مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۰ ، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۱
صفحه: ۷۸۸-۷۷۸

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 20, No. 6, Jan-Feb 2013
Pages: 778-788

بیان ژن آنزیم کاتالاز و سطح شاخص‌های اکسیدانی در زنان تمرین کرده: اثر تمرین ورزشی فزاینده

بختیار ترتیبیان*[۱]، بهروز بقایی[۲]، بهزاد برادران[۳]

۱- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استادیار گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱

چکیده

مقدمه: در ارتباط با بیان ژنی کاتالاز، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و اکسیدان‌ها در زنان تمرین کرده مطالعات محدودی انجام یافته است، به طوری که سطح این شاخص‌ها به خصوص در زنان تمرین کرده ایرانی و در پاسخ به فعالیت‌های شدید به طور دقیق مشخص نشده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان ژنی آنزیم کاتالاز و سطح اکسیدان‌ها در زنان تمرین کرده می‌باشد.

روش بررسی: پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی می‌باشد که در آن چهارده زن ورزشکار شهر ارومیه در دامنه سنی ۲۵-۲۳ سال پس از تکمیل رضایت‌نامه، داوطلب شرکت در تحقیق شدند. در سه مرحله بلافاصله، قبل و بعد از و ۳ ساعت بعد اجرای تست Graduate Exercise Test: GXT (سرعت: ۷/۵ مایل بر ساعت، شیب: ۶ درصد، زمان: ۳۰ دقیقه) خونگیری بازویی انجام شد. برای بیان ژنی کاتالاز از دستگاه Real-time PCR و برای بررسی سطح MDA و آنتی‌اکسیدان تام از ائوتوآنالیزور استفاده شد.

نتایج: سطح مالون‌دی‌آلدئید (Malon De Aldeide: MDA) بعد از فعالیت و ریکاوری افزایش یافت، لیکن فقط در مرحله ریکاوری (۳ ساعت بعد از فعالیت) از نظر آماری معنی‌داری گزارش شد ($p<۰/۰۰۲$). بیان ژنی کاتالاز بعد از فعالیت افزایش معنی‌داری داشت، با این حال این تغییرات در مرحله ریکاوری معنی‌دار گزارش نشد ($p<۰/۰۳$). غلظت توتال‌آنتی‌اکسیدان (Total Antioxidant Status: TAS) نیز بعد از فعالیت ورزشی افزایش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۳۱$)، لیکن ۳ ساعت بعد از تمرین با کاهش مواجه شد ($p>۰/۰۶۵$).

نتیجه‌گیری: تمرینات ورزشی فزاینده باعث افزایش بیان ژنی کاتالاز و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد در زنان تمرین کرده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، کاتالاز، زنان تمرین کرده

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۶۰۹۰۵۵۱، پست الکترونیکی: ba.tartibian@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

مقدمه

مالون‌دی‌آلدئید (MDA: Malon De Aldeide) مولکولی است که از زیر رده اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد بوده و در سلول‌های پستانداران قابلیت تولید دارد و به نحوی شکل تغییر یافته پراکسید هیدروژن (H2O2) نیز است. رادیکال‌های آزاد اتم‌ها یا مولکول‌هایی با تک الکترون منفرد هستند که از طریق واکنش با الکترون سایر مولکول‌های موجود در سلول، منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب در سلول‌ها می‌گردند(۱).

شرایط استرس اکسیداتیو حالتی است که در آن، تعادل بین سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و تولید رادیکال‌ها تا حدودی از بین رفته و منجر به افزایش سطح این شاخص‌ها می‌شود(۲،۳). معمولاً بیشترین قسمتی که از سوی MDA و دیگر رادیکال‌های آزاد دچار آسیب می‌گردد، غشاء و DNA سلولی می‌باشد. ساختار غشای سلولی به نحوی است که حاوی لیپیدهای غیر اشباع با پیوندهای دوگانه بوده و این پیوندها از سوی رادیکال‌های آزاد مورد هجوم قرار می‌گیرند، که در نهایت منجر به سستی و گسست پیوندهای هیدروژنی می‌گردد. با گسستن پیوند بین مولکول‌های غشاء، آنزیم‌های متصل به غشاء نیز متعاقباً از کار افتاده و فعالیت سلول دچار مشکلاتی می‌شود(۴،۵). محققین بر این عقیده‌اند که افزایش اکسیژن در دسترس این فرایند را افزایش داده و در حین فعالیت‌های شدید ورزشی به چندین برابر حالت استراحت افزایش می‌دهد(۶،۷). به طوری که گزارش شده است هر اندازه فعالیت فزاینده‌تر بوده و از شدت بیشتری برخوردار باشد، تولید و رهاسازی MDA نیز افزایش بیشتری می‌یابد(۸).

