

ارتباط بیان ژن سوپراکسیداز دیسموتاز ۱ با آنزیم لاکتات دهیدروژناز و رادیکال‌های آزاد در زنان ورزشکار: اثر تمرین شدت فزاینده

چکیده

بهزاد برادران^۱، بختیار ترتیبیان^۲،
بهروز بقایی^{۲*}، امیر منفردان^۳

۱- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه علوم آزمایشگاهی و میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دانشکده پزشکی، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.
تلفن: ۰۹۱۴-۹۲۶۵۵۶۸
E-mail: behrouz_phsport@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱۷

زمینه و هدف: آنزیم‌های التهابی و رادیکال‌های آزاد از جمله عوامل موثر بر دستگاه ایمنی هستند اما در مورد این که این عوامل تا چه اندازه‌ای بیان ژنی سوپراکسیداز دیسموتاز ۱ (SOD-1) را در زنان ورزشکار و به خصوص در تمرینات شدید تحت تاثیر قرار می‌دهند، اطلاع دقیقی در دست نیست. هدف از تحقیق حاضر بررسی ارتباط بیان ژن سوپراکسیداز دیسموتاز ۱ با آنزیم لاکتات دهیدروژناز و رادیکال‌های آزاد در زنان ورزشکار با تمرینات شدید می‌باشد. **روش بررسی:** ۱۵ زن ورزشکار شهر ارومیه (۲۴-۲۲ سال) به طور داوطلبانه و پس از اخذ رضایت‌نامه (در سال ۱۳۸۹) در تحقیق حاضر شرکت کردند. در سه وضعیت پایه، پس از انجام آزمون ورزشی (سرعت: ۱۲ کیلومتر بر ساعت، شیب: پنج درجه، زمان: ۲۰ دقیقه) و سه ساعت بعد از آن (ریکاوری)، خون‌گیری از ورید بازویی به عمل آمد. برای اندازه‌گیری mRNA آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز ۱ (SOD-1) از روش Real time-PCR و برای H2O2 و لاکتات دهیدروژناز از Eutoanalyzer استفاده شد.

یافته‌ها: سطح LDH در هر دو مرحله (بعد از فعالیت و ریکاوری) افزایش معنی‌داری داشت ($P=0/009$ و $P=0/026$) اما غلظت H2O2 فقط در مرحله ریکاوری افزایش معنی‌داری یافت ($P=0/002$) غلظت mRNA آنزیم SOD-1 نیز در هیچ یک از مراحل فعالیت افزایش معنی‌داری دیده نشد ($P=0/05$). هم‌چنین از لحاظ آماری فقط ارتباط بین mRNA آنزیم SOD-1 و تغییرات H2O2 معنی‌داری گزارش شد ($P=0/014$).

نتیجه‌گیری: فعالیت شدت فزاینده باعث افزایش سطح H2O2 و LDH در زنان ورزشکار می‌شود، اما از بین آن‌ها تنها افزایش رادیکال‌های آزاد بر بیان ژن SOD-1 تاثیر معنی‌داری دارد.

کلمات کلیدی: سوپراکسیداز دیسموتاز ۱، لاکتات دهیدروژناز، پراکسید هیدروژن، زنان، ورزش.

مقدمه

طریق واکنش با غشای پلاسمایی و دیگر قسمت‌های سلول هدف منجر به صدماتی در آن می‌گردد.^{۳-۵} به نظر می‌رسد سوخت و ساز مواد غذایی و افزایش اکسیژن مصرفی با افزایش رادیکال‌های آزادی هم‌چون Reactive Oxygen Species (ROS) و O2- و H2O2 (Hydrogen Peroxide) همراه می‌باشد، که در فعالیت‌های ورزشی به دلیل افزایش اکسیژن در دسترس احتمالاً این فرایند دور از انتظار نباشد.^۶ در همین ارتباط Tauler گزارش کرد که با افزایش حضور اکسیژن، سطح پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد که این فرایند،

