2 (μ m)
$p \leq 0/014$	$0/99 \pm 3/37$ $0/85 \pm 3/36$	بعد از فعالیت بهبودی

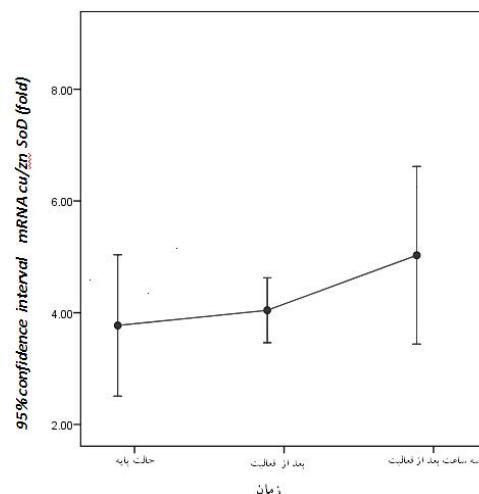
(مقایسه بعد از فعالیت با حالت پایه = $p1$ و مقایسه مرحله بهبودی با حالت پایه = $p2$ (بر اساس آنالیز آماری اندازه گیرهای مکرر و آزمون تعقیبی بونفرونی)

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

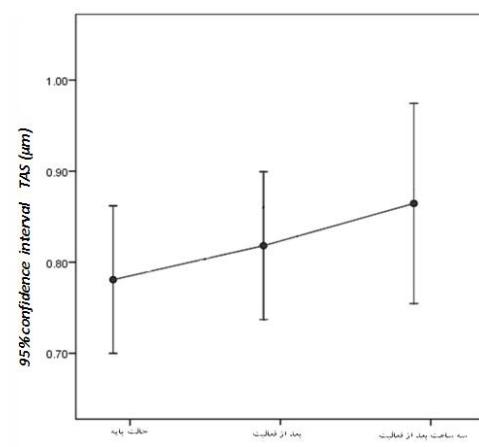
B (95% confidence interval)	P	متغیر	پاسخ
- ۰/۰۱	۰/۹۳۹		Total antioxidant status
-۲/۶۲	۰/۰۵۱	H_2O_2	mRNA Cu/Zn SOD

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 می‌کنند، به طوری که افزایش هورمون استرنس مانند کورتیزول و اپی نفرین نیز علت این فرایند، گزارش شده است (۱۵).

همچنین بررسی‌های ملکولی تحقیق حاضر، نشان دهنده افزایش در بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD در اثر تمرین شدید بدنی بود، لیکن این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار گزارش نشد. در این مورد افزایش رادیکال‌های آزاد از جمله H_2O_2 و نیاز بدن به محافظت از بافت‌های مانند لنفوسيت‌ها را می‌توان احتمال وقوع چنین تغییرات، هرچند اندک در سطح بیان ژنی Cu/Zn SOD داشت، زیرا گزارش شده است که سطح این آنزیم، توسط اکسیدان‌ها به H_2O_2 ، در یک فعالیت بدنی حاد تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با این حال برخی تحقیقات یافته‌های مشابه و متناقضی را گزارش کرده‌اند. از آن جمله mRNA گزارش نمودند که غلظت آنزیم Cu/Zn SOD متعاقب فعالیت‌های هوازی شدید در موش‌های آزمایشگاهی افزایش یافته است (۱۶). در حالی که عده‌ای دیگر گزارش نمودند، سطح بیان ژنی Cu/ZnSOD در بازیکنان حرفة‌ای فوتبال بعد از فعالیت نسبتاً شدید روی دستگاه نوار گردان افزایش معنی‌داری را نداشت (۱۷). هر یک از تحقیقات دلایل مختلفی را برای یافته‌های خود گزارش کرده‌اند، 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 فعالیت‌های شدید بدنی از دلایل موثر مبنی بر عدم افزایش معنی‌دار یا غیر معنی‌دار در بیان ژنی آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی ذکر شده است. مطالعه دیگری نیز در بررسی بیان ژنی Cu/Zn SOD در ورزشکاران گزارش کرد، که در یک مرحله تمرین شدید بدنی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله Cu/Zn SOD در افراد ورزشکار در برابر افزایش رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد 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 فراینده تری بهره مند باشد، تولید و رها سازی H_2O_2 نیز افزایش بیشتری می‌یابد (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 می‌نمایند (۵). احتمالاً این مزیت ناشی از سازگاری دستگاه دفاعی بدن افراد ورزشکار برای مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌باشد. 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 پیش‌تر نیز گفته شد، آزمودنی‌های تحقیق حاضر را مردان ورزشکار تشکیل می‌دهد. در این خصوص برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که مردان در اثر فعالیت‌های هوازی به تولید رادیکال‌های آزاد

می شود در تحقیقات بعدی اندازه گیری 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 Y, Hayabara T. 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 نمی کند (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 آنزیم های آنتی اکسیدان لزوماً به معنای افزایش در بیان ژنی آن ها 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 قبل 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 ۰/۰۱ واحد کاهش داشته است. از این تاثیر می توان نتیجه گرفت که در اثر تمرینات شدید در مردان ورزشکار، عوامل استرس اکسیداتیو باعث تضییف دستگاه ایمنی از نظر بیان ژنی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان می شوند، اما تضییف فعالیت آنتی اکسیدان ها در اثر H₂O₂ 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 تضییف 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 آنزیم های آنتی اکسیدان افزایش می دهند و لذا بیان ژنی آنزیم Cu/Zn SOD افزایش معنی داری نمی یابد.

در تحقیق حاضر سطح هورمون های کورتیزول و اپی نفرین اندازه گیری 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: 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 are effectively ,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 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, H₂O₂, Men Athletes.