از این رو تست ورزشی GXT :Graduate Exercise Test نیز نوعی فعالیت ورزشی فزاینده است که در آن سرعت و شیب مسافت با مرور زمان، گسترش یافته و با افزایش تدریجی شدت فعالیت همراه می‌باشد. شدت فعالیت نتیجه تحریک‌های عصبی است که ورزشکار هنگام تمرین به کار می‌گیرد و با توجه به نیاز بیشتر بدن به اکسیژن در ورزش‌های هوازی، در نتیجه دریافت و انتقال و جذب اکسیژن از محیط بیرونی به محیط درون بدن به منظور سوخت و ساز و تولید انرژی ATP، افزایش یافته و باعث تولید استرس اکسیداتیوهای بیشتری می‌گردد(۹).

برای مقابله با استرس اکسیداتیو و شرایط التهابی، دستگاه دفاعی بدن از آنتی‌اکسیدان‌ها بهره می‌گیرند. آنتی‌اکسیدان‌ها نیز در دو نوع آنزیمی و غیرآنزیمی قرار دارند. کاتالاز از انواع آنزیمی آنتی‌اکسیدانی است که در اکثر سلول‌های هوازی حضور دارد. این آنزیم دارای ساختاری با چهار زنجیره پلی‌پپتیدی است که در هر زنجیره آن بیش از ۵۰۰ اسید آمینه وجود دارد و از چهار گروه نیز تشکیل شده است. عملکرد مهم کاتالاز تبدیل هیدروژن پراکسید به آب و مولکول اکسیژن بوده و مهمترین محل تجمع این آنزیم در سلول‌های یوکاریوتی، پراکسیزوم‌ها می‌باشد.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

مطالعات مختلف عوامل متعددی را بر سطح MDA و آنزیم کاتالاز مؤثر دانسته‌اند که بیماری‌های مختلف مانند؛ دیابت، پوکی استخوان، و همچنین فعالیت‌های بدنی و جنسیت از آن جمله هستند(۱۰،۱۱). بررسی‌ها نشان دهنده آن است که جنسیت عملکرد ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که محققین معتقدند هورمون استروژن زنانه از طریق جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد در دختران و زنان مانع از افزایش عوامل آسیب‌رسان به سلول‌ها می‌شود. همسو با این یافته‌ها بررسی‌های دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد میتوکندری زنان به اندازه نصف مقدار میتوکندری مردان رادیکال‌های آزاد تولید می‌نماید(۱۴-۱۲). در ارتباط با نقش استروژن Jaiswar و همکاران نیز گزارش نمودند که زنان یائسه به دلیل برخورداری از سطح پایین هورمون استروژن، رادیکال‌های آزاد بیشتری نسبت به زنان جوان‌تر داشته و آسیب عضلات نیز در این سنین شایع‌تر می‌باشد(۱۵). با این حال استروژن در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز نقش بسیار مؤثری ایفا می‌نماید. چنانچه گزارش شده است سلول‌های دستگاه ایمنی از جمله لنفوسیت‌ها و دیگر سلول‌های زنان دارای گیرنده‌های هورمون استروژن هستند. این گیرنده‌ها به زیر رده Era: Estrogen Receptor a و ERb: Estrogen Receptor b تقسیم می‌شوند که در سلول‌های دستگاه ایمنی گیرنده ERb غالب‌تر بوده و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

فعالیت لنفوسیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد(۱۶). از این رو Kristen و همکاران نیز معتقدند که بیان ژنی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در عضلات از جمله کاتالاز تحت تأثیر گیرنده‌های Era قرار می‌گیرد. این محققین در بررسی‌های خود گزارش کردند که استروژن علاوه بر نقش مؤثر خود در افزایش بیان ژن گیرنده‌های Era، ارتباط مستقیمی نیز با بیان ژنی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دارد، به طوری که هورمون استروژن از طریق افزایش بیان ژنی این گیرنده، باعث افزایش بیان ژنی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در عضلات نیز می‌شود(۱۷).

با این حال ورزش و فعالیت بدنی نیز در کنار عوامل دیگر، پاسخ‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بین افراد ورزشکار و افراد کم تحرک از نظر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی تفاوت‌هایی وجود دارد، به طوری که سطح سلول‌های لنفوسیتی در زنان ورزشکار بسیار فراتر از زنان غیرورزشکار است و افراد تمرین کرده از فعالیت سطح استروژن و کاتالاز بیشتری برای مقابله با عوامل التهابی و رادیکال‌های آزاد بهره می‌برند(۱۸). اما نتایج بررسی‌ها در ارتباط با بیان ژنی کاتالاز و فعالیت‌های ورزشی در زنان ورزشکار به روشنی مشخص نشده است و به خصوص تحقیقی که به بررسی بیان ژنی این آنزیم در زنان ورزشکار نژاد آسیایی و ایرانی پرداخته باشد، از سوی محققین این پژوهش یافت نشد. از این رو هدف از این پژوهش پرداختن به بیان ژنی کاتالاز و سطح اکسیدان‌ها در زنان ورزشکار به دلیل محدود بودن تحقیقات صورت گرفته و نیاز به تحقیق بیشتری برای رسیدن به نتایج قطعی‌تر است.