رادیکال‌های آزاد (Free radicals) اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که باعث بروز آسیب‌های مختلف از جمله آسیب غشای پلاسمایی، آسیب DNA، کاهش ایمنی بدن، عفونت، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های مفصلی و حتی بیماری‌های روحی - روانی می‌شوند.^{۱،۲} پراکسید هیدروژن (H2O2) نیز به عنوان یک رادیکال آزاد، در ایجاد چنین شرایطی نقش مهمی را ایفا می‌کند. این آنزیم از

رادیکال‌های آزاد، به‌خصوص در تمرینات شدت فزاینده چندان مورد بررسی قرار نگرفته است و اطلاع دقیقی در دست نیست که این شاخص‌ها تا چه اندازه بیان‌کننده SOD-1 را تحت تاثیر قرار می‌دهند، از این رو هدف تحقیق حاضر، بررسی ارتباط بیان‌کننده SOD-1 از این رویتوپلاسمی با LDH و سطح H₂O₂ در زنان ورزشکار می‌باشد.

روش بررسی

تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه‌گیری‌های متعدد می‌باشد که در آن ۱۵ آزمودنی زن ورزشکار شهر ارومیه در سال ۱۳۸۹ در دامنه سنی ۲۲-۲۴ سال داوطلب شرکت در تحقیق شدند. آزمودنی‌ها در خصوص اهداف تحقیق، شرایط شرکت در آزمون و مراحل مختلف آن توجیه شده و به منظور آگاهی از وضعیت تندرستی آنان، پرسش‌نامه تندرستی را تکمیل نمودند و هم‌چنین جهت شرکت در تحقیق رضایت‌نامه از آنان اخذ گردید. تمام آزمودنی‌ها از نظر دوره قاعدگی در مرحله پیش از این دوره قرار داشتند. ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها شامل قد (متر)، وزن (کیلوگرم)، شاخص توده بدنی kg/m^2 (Body Mass Index (BMI)، درصد چربی، فشارخون استراحت (میلی‌متر جیوه) و ضربان قلب استراحت (ضربان/ دقیقه) نیز اندازه‌گیری شد. در شرایط پایه و ناشتا به منظور بررسی غلظت پایه بیان‌کننده SOD-1 و هم‌چنین مقدار H₂O₂ و LDH به مقدار ۴ml خون وریدی جمع‌آوری شد. ۲ml از این خود در لوله فالكون ۵۰ میلی‌لیتری (RNase Free & DNase Free (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) محتوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد و ۲ml دیگر در لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. لوله فالكون‌های محتوی خون در دمای ۴°C نگه‌داری شدند تا در آزمایشگاه سایر فرایندهای تحلیل را طی نماید.

فعالیت ورزشی فزاینده: آزمون ورزشی فزاینده به این صورت اجرا شد که آزمودنی‌ها ابتدا به مدت سه دقیقه روی حداقل شیب دستگاه نوارگردان (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 پنج درجه و سرعت ۷/۵ مایل در ساعت رسید و آزمودنی‌ها ۲۰ دقیقه فعالیت مورد نظر را انجام دادند. لازم به ذکر است که اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک، اجرا

