Archive of SID

علوم زیستی ورزشی _ تابستان ۱۳۹۱
شمارهٔ۱۳ – ص ص : ۲۰- ۵
تاریخ دریافت : ۲۳ / ۱۲ / ۸۹
تاریخ تصویب : ۳۰ /۰۴/ ۹۰

ریتم شبانه‌روزی مالون دی آلدئید و پروتئین کربونیل و سوپراکساید دسموتاز در مردان فعال غیرورزشکار

۱.جواد وکیلی[۱] -۲.عباسعلی گائینی – ۳. محمدرضا کردی – ۴. مهدی هدایتی
۱.استادیار دانشگاه تبریز،۲.استاد دانشگاه تهران،۳.دانشیار دانشگاه تهران،۴.استادیار پژوهشکده متابولیسم و غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

دربارهٔ ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، تحقیقات زیادی انجام نشده است و نتایج تحقیقات موجود در این زمینه نیز متناقض است. ازاین‌رو هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات شبانه‌روزی MDA، PC و SOD در مردان جوان غیرورزشکار است. روش تحقیق از نوع نیمه‌تجربی بود. به همین منظور، ۱۰ دانشجوی فعال غیرورزشکار با میانگین سنی ۲/۵۷± ۲۳/۲ سال، قد: ۶/۳۵±۱۷۴/۵ سانتی‌متر، وزن: ۴/۵±۶۵/۹ کیلوگرم از میان دانشجویان فعال و غیرورزشکار دانشگاه تبریز به‌صورت داوطلبانه انتخاب شدند و به مدت دو هفته برنامهٔ خواب - بیداری، غذایی و فعالیت بدنی را براساس برنامهٔ ارائه‌شده دنبال کردند. روز قبل از نمونه‌گیری همهٔ آزمودنی‌ها در آزمایشگاه حاضر شدند و شب را در شرایط تحت کنترل محقق سپری کردند. برنامهٔ غذایی و خواب - بیداری آنها قبل و در حین اجرای تحقیق به مدت ۴۸ ساعت توسط محقق کنترل شد. آزمودنی‌ها صبح ساعت ۸ از خواب بیدار می‌شدند و ساعت ۱۲ شب می‌خوابیدند و روزانه سه وعدهٔ غذایی اصلی یکسان را در ساعت ۸:۱۵ صبح، ۱۳:۳۰ ظهر و ۲۱:۳۰ شب می‌خوردند. نمونه‌گیری از آزمودنی‌ها از ساعت ۱۲ به مدت ۲۴ ساعت در فواصل زمانی ۴ ساعته (در ۶ زمان مختلف) به مقدار ۴ سی‌سی از ورید بازویی گرفته شد و برای بررسی مقادیر MDA، PC و SOD به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج تحلیل آماری با آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر ریتم شبانه‌روزی معناداری را در عامل MDA نشان داد (P=۰/۰۱۴). اما در دو عامل PC (P=۰/۸۰۸) و SOD (P=۰/۰۸۹) تغییرات معناداری مشاهده نشد، ولی در مقایسه زوج‌ها در عامل SOD بین برخی ساعات شبانه‌روز تفاوت معناداری مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد ارگانیسم در اوایل صبح بیشتر در معرض استرس اکسایشی قرار می‌گیرد. در نتیجه اجرای هرگونه فعالیت استرسی در زمان صبح باید با دقت صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی

مالون دی آلدئید، پروتئین کربونیل، سوپر اکساید دسموتاز، ریتم شبانه‌روزی، مردان فعال غیرورزشکار

۱- نویسندهٔ مسئول : تلفن : ۰۹۱۴۳۹۱۳۱۴۱ Email:vakili.tu@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اغلب فعل و انفعالات زندگی جانداران و از جمله انسان از ریتم‌های شبانه‌روزی مثل چرخه‌های استراحتی و فعالیت تبعیت می‌کنند. ریتم‌های شبانه روزی با چرخه‌های روشنایی/ تاریکی انجام می‌گیرند. این ریتم‌ها همچنین در شرایط ثابت مثل تاریکی / تاریکی، دوره‌های ۲۴ ساعته دارند که از طریق سازوکارهای درونی آغاز می‌شوند و به آن ساعت شبانه روزی[1] می‌گویند (۳). ریتم‌های شبانه‌روزی، نوسانات شبانه‌روزی در رفتار و فیزیولوژی‌اند که برای حفظ هموستاز در ارگانیسم ضروری هستند و از طریق سازوکارهای ژنتیکی مولکولی با عنوان ساعات سیرکادین تولید می‌شوند. این الگوی ریتمی از طریق ارتعاش‌سنج سیرکادین که در هستهٔ چلیپایی یا سوپرا کیاسماتیک[2] (SCN) هیپوتالاموس قرار گرفته است، تولید می‌شود. شواهد فراوانی نشان می-دهند هماهنگی شبانه‌روزی فعل و انفعالات فیزیولوژیکی و سلولی در سلامتی ارگانیسم تأثیرگذار است. در ضمن در مهار بیماری‌هایی مانند سرطان و پیری زودرس نیز نقش دارد (۱۱).