روش بررسی

تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری‌های متعدد بود. جامعه آن را زنان ورزشکار شهر ارومیه تشکیل دادند. در پژوهش حاضر از بین افراد داوطلب، چهارده زن تمرین کرده در دامنه سنی ۲۵-۲۳ سال حائز شرایط شرکت در تحقیق تشخیص داده شدند (انتخاب تعداد آزمودنی‌ها بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه انجام شد). این افراد فرم رضایت‌نامه شرکت در تحقیق را تکمیل نمودند، سپس متغیرهای زمینه‌ای قد (متر)، وزن (کیلوگرم)، سن (سال)، درصد چربی بدن (درصد)، ضربان قلب (ضربان در دقیقه)، فشار خون استراحت (میلی‌متر جیوه)، و وضعیت غذایی در حالت پایه اندازه‌گیری شد. سپس به منظور بررسی سطح پایه بیان ژنی کاتالاز و سطح MDA و TAS در حالت ناشتا و قبل از فعالیت نمونه خونی وریدی گرفته شد. بعد از آن آزمودنی‌ها در پروتکل تمرینی فعالیت فزاینده شرکت کردند و مجدداً بعد از فعالیت و سه ساعت بعد از آن (ریکاوری) از آزمودنی‌ها نمونه خون وریدی گرفته شد. از شرکت آزمودنی‌های دارای بیماری‌های مزمن، افراد فاقد شاخص‌های فیزیولوژیکی مورد نظر و افراد در مرحله قائدگی جلوگیری به عمل آمد.

در آزمون ورزشی GXT آزمودنی‌ها ابتدا به مدت سه دقیقه روی حداقل شیب نوار گردان شروع به راه رفتن کردند. در مرحله بعد با افزایش زمان فعالیت، شیب و سرعت فعالیت افزایش یافت و حداکثر به شیب ۶ درجه و سرعت ۷/۵ مایل در ساعت رسید و آزمودنی‌ها ۳۰ دقیقه فعالیت مورد نظر را انجام دادند. پس از اتمام فعالیت نمونه خون به مقدار ۱۰ سی‌سی جمع‌آوری گردید. بعد از ۳ ساعت از اتمام فعالیت فزاینده، مجدداً به مقدار ۱۰ سی سی خونگیری سوم به عمل آمد. که ۴ سی سی از آن در لوله فالکون‌های معمولی برای بررسی سرم، ۵ سی‌سی نیز در لوله فالکون‌های حاوی ماده ضد انعقاد ریخته شد.

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

۵ میلی‌لیتر خون محیطی در ضد انعقاد EDTA گرفته شد و با استفاده از کلرید آمونیوم، گلبول‌های قرمز (RBC: Red Blood Cell) آن لیز شده و به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴°C و ۶۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی آسپیر شده و سلول‌ها با یک میلی‌لیتر PBS سرد شستشو داده شدند. سپس بعد از آن به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری DNase Free و RNase Free منتقل شدند. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS به ازای هر ۶×۱۰۶ سلول به میکروتیوب افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

به هر میکروتیوب ۲۰۰µl کلروفروم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ºC و ۱۵۰۰۰g 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 ۴ºC انکوبه گردید. سپس در دمای ۴ºC و ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع روئی بیرون ریخته شد و سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه گردید.

به هر میکروتیوب ۲۰µL DEPC-treated eater افزوده شده و برای ادامه مراحل در فریزر با دمای ۷۰ºC درجه نگهداری گردید.

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

RNA 1µl و 1µl از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted eater (Cinna gen., Iran) به حجم ۹µl رسید.

DNase 1µl به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ml از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰ºC قرار گرفت.

به تیوب مربوطه DEPC-treated water 11µl و 1µl Random hexamer Primer (Fermentas یا oligi(dt) Primer (Canada) افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ºC بر روی Dry block انکوبه گردید.

reaction buffer 5X 4µl و dNTP 10mM mix 2µl و 1µl Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor (Fermentas., Canada) به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ºC انکوبه گردید.

1µl آنزیم RverertAid TM H Minus M-MuLV Reverse (Fermentas., Canada) به تیوب قبل افزوده شد.

برای اندازه‌گیری بیان ژنی کاتالاز از دستگاه مربوطه Corbett- Rotor (gene -6000) (Corbett, Research Australia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer ۳ طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۸۰nm مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

پرایمرها: واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCr به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند.

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 گردید. در پایان قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، 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 تأیید شود.