موجب افزایش رهاسازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از دستگاه ایمنی می‌گردد.^۶ این آنزیم‌ها از طریق کاهش انرژی و یا جلوگیری از شکل‌گیری اولیه واکنش‌های اکسیداتیو، سطح رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهند.^۷ آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز نوع Cu/Zn یا SOD-1 از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که از لئوسیت‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود.^۸ SOD-1 نقش برجسته‌ای را در جلوگیری از ایجاد آسیب‌های رادیکال‌های آزاد و بسیاری از بیماری‌ها همانند سرطان در افراد مختلف به‌ویژه در افراد ورزشکار بر عهده دارد،^۹ بنابراین فعالیت SOD-1 تحت تاثیر فعالیت‌های بدنی و سطح آمادگی افراد نیز قرار می‌گیرد که بر حسب نوع فعالیت و یا ورزشکار بودن ممکن است فعالیت این آنزیم متفاوت باشد، به‌طوری‌که فعالیت این آنزیم در افراد تمرین کرده نسبت به افرادی که از تحرک کم‌تری برخوردارند بیش‌تر گزارش شده است. چنان‌چه در مطالعه Cases گزارش شده است که تمرینات ورزشی، بیان‌کننده SOD-1 را در دوچرخه سواران حرفه‌ای در اثر فعالیت‌های شدید به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد،^{۱۰} که این با یافته‌های Sureda و Córdova مبنی بر این‌که فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی تحت تاثیر شدت فعالیت قرار می‌گیرد و با افزایش شدت فعالیت بدنی به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز سیتوپلاسمی نیز افزایش معنی‌داری می‌یابد، هم‌خوانی داشت،^{۱۱،۱۲} لیکن اندازه تاثیر رادیکال‌های آزاد بر فعالیت یا بیان‌کننده SOD-1 مشخص نشده است. از طرفی دیگر بررسی‌ها مویده آن است که آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase (LDH) در اثر فعالیت‌های ورزشی قابلیت افزایش تولید دارد، به‌طوری‌که این آنزیم علاوه بر فعالیت در روند تولید انرژی و لاکتات، در ایجاد شرایط التهابی برای سلول‌های عضلانی نیز نقش موثری دارد.^{۱۳،۱۴} از این‌رو برخی از محققین افزایش سطح LDH در اثر فعالیت‌های بدنی را ناشی از آسیب غشای فیبرهای عضلانی گزارش کرده‌اند.^{۱۵} با این حال مشخص نشده است که این آنزیم تا چه اندازه در بیان‌کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مخصوصاً SOD-1 تاثیرگذار می‌باشد. چنان‌چه برخی از مطالعات نیز نشان می‌دهد که زنان از سطح بیش‌تری از آنزیم LDH بهره می‌برند.^{۱۶} در مجموع بررسی پژوهش‌ها و مطالعه‌ها موجود نشان‌دهنده آن است که ارتباط بیان‌کننده SOD-1 در زنان ورزشکار با شاخص‌های التهابی و

۱ μl DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ ml از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰ °C قرار گرفت. به تیوب مربوطه ۱۱ μl Random hexamer oligi (dt) Primer و DEPC-treated water (۱ μl) Primer (Fermentas., Canada) افزوده شد و پنج دقیقه در دمای ۷۰ °C بر روی Dry block انکوبه گردید.

۲ μl 10mM mix dNTP و ۴ μl 5X Reaction buffer (۱ μl Fermentas., Ribolock ribonuclease transcription inhibitor) به تیوب افزوده شد و پس از سانتیفریژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ °C انکوبه گردید.

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

Real-time PCR: برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی SOD-1 از دستگاه مربوطه (Corbett., Research 6000 Corbett- Rotor gene- Australia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار 3 Primer طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۸۰ nm مورد استفاده قرار گرفتند.

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. در جدول ۱ توالی پرایمرهای بیان ژنی در زنان ورزشکار در پاسخ به فعالیت فزاینده 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 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 تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، Ct of target gene- Ct of β-actin (ΔCt) gene ژن در هر نمونه از افتراق Cycle Threshold (Ct) مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد.

روش آزمایشگاهی اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: اساس روش اندازه‌گیری H2O2 سرمی بر پایه واکنش با تیوباربتوریک اسید (Thiobarbituric Acid (TBA)، استخراج با بوتانل (Pars azmoon., Iran) نرمال، اندازه‌گیری جذب با استفاده از Eutoanalyzer (Roche.,

فعالیت ورزشی و جمع‌آوری نمونه‌های خونی در پایگاه قهرمانی تختی شهر ارومیه انجام شد). پس از اتمام فعالیت ورزشی و سه ساعت بعد از آن، مجدداً به مقدار ۴ ml خون‌گیری دوم و سوم به عمل آمد، تمام نمونه‌های خونی در مدت زمان دو ساعت (در دمای ۴ °C) به آزمایشگاه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال یافت. نحوه محاسبه (Volume Oxygen Maximum (V02max) حداکثر اکسیژن مصرفی) (این فرمول به زنان اختصاص دارد):^{۱۷}