ساختار سیرکادین چرخه‌های فعالیتی/ استراحتی به تغییرات گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS[3]) اشاره دارد که به‌عنوان فراورده‌های جانبی تغییر در فعالیت بدنی و سرعت فرایندهای سوخت‌وسازی تولید می‌شوند (۱۳). گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنشی (ROS و RNS) به لحاظ شیمیایی اکسیژن و نیتروژن فعالی هستند که رادیکال‌های آزاد و مشتقات آنها را دارند. این گونه‌ها تنظیم‌کنندهٔ مهم سوخت‌وساز سلولی، بیان ژنی و پاسخ‌های مولکولی دیگرند. درنتیجه، نقش کلیدی در فرایندهای فیزیولوژیکی مانند تنظیم تون عروقی، کنترل تنفسی، پاسخ‌های التهابی و... دارند (۹). همزمان، غلظت‌های زیاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنشی مشتق از آنها برای ارگانیسم‌های زنده بسیار زیانبارند، زیرا آثار مخربی بر همهٔ ماکرومولکول‌های بیولوژیکی اصلی بدن دارند (۹).

برای جلوگیری از افزایش ROS، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون و برون‌سلولی، سلسله آنزیم‌های ضداکسایشی را بیان می‌کنند، تا بین وضعیت ردوکس تعادل ایجاد کنند و زمانی که دفاع آنتی‌اکسیدانی برای

1 . Circadian clock
2 . Suprachiasmatic nucleus
3 . Reactive oxygen spaces

www.SID.ir

Archive of SID

حفظ تعادل ردوکس ناتوان شود، مقادیر مازاد ROS موجب ایجاد استرس اکسایشی می‌شود (۹). مطالعات ریز مولکولی[1]، ریتم‌های شبانه‌روزی را در بیان برخی آنزیم‌های ضداکسایشی مانند کاتالاز، SOD، GST گزارش کرده‌اند (۱۱). آنها گزارش کرده‌اند که این ریتم‌ها از ارگانیسم در برابر مقادیر مازاد ROS و پیامد آن آسیب به ماکرومولکول‌های بیولوژیکی محافظت می‌کنند، ولی شواهد تجربی کمی از این فرضیه حمایت می‌کند (۴، ۹). اکسیدان‌ها ممکن است به‌صورت دوره‌ای تحت تأثیر عوامل درونی و بیرونی تولید شوند. در حیوانات مقدار زیادی (۲ تا ۵ درصد) اکسیژن تنفسی در میتوکندری به‌طور موقتی به رادیکال‌های آزاد تبدیل می‌شود که این رادیکال‌ها در بیشتر گونه‌ها و بافت‌ها تا فراتر از ۹۰ درصد گونه‌های اکسیژنی واکنشی را تشکیل می‌دهند (۴).

در سال‌های گذشته و به‌ویژه در یک دههٔ گذشته، تحقیقات گوناگونی دربارهٔ ROS و دفاع ضداکسایشی و تأثیر برنامه‌های تمرینی مختلف همراه با مصرف مکمل‌ها دربارهٔ آنها انجام گرفته است (۲۸). با وجود این، تحقیقات کمی دربارهٔ ریتم شبانه‌روزی ROS و سیستم ضداکسایشی انجام گرفته است. نتایج تحقیقات انجام گرفته روی نمونه‌های حیوانی، نشان داده است که فعالیت گلوتاتیون و گلوتاتیون اس - ترانسفراز کبدی در موش‌های صحرایی (۲۶)، فعالیت ROS در لکوسیت‌های ماهی‌ها (۷) و مقادیر SOX آنیون در کبوترها (۲۰) تغییرات شبانه‌روزی داشته و مقدار آنها در تاریکی کمترین مقدار و در روشنایی بیشترین مقدار بوده است. تحقیقات دربارهٔ ریتم‌های شبانه‌روزی اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌های انسانی نیز اندک است (۲، ۵، ۲۷). بریدگز[2] و همکاران تغییرات شبانه‌روزی رادیکال‌های آزاد را در ۱۰ مرد سالم بررسی کردند. در ۶ نمونه‌گیری خونی که در فواصل ۴ ساعته از ۱۲ ظهر تا ۸ صبح روز بعد انجام گرفت، نوسانات[3] TBARS و تیول‌های پلاسمایی (گلوتاتیون) و SOD با حضور رادیکال‌های آزاد گزارش شدند و TBARS و تیول‌های پلاسمایی ریتم شبانه‌روزی معناداری داشتند و هر دو در ساعت ۱۶ مقادیر اوج و در ساعت ۴ کمترین مقادیر را داشتند (۲). والنسیا[4] و همکاران (۲۰۰۱) نیز تغییرات گلوتاتیون (GSH) خون سه آزمودنی سالم با میانگین سنی ۴۰ سال را در تناوب‌های ۴ ساعته از ساعت ۱ صبح در یک شبانه‌روز بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مقادیر GSH در مراحل مختلف اندازه‌گیری تفاوت داشت و دو مقادیر اوج (بزرگ‌تر در ساعت ۹ و کوچک‌تر