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

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در بیان ژنی کاتالاز

H CAT Forward	5'-TTTGGCTACTTTGAGGTCAC-3
H CAT Reverse	5'-TCCCCATTTGCATTAACCAG-3'
H β-actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATTGGCAAT-3'
H β-actin Reverse	5'-TCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

اساس روش اندازه‌گیری MDA سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه‌گیری جذب به روش ائوتوآنالیزور و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می‌باشد.

اندازه‌گیری MDA با حل کردن ۵۰۰ میکرو لیتر سرم در ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (شرکت مرک) ۱٪ آغاز می‌گردد. پس

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

از ورتکس کردن به میزان ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪(شرکت مرک) به لوله آزمایش اضافه شده و پس از ورتکس کامل به مدت ۴۵ دقیقه در داخل یک بن ماری در حال جوش قرار داده می‌شود. پس از اتمام مدت لازم لوله‌های آزمایش را زیر آب سرد خنک کرده، به میزان ۲ میلی‌لیتر بوتانل نرمال اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۲ دقیقه ورتکس نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نموده و پس از جدا کردن فاز آلی (محلول رویی) اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بوتانل نرمال به عنوان بلانک انجام گرفته و غلظت MDA سرمی نمونه‌های حاصل پس از انتقال به منحنی استاندارد (۱و ۱ و ۳ و ۳) تترامتوکسی پروپان (C7H16O4) در ۶ غلظت مختلف ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ نانو مول در میلی‌لیتر با استفاده از حل کردن در آب دیونیزه تهیه و جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و غلظت MDA سرمی نمونه‌ها تعیین گردید.

اندازه‌گیری توتال آنتی‌اکسیدان (TAS) با استفاده از کیت (Randox, Uk) و دستگاه اتوآنالیزور COBAS-MIRA plus (ساخت کمپانی Roche) انجام یافت.

در این تحقیق توزیع طبیعی همه داده‌ها آزمون گردید و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها علاوه بر آمار توصیفی از روش آماری Mix Model شامل آزمون‌های Bonferoni و رگرسیون در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ استفاده شد، و همچنین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۷ و Excel 2010 تجزیه و تحلیل شدند.

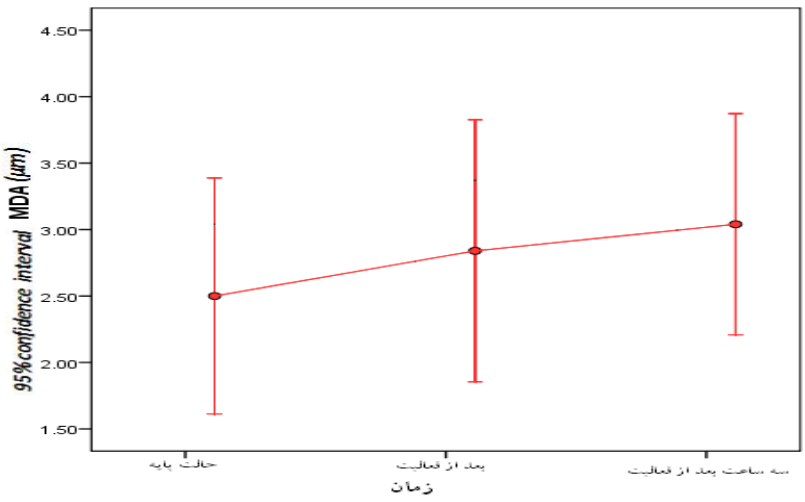
نتایج

جدول ۲ نشان دهنده شاخص‌های فیزیولوژیک زنان ورزشکار می‌باشد.

جدول۲: مشخصات فیزیولوژیکی زنان تمرین کرده

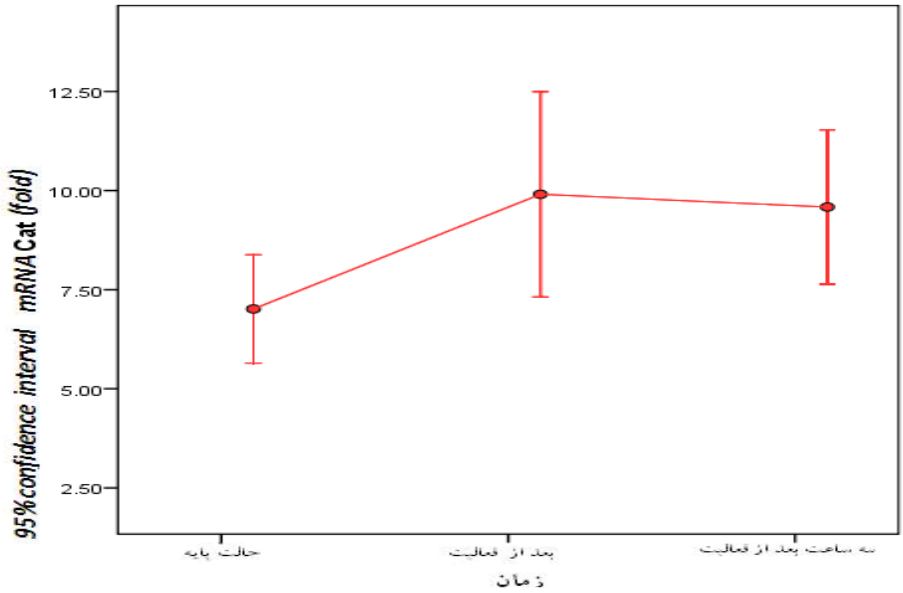
متغیر	میانگین+انحراف معیار
سن	۱± ۲۴
قد	۳/۲۵ ± ۱۶۶/۸
وزن	۳/۱۷ ± ۵۴/۱
Vo2max	۱/۳۴± ۵۳/۰۱
BMI	۱/۶۱ ± ۲۴/۵۱