حداکثر اکسیژن مصرفی:

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

روش آزمایشگاهی بیان ژنی SOD-1: جداسازی RNA:

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

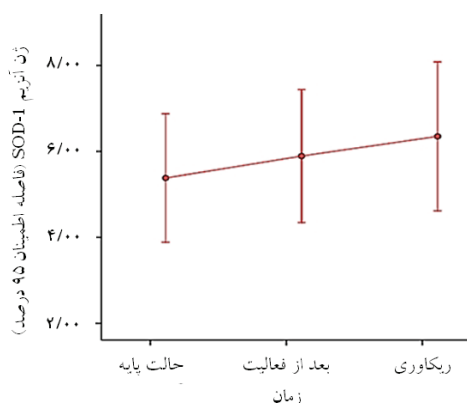
۵ ml خون محیطی در ضد انعقاد EDTA گرفته شد و با استفاده از کلرید آمونیوم RBC های آن لیز شده، و به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ °C و ۶۰۰ g سانتیفریژ گردید. سپس مایع رویی آسپیره شده، سلول‌ها با یک میلی‌لیتر PBS سرد شستشو داده شدند. سپس به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری DNase free و RNase free منتقل شدند در مرحله بعد یک میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS به ازای ۶ × ۱۰^۶ سلول به میکروتیوب افزوده شد و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به هر میکروتیوب ۲۰۰ μl کلروفرم افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ °C و ۱۵۰۰۰ g سانتیفریژ گردید. به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز رویی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شد و به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه گردید. ۱۵۰۰۰ g و ۴ °C سانتیفریژ شد، مایع رویی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به میکروتیوب اضافه گردید.

به هر میکروتیوب ۲۰ μl DEPC-treated eater افزوده شده و برای ادامه مراحل در فریزر ۷۰ °C - نگه‌داری گردید.

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

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

بلافاصله بعد از فعالیت با افزایش معنی‌داری همراه نبود ($P=0/255$) لیکن سه ساعت بعد از تمرین شدت فزاینده سطح این شاخص خونی افزایش معنی‌داری یافت ($P=0/002$)، (جدول ۳). سطح mRNA آنزیم SOD-1 بلافاصله بعد از فعالیت و سه ساعت بعد از آن تا حدی افزایش یافت اما با بررسی‌های آماری مشخص شد که این تغییرات معنی‌دار نبوده است ($P=0/99$) (نمودار ۱). هم‌چنین آزمون آماری Mixed Regression Models نشان داد که بین تغییرات آنزیم SOD-1 و H2O2 در طول مراحل فعالیت ارتباط معنی‌داری وجود دارد و به ازای هر یک واحد افزایش در سطح H2O2، بیان ژنی SOD-1 ۲/۹



نمودار- ۱: بیان ژنی آنزیم SOD-1 در مراحل مختلف فعالیت

جدول- ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در بیان ژنی SOD-1

H SOD-1 Forward	5'-AAGCCGTGTGCGTGCTGAA-3'
H SOD-1Reverse	5'-CAAGTCTCCAACATGCCTCT-3'
H β -actin Forward	5'-CAGGTCATCACCATTTGGCAAT-3'
H β -actin Reverse	5'-TCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

جدول- ۲: ویژگی‌های فیزیولوژیکی زنان ورزشکار

متغیر	Mean± SD
سن (سال)	۲۳±۱
قد (cm)	۱۶۰/۸±۴/۳۴
وزن (kg)	۵۳/۱±۵/۸۷
Vo2max (ml/kg/min)	۵۲/۶±۱/۸۳
BMI (kg/m ²)	۲۰/۵۱±۱/۶۱