1 . microarray
2 . Bridges
3 . tiobarbitoric acid reactive substance
4 . Valencia

www.SID.ir

Archive of SID

در ساعت ۲۱) و دو مقادیر حداقل در ساعات ۱۷ و ۱:۰۰ مشاهده شده است. هر چند به لحاظ آماری بین تغییرات شبانه‌روزی GSH تفاوت معناداری مشاهده نشد.

در سال ۲۰۰۶ نیز در تحقیقی، تغییرات شبانه‌روزی شاخص‌های استرس اکسایشی در مردان سالم و بیماران دیابتی نوع ۲ بررسی و در تناوب‌های ۳ ساعته، ظرف ۲۷ ساعت سرم خون و ادرار آزمودنی‌ها جمع‌آوری شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد که در افراد غیردیابتی، تغییرات شبانه‌روزی معناداری در ۸ هیدروکسی دی اکسی گوانوزین (8OHDG)، اسید اوریک و اکسید نیتریک مشاهده شد، ولی در عوامل مالون دی آلدئید (MDA) و ISA این تغییرات به لحاظ آماری معنادار نبود. اوج غلظت سه شاخص اکسایشی در ادرار همانند اسید نیتریک سرمی در ساعات اولیهٔ عصر در هر دو گروه رخ داد (۵).

همان‌طورکه از یافته‌های مذکور استنباط می‌شود، در اغلب تحقیقات، تولید رادیکال‌های آزاد و همچنین دفاع ضداکسایشی ریتم شبانه‌روزی دارند، اما در نتایج این تحقیقات همخوانی وجود نداشته است (۳). علت این مسئله ممکن است به محدود بودن تحقیقات در این زمینه و عدم کنترل برنامهٔ غذایی، چرخهٔ خواب- بیداری و فعالیت ورزشی آزمودنی‌ها در اوقات شبانه‌روز باشد. به‌علاوه، ساعات سیرکادین نقش مهمی در دفاع ارگانیسمی کارآمد در برابر ROS خارجی و حفظ تعادل بین تولید و دفع ROS خارجی دارد و می‌تواند بر رفتار و فیزیولوژی و ترشح برخی هورمون‌های بدن تأثیر بگذارد. بنابراین شناخت تغییرات شبانه‌روزی در شروع فعالیت‌های اکسایشی به لحاظ بالینی می‌تواند مهم باشد، زیرا زمانی‌که خطر زیادی وجود دارد، امکان اجرای مداخلات پیشگیرانهٔ درمانی فراهم می‌شود. ازاین‌رو هدف از این تحقیق بررسی تغییرات شبانه‌روزی برخی اکسیدان‌ها (MDA و PC) و آنتی‌اکسیدان‌ها (SOD) در مردان جوان غیرورزشکار است.

روش تحقیق

تحقیق حاضر از نوع نیمه‌تجربی است که در آن تأثیر زمان‌های مختلف شبانه‌روز بر مقادیر برخی اکسیدان‌ها بررسی شده است. جامعهٔ آماری پژوهش را دانشجویان دانشگاه‌های تبریز با میانگین سنی ۲۰ تا ۳۰ سال تشکیل می‌دادند که غیرسیگاری بوده و هیچ فعالیت ورزشی مستمر و منظم در شش ماه گذشته نداشته و از هیچ نوع