نمودار ۱ گویای آن است که فعالیت شدید ورزشی منجر به افزایش سطح MDA بعد از تمرین شده است، اما بررسی این روند با استفاده از روش آماری Mixed model معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۲۵۵). با این حال سطح این شاخص خونی در مرحله ریکاوری افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۰۲) و از ۱/۸۳ ± ۲/۸۴ به ۱/۱۶ ±۳/۰۴ افزایش پیدا کرد. نمودار ۲ نیز مشخص می‌سازد که تغییرات ایجاد شده در بیان ژنی کاتالاز بعد از فعالیت معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۳)، لیکن سطح mRNAی این آنزیم در مرحله ریکاوری با کاهش محسوسی روبرو شد و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با قبل از فعالیت نداشت (p<۰/۰۶).



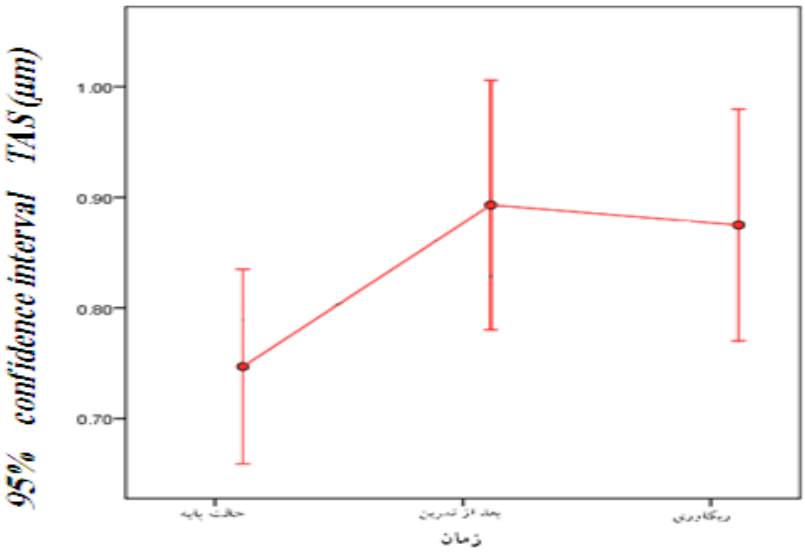
نمودار۱: تغییرات سطح MDA در سه مرحله از فعالیت در زنان تمرین کرده

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]



نمودار۲: بیان ژنی کاتالاز در سه مرحله از فعالیت در زنان تمرین کرده

سطح TAS نیز بعد از فعالیت با افزایش معنی‌داری روبرو شد (p<۰/۰۳۱)، اما تجزیه و تحلیل آماری Mixed model نشان داد که سطح این شاخص خونی در مرحله ریکاوری کاهش یافته است (p>۰/۰۶۵) (نمودار ۳).



نمودار ۳: سطح Total antioxidantدر سه مرحله از فعالیت در زنان ورزشکار

علاوه بر این، آزمون رگرسیون نیز مشخص کرد که بین تغییرات کاتالاز و سطح MDA در زنان ورزشکار ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۹۰۱) به نحوی که در ازای هر یک واحد افزایش سطح کاتالاز، غلظت MDA، ۰/۱۶ واحد افزایش می‌یابد. با این حال بین تغییرات TAS و MDA ارتباط معنی‌داری گزارش شد (p<۰/۰۵)، به طوری که به ازای هر یک واحد افزایش در سطح MDA، غلظت TAS، ۰/۱۱ واحد افزایش داشته است (جدول ۳).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

جدول۳: ارتباط بین تغییرات mRNA catalase وMDA

پاسخ	متغیر	B	Pvalue
Catalase mRNA		۰/۱۶	۰/۹۰۱
TAS	MDA	۰/۰۵	۰/۱۱

بحث

با توجه به اینکه در حین فعالیت‌های هوازی حجم زیادی از سلول‌ها از جمله سلول‌های عضلانی درگیر فعالیت می‌شوند، حجم رادیکال‌های آزاد تولید شده نیز افزایش می‌یابد که در برخی مواقع فراتر از توان آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در نتیجه حجم رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. لذا آنتی‌اکسیدان‌ها در بازه زمانی طولانی رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌نمایند.

بررسی‌ها مؤید آن است که فعالیت‌های ورزشی هوازی منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود که این فرایند مهم در تحقیق حاضر نیز نمایان شد. همچنان که گزارش شد سطح MDA که نشان دهنده شاخص اکسیدانی در این پژوهش می‌باشد با افزایش در سطح آن روبرو بود که این روند با گذشت زمان بیشتری از فعالیت، افزایش بیشتری یافت. در نظر گرفتن عواملی چند در این روند حائز اهمیت خواهد بود، که شدت، مدت فعالیت، جنسیت و سازگاری به فعالیت ورزشی از مهمترین آنها می‌باشند(۱۹). بررسی‌های سایر محققین در این زمینه نشان می‌دهد که هر اندازه فعالیت در مدت زمان بیشتری انجام یابد و شدت آن فزاینده‌تر باشد، سطح رادیکال‌های آزاد نیز متعاقباً افزایش بیشتری خواهد یافت(۲۰). نظر به اینکه در حین فعالیت هوازی منبع اصلی انرژی را اکسیداسیون هوازی تشکیل می‌دهد، در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد در میتوکندری و دیگر آنزیم‌ها مانند Xantine Oxide افزایش چند برابری می‌یابد. با این حال جنسیت نیز عامل تأثیرگذاری در این زمینه است، چنانچه محققین گزارش نموده‌اند، زنجیره انتقال الکترونی زنان در مقایسه با مردان از تولید سطح کمتری از رادیکال‌های آزاد بهره می‌برد(۲۱). آنچه این عامل را در زنان متمایز از مردان می‌سازد هورمون استروژن می‌باشد. چنانچه گزارش شده است هورمون استروژن مانع از فعالیت بیشتر NADPH-oxidase در زنان شده و از تولید بیشتر رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌نماید(۲۲). در کنار این یافته این نکته حائز اهمیت است که در افزایش سطح MDA در ساعات بعد از فعالیت (ریکاوری)، نقش آسیب غشای پلاسمایی نیز بسیار مهم به نظر می‌رسد. همانطور که گزارش شد رادیکال‌های آزاد باعث آسیب غشای پلاسمایی می‌گردند. در نتیجه یکی از عوامل افزایش MDA در مرحله ریکاوری را احتمالاً می‌توان به نشت آن از غشای پلاسمایی و ورود تدریجی به خون دانست(۲۳).

با این حال مطالعات نشان می‌دهد که عوامل اکسیدانی باعث ایجاد پاسخ‌های متعددی در سلول‌ها می‌گردد. به عبارتی دیگر سلول‌ها و بافت‌های انسانی از طریق افزایش فعالیت و یا mRNA آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به شرایط استرس اکسیداتیو پاسخ داده و یا با آن سازگاری یافته‌اند(۲۴). یافته‌های پژوهش حاضر نیز مؤید آن بود که بیان ژنی کاتالاز بعد از فعالیت با افزایش معنی‌داری همراه بوده است. از این رو شدت آسیب‌های به وجود آمده از سوی شاخص‌های اکسیدانی در زنان تمرین کرده در کمترین حد قرار دارد. با این حال چنانچه پیشتر نیز گفته شد کاتالاز حساسیت زیادی به افزایش پراکسید هیدروژن نشان می‌دهد. در حالی که در تحقیق حاضر بین سطح mRNA کاتالاز و افزایش سطح MDA که شکل تغییر یافته پراکسید هیدروژن می‌باشد، ارتباط معنی‌داری گزارش نشد. در این خصوص می‌توان گفت که احتمالاً کاتالاز به شکل معمول پراکسید هیدروژن (یعنی H_2O_2) تا نسبت نوع تغییر شکل یافته آن (یعنی MDA) واکنش زیادی نشان می‌دهد و یا اینکه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

دستگاه ایمنی در افراد ورزشکار به دلیل سازگاری با شاخص‌های اکسیدانی، بیشتر از طریق فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تا از طریق mRNA آنها به آنها پاسخ می‌دهند(۲۵). لذا در نظر گرفتن سطح آمادگی جسمانی افراد نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. محققین به نتایجی دست یافته‌اند که نشان می‌دهد مردان تمرین نکرده در اثر فعالیت ورزشی هوازی به تولید بیشتری از رادیکال‌های آزاد در مقایسه با مردان ورزشکار دست می‌یابند. در نتیجه دستگاه دفاعی آنان برای مقابله با این شرایط بیان ژنی آنزیم‌های آنتی اکسیدان را افزایش می‌دهد(۲۶). در حالی که در مردان ورزشکار به دلیل سازگاری به دست آمده، با وجود افزایش سطح رادیکال‌های آزاد، بیان ژنی آنزیم آنتی‌اکسیدان چندان تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و این افراد بیشتر از طریق فعالیت آنزیم‌های مورد نظر با این شرایط مقابله می‌نمایند(۲۷). در تحقیق حاضر نیز بین تغییرات TAS و MDA در دختران ورزشکار ارتباط معنی‌داری گزارش گردید. به طوری که تغییرات این شاخص اکسیدانی باعث ایجاد تغییراتی فزاینده در سطح TAS شد و این افراد فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش دادند.