VO₂ Max=Volume Oxygen Maximum, BMI=Body Mass Index

(COBAS-MIRA plus (Germany) و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می‌باشد. اندازه‌گیری H2O2 با حل کردن ۵۰۰ میکرولیتر سرم در ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک (Merck., Germany) ۱٪ آغاز می‌گردد. پس از ورتکس کردن به میزان ۱ml محلول تیوباریتوریک 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 می‌شود. پس از اتمام مدت لازم لوله‌های آزمایش را زیر آب سرد خنک کرده، به میزان ۲ml بوتانل نرمال اضافه نموده و به مدت یک الی دو دقیقه ورتکس نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm سانتیفیوژ 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 H2O2 سرمی نمونه‌ها حاصل پس از انتقال به منحنی استاندارد (۱ و ۱ و ۳ و ۳ و ۳ تترامتوکسی پروپان (C7H16O4) در شش غلظت مختلف ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ نانومول در میلی‌لیتر با استفاده از حل کردن در آب دیونیزه تهیه و جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت)، غلظت H2O2 سرمی نمونه‌ها تعیین گردید.

روش آزمایشگاهی اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز: اندازه‌گیری سطح آنزیم LDH از Eutoanalyzer انجام گرفت. در تحقیق حاضر از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها و از روش آماری Mixed model شامل آزمون‌های تست تعقیبی Bonferroni برای مقایسه مراحل مختلف فعالیت با حالت پایه و آزمون Regression برای تعیین ارتباط داده‌ها $P \leq 0/05$ با استفاده نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸ و Excel 2010 استفاده گردید.

یافته‌ها

جدول ۲ ویژگی‌های فیزیولوژیکی زنان ورزشکار مشخص کرده است. جدول ۳ نیز که با استفاده از آنالیز آماری Mix Model (Bonferroni) انجام یافته است گویای آن است که سطح LDH بلافاصله بعد از فعالیت فزاینده در زنان ورزشکار افزایش معنی‌داری داشته است ($P=0/009$) که در مرحله ریکاوری با وجود اندکی کاهش، اما هم‌چنان در مقایسه با حالت پایه تفاوت آن معنی‌داری گزارش شد ($P=0/026$) (جدول ۳). با این حال غلظت H2O2

جدول-۳: تغییرات پراکسید هیدروژن و لاکتات دهیدروژناز در مراحل مختلف

فعالیت (مقایسه بعد از فعالیت با حالت پایه P_1 و مقایسه ریکاوری با حالت پایه P_2)

متغیر	Mean±SD	سطح معنی داری
H2O2 (μm)	۲/۵±۱/۲۴	حالت پایه
	۲/۸۴±۱/۳۸	بعد از فعالیت
LDH (μm)	۳/۰۴±۱/۱۶	ریکاوری
	۵۷۳±۱۱۵	حالت پایه
	۸۹۱±۲۱۳	بعد از فعالیت
	۸۴۷±۲۷۷	ریکاوری

آزمون آماری: Bonferroni test، مقادیر $P \leq 0.05$ معنی دار می‌باشد.

جدول-۴: ارتباط بین تغییرات پراکسید هیدروژن و لاکتات دهیدروژناز با

mRNA SOD-1		
P (فاصله اطمینان %۹۵)	متغیر	پاسخ
۰/۰۱۴	H ₂ O ₂	۲/۹ (۰/۶۶ به ۵/۱۴)
۰/۳۷۶	LDH	۰ (۰ به ۰/۰۱)

H2O2= Hydrogen Peroxide, LDH= Lactate Dehydrogenase, SOD-1= Superoxide Dismutase-1

آزمون آماری: Mixed Regression Models، مقادیر $P \leq 0.05$ معنی دار می‌باشد.

واحد افزایش یافت ($P=0.014$) (جدول ۴). اما بین بیان ژنی SOD-1 و غلظت LDH ارتباط معنی داری گزارش شد، به طوری که افزایش سطح LDH، هیچ تاثیری در بیان ژنی آنزیم SOD در زنان ورزشکار نداشت ($P=0.376$) (جدول ۴).

بحث

نتایج تحقیق نشان داد که تمرین شدت فزاینده غلظت H2O2 پلاسمایی را در زنان ورزشکار افزایش می‌دهد، به نظر می‌رسد افزایش اکسیژن مصرفی و افزایش آسیب‌های عضلانی در این روند موثر هستند. به طوری که برخی از مطالعات در ارتباط با افزایش غلظت H2O2 گزارش کرده‌اند که هر اندازه شدت فعالیت فزاینده‌تر باشد تولید و رهاسازی این رادیکال آزاد نیز افزایش بیش‌تری می‌یابد^{۱۲،۱۳} و نظر به این که رادیکال‌های آزاد از طریق آسیب غشای پلاسمایی و نفوذ در رگ‌های خونی در ایجاد شرایط استرس

اکسیداتیو در سایر بافت‌ها نیز موثر باشند، لذا احتمالاً افزایش سطح H2O2 در مرحله ریکاوری را می‌توان به این مورد نسبت دانست. از سوی دیگر ذکر این نکته حایز اهمیت خواهد بود که فعالیت‌های ورزشی منظم، غلظت رادیکال‌های آزاد را در افراد پرتحرک در حالت استراحت کاهش می‌دهد،^{۱۸} که بررسی سطوح استراحتی H2O2 زنان ورزشکار در تحقیق حاضر نیز این نکته را مشخص کرد. با وجود این، افزایش سطوح پلاسمایی H2O2 ممکن است تحت تاثیر شاخص‌های التهابی نیز قرار گیرد، به طوری که برخی از محققین به رابطه بین LDH و رادیکال‌های آزاد اشاره نموده‌اند و چنین گزارش شده است که افزایش آنزیم LDH نقش مهارگری در افزایش رادیکال‌های آزاد دارد.^{۱۹} چنانچه در یافته‌های ما نیز زمانی که سطح لاکتات دهیدروژناز با افزایش چشمگیری روبه‌رو بود، غلظت H2O2 با افزایش معنی دار همراه نشد و هم‌زمان با کاهش اندک در غلظت لاکتات دهیدروژناز در مرحله ریکاوری، H2O2 افزایش معنی داری یافت. با این حال افزایش رادیکال‌های آزاد و احتمالاً آنزیم LDH ممکن است باعث ایجاد تغییراتی در بیان ژنی آنزیم SOD-1 شود،^{۲۰} اما اندازه این ارتباط و تاثیرات از ارزش ایمونولوژیکی فراوانی برخوردار است که در تحقیقات گذشته به آن اشاره نشده است، لیکن جدول ۳ گویای آن است که بین بیان ژنی آنزیم SOD-1 و تغییرات سطح H2O2 در زنان ورزشکار ارتباط و تاثیر معنی داری وجود دارد، به طوری که mRNA آنزیم SOD-1 به ازای هر یک واحد افزایش در سطح H2O2، ۲/۹ واحد افزایش می‌یابد، اما آنزیم LDH باعث هیچ‌گونه تغییری در بیان ژنی SOD-1 نمی‌شود و بین دو نیز ارتباط معنی داری گزارش نشد. از این یافته‌ها می‌توان دریافت که آنزیم‌های التهابی همانند LDH در مکانیسم مولکولی این نوع از آنزیم آنتی‌اکسیدانی در زنان ورزشکار تاثیری نداشته و تنها عامل موثر رادیکال‌های آزاد هستند و لذا دستگاه دفاعی دختران ورزشکار برای مقابله با آثار آنزیم LDH، نمی‌تواند از آنزیم SOD-1 استفاده نماید. بنابراین احتمال وقوع آسیب‌های ناشی از LDH دور از انتظار نخواهد بود. علاوه بر این در بررسی نتایج این تحقیق با سایر مطالعه‌ها نیز می‌توان به نتایج مشابه و متناقضی برخورد کرد، به طوری که در بررسی‌های Cases گزارش شده است که فعالیت شدید ورزشی بیان ژنی آنزیم SOD-1 را در دوچرخه سواران حرفه‌ای افزایش داده است.^{۱۱} Lambertucci نیز گزارش کرد که غلظت mRNA آنزیم