با این حال حساسیت کاتالاز به سایر رادیکال‌های آزاد و اثر هورمون استروژن نیز عوامل مهمی به نظر می‌رسند. به طوری که Min و همکاران به نتایجی دست یافتند که نشان می‌داد ROS در mRNA کاتالاز نقش مؤثری دارد و موجب افزایش معنی‌داری در بیان ژنی کاتالاز می‌شود(۲۸). بنابراین این نوع شاخص اکسیدانی نیز در بیان ژنی کاتالاز عامل بسیار مؤثری است. علاوه بر این به نظر می‌رسد هورمون استروژن حتی در شرایطی که زنان تمرین کرده به فعالیت بدنی سازگاری یافته‌اند، درصدد بر می‌آید همچنان بیان ژنی آنزیم مورد نظر را تا حد امکان افزایش دهد تا کمترین آسیب ممکن به سلول وارد شود(۲۹). همچنان که گزارش شد سلول‌های ایمنی محتوی گیرنده ERb می‌باشند که mRNA و فعالیت کاتالاز را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. در شرایط استرس اکسیداتیو هورمون استروژن از طریق این گیرنده، فعالیت MAP kinas را افزایش می‌دهد. MAP کیناز نیز به نوبه خود از طریق افزایش فعالیت NF-KB باعث افزایش بیان ژنی کاتالاز می‌گردد(۳۰).

در مجموع از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که تست ورزشی GXT باعث افزایش معنی‌داری در mRNA کاتالاز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و نیز افزایش سطح MDA در زنان تمرین کرده می‌شود، اما این افراد بیشتر از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدان به MDA پاسخ می‌دهند. علاوه بر این، بیان ژنی کاتالاز در این افراد تحت تأثیر عوامل متعدد قرار می‌گیرد که نقش سایر رادیکال‌های آزاد و نیز هورمون استروژن از آن جمله هستند. با این حال به نظر می‌رسد به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز باشد تا به نتایج قطعی‌تری در این مورد دست یافت.

در پژوهش حاضر فعالیت کاتالاز و سطح سایر رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار نگرفته است که پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی مورد توجه محققین قرار گیرد.

References:

1- Valado A, Pereira L, Tavares PC, Ribeiro CF. ***Effect of the intense anaerobic exercise on nitric oxide and malondialdehyde in studies of oxidative stress.*** Int J Biol Biomed Engineer 2007; (78): 2-4.

2- Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. ***Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocininduced diabetic rats.*** Mol Cell Biochem 2003; 243(1-2): 147-52.

3- Fukai T. ***Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease***. Online Eur Society Cardiol 2010; (12): 1755-3245

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

4- 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(6): 2032-6.

5- Dugan LL, Choi DW. ***Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes.*** Ann Neurol 1994; 35 Suppl: S17-21.

6- Iharaa Y, Hayabaraa T, Sasaki K, Fujisawa Y, Kawada R, Yamamoto T, et al. ***Free radicals and superoxide dismutase in blood of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia.*** J Neurol Sci; 1997; 153(1): 76-81.

7- Güzel NA, Erbas D, Hazar S. ***Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males.*** J Sports Sci Med 2007; 6(4): 6417-22.

8- Fisher G, Schwartz DD, Quindry JC, Barberio MD, Foster EB. ***Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise***. J Appl Physiol 2011; 110(3): 730-7.

*9-*Yano T, Yunoki T, Matsuura R, Arimitus T, Kimura T. ***Excessive oxygen uptake during exercise and recovery in heavy exercise***. Physiol Res 2007; 56(6): 721-5.

10- Kirkman HN, Gaetani GF. ***Mamalian catalase : a venereable enzymes with new mysteries*** . Trends Biochem Sci Trends Bichem Sci 2007; 32(1): 44-50.

11- Kivlighan KT, Granger DA, Booth A. ***Gender differences in testosterone and cortisol response to competition.*** Psychoneuroendocrinology 2005; 30(1): 58-71.

12- Engström BE, Karlsson FA, Wide L. ***Gender differences in diurnal growth hormone and epinephrine values in young adults during ambulation.*** Clin Chem 1999; 45(8 pt 1): 1235-9.