افزایش بیش‌تری دهند، چنان‌چه افزایش فعالیت این آنزیم‌ها الزاماً به معنای افزایش بیان ژنی نیست.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و سایر تحقیق‌ها می‌توان گفت که افراد ورزشکار و به خصوص زنان از طریق افزایش سطح فعالیت آنزیم SOD-1 با رادیکال‌های آزاد مقابله می‌نمایند و بیان ژنی این آنزیم دچار افزایش معنی‌داری نمی‌گردد. از طرفی دیگر آنزیم‌های التهابی همانند LDH نیز در بیان ژنی این آنزیم در زنان ورزشکار هیچ تاثیری ندارند. در بررسی حاضر فعالیت SOD-1 اندازه‌گیری نشده است، که پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی مورد توجه محققین قرار گیرد. این مقاله بخشی از پایان‌نامه "اثر فعالیت شدید ورزشی بر بیان ژنی آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز سلول‌های لنفوسیتی در مردان و زنان فعال" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ و کد ۵۴۹-۲ الف می‌باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شد. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب سپاس خویش را از زنان ورزشکار شرکت‌کننده در این پژوهش اعلام می‌دارند.

SOD-1 متعاقب فعالیت‌های هوازی شدید در موش‌های مورد تحقیق افزایش داشته است.^{۲۱} اما Morikawa به یافته‌های مشابهی دست یافتند، این محقق گزارش نمود که سطح SOD-1 در بازیکنان حرفه‌ای فوتبال بعد از فعالیت نسبتاً شدید روی دستگاه نوار گردان افزایش معنی‌داری نداشته است.^{۲۲} تمامی این محققین (Lambertucci و Morikawa) مدت زمان اجرای فعالیت ورزشی و سطح آمادگی بدنی افراد شرکت‌کننده در تحقیق را از عوامل موثر بر بیان ژنی این آنزیم (SOD-1) گزارش کرده‌اند. اما بررسی Fisher دلایل بهتری را ارائه می‌نماید، این محققین در بررسی تاثیر فعالیت‌های ایستروال بر آزمودنی ورزشکار، گزارش کردند که بیان ژنی آنزیم SOD-1 تحت تاثیر این نوع از فعالیت افزایش معنی‌داری نمی‌یابد، لیکن فعالیت این آنزیم دچار افزایش معنی‌داری گردید. این محققین سازگاری سیستم ایمنی این افراد به رادیکال‌های آزاد را دلیل یافته‌های خود ذکر کرده‌اند.^{۲۳} لذا این احتمال وجود دارد که زنان ورزشکار نیز در پاسخ به افزایش H2O2 فعالیت آنزیم SOD-1 را در مقایسه با بیان ژنی آن

References

- Tohru F. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;55(2):239-49.
- Ihara Y, Hayabara 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.
- Nevin AG, Serkan H, Deniz E. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *J Sports Sci Med* 2007;6(1):417-22.
- Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001;8(7):829-38.
- Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003;243(1-2):147-52.
- Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodríguez-Marroyo JA, Villa G, et al. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* 2006;17(10):665-71.
- Marius-Daniel R, Stelian S, Dragomir C. The effect of acute physical exercise on the antioxidant status of the skeletal and cardiac muscle in the Wistar rat. *Romanian Biotechnol Lett* 2010;15(3):56-61.
- Chan PH. Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of CuZn-superoxide dismutase. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 2:S417-23.
- Kovaceva J, Pláteník J, Vejrazka M, Stípek S, Ardan T, Cejka C, et al. Differences in activities of antioxidant superoxide dismutase, glutathione peroxidase and prooxidant xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in the normal corneal epithelium of various mammals. *Physiol Res* 2007;56(1):105-12.
- Cases N, Sureda A, Maestre I, Tauler P, Aguiló A, Córdova A, et al. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. *Eur J Appl Physiol* 2006;98(3):263-9.
- Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Maestre I, Aguiló A, Córdova A, et al. Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion. *Free Radic Res* 2007;41(8):874-83.
- 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.
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
- Tanada S, Higuchi T, Nakamura T, Imaki M, Matsumoto K, Miyoshi T. Evaluation of exercise intensity indicated by serum lactate dehydrogenase activity in healthy adults. *Acta Biol Hung* 1993;44(2-3):153-60.
- Choung BY, Byun SJ, Suh JG, Kim TY. Extracellular superoxide dismutase tissue distribution and the patterns of superoxide dismutase mRNA expression following ultraviolet irradiation on mouse skin. *Exp Dermatol* 2004;13(11):691-9.
- Li SS, Hou EW. Estrogen-induced expression of mouse lactate dehydrogenase-A gene. *Cell Biol Int Rep* 1989;13(7):619-24.
- Tartibian B. Assessment of Physiological Index in Sport. Tehran: Teymourzade Press; 2006. p. 39-41. [Persian]
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009;8:1.

19. Bloomer RJ, Cole BJ. Relationship between blood lactate and oxidative stress biomarkers following acute exercise. *Open Sport Med J* 2009;3(1):44-8.
20. Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(13):5006-10.
21. 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. *Mech Ageing Dev* 2007;128(3):267-75.
22. 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(3): 187-194.
23. 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.

Correlation between superoxide dismutase 1 gene expression with lactate dehydrogenase enzyme and free radicals in female athletes: effects of incremental intensity exercises

Behzad Baradaran Ph.D.¹
Bakhtiar Tartibian Ph.D.²
Behrouz Baghaiee M.Sc.^{2*}
Amir Monfaredan M.Sc.³

1- Immunology Research Center,
Tabriz University of Medical
Sciences, Tabriz, Iran.

2- Department of Exercise
Physiology, Faculty of Physical
Education and Sport Sciences,
Urmia University, Urmia, Iran.

3- Department of Laboratory
Science and Microbiology, Faculty
of Medical Sciences, Tabriz Azad
Islamic University, Tabriz, Iran.

* Corresponding author: Department of
Exercise Physiology, Faculty of Physical
Education and Sport Sciences, Urmia
University, Sero St. Urmia, Iran.
Tel: +98- 914- 9265568
E-mail: behrouz_phsport@yahoo.com

Abstract

Received: January 29, 2012 Accepted: March 07, 2012

Background: Inflammatory enzymes and free radicals are important factors affecting the immune system. However, there seems to be no detailed information about the extent to which these factors can affect superoxide dismutase 1 gene expression in female athletes, especially in incremental exercises. Therefore, the aim of the present study was to investigate the correlation between superoxide dismutase 1 gene expression with lactate dehydrogenase (LDH) and free radicals in female athletes after an incremental intensity exercise.

Methods: Fifteen 22-24 year old female athletes from Urmia, Iran voluntarily participated in the study after completing an informed consent form in 2010. Venous blood samples were collected in three stages: prior to, immediately and 3 h after an incremental exercise (12 km/h at a 5% gradient for 20 min). Real-time PCR was used to assess superoxide dismutase 1 (SOD-1) gene expression as was an autoanalyzer for hydrogen peroxide (H₂O₂) and LDH concentrations.

Results: LDH concentration significantly increased in both stages of the exercise (immediately and 3 h after the exercise), (respectively, P=0.009 and P=0.026), but H₂O₂ concentration significantly increased only in the recovery phase (P=0.002). SOD-1 mRNA did not significantly increase in any stage of the exercise (P=0.05). Moreover, there was only a significant correlation between SOD-1 mRNA and H₂O₂ increase (P=0.014).

Conclusion: Incremental exercise increased H₂O₂ and LDH levels in female athletes but only free radicals had a significant effect on SOD-1 gene expression.

Keywords: athlete, female, hydrogen peroxide, lactate dehydrogenase, superoxide dismutase.