13- Tiidus PM. ***Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation, and oxidative stress.*** Can J Appl Physiol 2000; 25(4): 274-87.

14- Borras C, Gambini J, Vina J. ***Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males.*** Front Biosci 2007; 12: 1008-13.

15- Jaiswar SP, Sachan R, Singh RK, Agarwal M. ***Free radicals in female infertility.*** J Obstet Gynecol India 2006; 56(1): 64-7.

16- Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, et al. ***Androgen and estrogen recep- tors in splenic T lymphocytes: effect of flutamide and trauma-hemorrhage.*** Shock 2000; 14(4): 465-70.

17- Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. ***Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle.*** PLoS ONE 2010; 5(4): e10164.

18- Pepe H, Balcı SS, Revan S, Akalin PP, Kurtoglu F. ***Comparison of oxidative stress and antioxidant capacity before and after running exercises in both sexes.*** Gend Med 2009; 6(4): 578-95.

19- Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Guix P, Tur JA, Pons A. ***Diferent effects of exercise tests on the antioxidant enzymeactivities in lymphocytes and neutrophils.*** J Nutr Biochem 2004; 15(8): 479-84.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

20- Eskes T, Haanen C. ***Why do women live longer than men.*** Eur J Obstet Gynecol Reproduct Biol 2007; 133(2): 126-33.

21- Ji LL. ***Antioxidants and oxidative stress in exercise.*** Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222(3): 283-92.

22- Brooks SV, Vasilaki A, Larkin LM, McArdle A, Jackson MJ. ***Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor κB activation.*** J Physiol 2008; 586(16): 3979-90.

23- Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HA, Sobey CG. ***Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation role of estrogen.*** Stroke 2007; 38(7): 2142-9.

24- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. ***Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history.*** Dyn Med 2009; 8: 1-25.

25- Gomez-Cabrera MC, Borras C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. ***Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats.*** J. Physiol 2005; 567 (pt 1): 113-20.

26- Córdova A, Sureda A, Tur JA, Pons A. ***Immune response to exercise in elite sportsmen during the competitive season.*** J Physiol Biochem 2010; 66(1): 1-6.

27- de Castro MAC, Cavalcanti Neto FF, Lima LMC, Silva FM, Oliveira RJ, Zanesco A. ***Production of free radicals and catalase activity during acute exercise training in young men.*** Biol Sport 2009; 26(2): 113-18.

28- Min JY, Lim SO, Jung G. ***Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter.*** FEBS Lett 2010; 584(11): 2427-32.

29- Thompson D, Basu-Modak S, Gordon M, Poore S, Markovitch D, Tyrrell RM. ***Exercise-induced expression of heme oxygenase-1 in human lymphocytes.*** Free Radic Res 2005; 39(1): 63-9.

30- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. ***Moderate exercise is an antioxidant Upregulation of antioxidant genes by training.*** Free Radical Biology & Medicine 2008; 44(2): 126-31.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

Catalase Enzyme Gene Expression and Oxidant Markers' Levels in Trained Women: Effect of Incremental Exercise

Tartibian B(PhD) [*1], Baghaiee B(MA)[2], Baradaran B(PhD)[3]

[1,2]Department of Exercise Physiology, Urmia University, Urmia, Iran
[3]Department of Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 4 Jan 2012 ***Accepted:*** 10 Jan 2013

Abstract

Introduction: There are few studies regarding the field of catalase gene expression, antioxidant and oxidant response in trained women, thus these markers' levels have not been designated within Iranian trained women specially in regard to incremental exercise. Therefore, this study aimed to investigate Catalase enzyme Gene expression and oxidant levels in trained women.

Methods: A repeated measure design was used for this study. Fourteen trained young women in the age range of 23-25 years from urmia city were volunteered as subjects. Venous blood samples were taken in three stages, before GXT exercise test (graduate exercise test) (speed: 7/5 mile, slope grade: 6%, exercise time: 30 minutes), immediately and 3 hours after exercise. Real time PCR method was used for analysis of the mRNA of Catalase gene expression and the eutoanalyzer method was also applied for measurement of MDA activity.

Results: MDA (Malondealdeide) levels increased immediately and 3 h after exercise, though it proved to be statistically significant only in recovery stage (3 h after exercise) (P<0/002). Catalase gene expression significantly increased after exercise, but this difference wasn't significant in recovery stage (P<0/03). Also, TAS (total antioxidant status) concentration increase was significant after training exercise (P<0/031), though it reduced in 3h after exercise (P>0/065).

Conclusion: Incremental exercise test has increased catalase gene expression and antioxidant and free radicals levels in trained women.

Keywords: Catalase; Gene expression; Trained women

This paper should be cited as:
Tartibian B, Baghaiee B, Baradaran B. ***Catalase enzyme gene expression and oxidant markers' levels in trained women: effect of incremental exercise***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 20(6): 778-88.

Corresponding author: Tel: +98 9126090551, Email: b.tartibian@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]