www.SID.ir

Archive of SID

مکمل، الکل یا درمان دارویی استفاده نمی‌کردند، به‌علاوه، در ۸ هفتهٔ گذشته مسافرت در عرض جغرافیایی نداشتند. با توجه به بررسی ریتم شبانه‌روزی، آزمودنی‌هایی واجد شرایط شرکت در تحقیق بودند که در این ۸ هفته، سه وعدهٔ غذایی در شبانه‌روز (صبحانه در ساعات بین ۷ تا ۹ صبح، ناهار در ساعات بین ۱۲ تا ۱۴ و شام بین ساعات ۲۰ تا ۲۲) می‌خوردند و ریتم خواب - بیداری منظمی داشتند و بین ساعات ۲۳ تا ۱ صبح به خواب می‌رفتند و بین ساعات ۷ تا ۹ صبح بیدار می‌شدند. از میان جامعهٔ آماری مذکور ۱۲ نفر به‌صورت داوطلبانه به‌عنوان نمونهٔ آماری تحقیق انتخاب شدند. به این صورت که ابتدا آگهی شرکت در تحقیق در محوطهٔ دانشگاه و تابلو اعلانات نصب شد، همچنین از طریق همکاران و آشنایان از افراد واجد شرایط دعوت به همکاری شد. در ضمن به اطلاع آزمودنی‌ها رسانده شد که در صورت شرکت در این طرح، تشویق مادی نیز می‌شوند. سپس از بین داوطلبان شرکت در تحقیق بعد از تکمیل پرسشنامهٔ سلامتی، ۱۲ نفر به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و رضایت‌نامه را تکمیل کردند. در ادامهٔ فرایند، دو آزمودنی از حضور در طرح انصراف دادند و ازاین‌رو تحقیق با ۱۰ نفر اجرا شد.

یک هفته قبل از خون‌گیری از آزمودنی‌ها خواسته شد در ساعات بین ۹ تا ۱۱ در محل آزمایشگاه تربیت بدنی دانشگاه حضور یابند و قد، وزن و درصد چربی بدن آزمودنی‌ها با استفاده از آزمون سه نقطه‌ای پولاک جکسون (۱۹۷۸) از سه ناحیهٔ سینه، شکم و ران اندازه‌گیری شد. در اندازه‌گیری درصد چربی از هر ناحیه دو بار تست درصد چربی گرفته می‌شد و در صورت اختلاف بیش از ۵ درصد، برای بار سوم نیز درصد چربی از همان نقطه گرفته می‌شد (جدول ۱).

جدول۱ - میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای سن، قد، وزن و در صد چربی (n=10)

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد	مقادیر حداقل	مقادیر حداکثر
سن (سال)	۲۳/۲	۲.۵۷	۲۰	۲۸
قد (سانتی‌متر)	۱۷۴/۵	۶.۳۵	۱۶۷.۵	۱۸۵.۵
وزن (کیلوگرم)	۶۵/۹	۴.۵	۵۶	۷۲
درصد چربی بدن	۹/۶۸	۳.۸۴	۵.۹۲	۱۶.۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل تغذیه و خواب آزمودنی

در این تحقیق بعد از انتخاب آزمودنی‌ها از جامعهٔ واجد شرایط اشاره‌شده برای شرکت در تحقیق، از آنها خواسته شد به مدت دو هفته برنامهٔ ارائه‌شده توسط محقق را دنبال کنند. آزمودنی‌ها موظف بودند روزانه سه وعدهٔ غذایی معمولی را در ساعات بین ۷:۳۰ تا ۸:۳۰ صبح، ۱۳ تا ۱۴ و ۲۱ تا ۲۲ مصرف کنند. به آزمودنی‌ها توصیه شد که برنامهٔ غذایی عادی و متعارف را مصرف کنند و از مصرف هرگونه مکمل، دارو یا مادهٔ غذایی که ترکیبات ناشناخته‌ای دارد، خودداری ورزند (۲۷). برای همسان‌سازی زمان خواب و بیداری در این دو هفته، از آزمودنی‌ها خواسته شد که برنامهٔ خواب و بیداری خود را با محقق هماهنگ کنند و بین ساعت ۷:۳۰ تا ۸ بیدار شوند و بین ۱۱:۳۰ تا ۱۲ چرخهٔ خاموشی را آغاز کنند (با توجه به اینکه این تحقیق در اواسط تابستان انجام گرفت ساعات خواب - بیداری و غذا خوردن نسبت به تحقیقات قبلی کمی تفاوت دارد). از روز قبل از شروع نمونه‌گیری نیز آزمودنی‌ها در مهمانسرای دانشگاه حضور یافتند و به مدت ۴۸ ساعت تغذیه و چرخهٔ خواب – بیداری آنها به‌دقت کنترل شد. برنامهٔ غذایی و چرخهٔ خواب - بیداری آزمودنی‌ها در این مدت در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامهٔ غذایی ارائه‌شده برای رعایت الگوی غذایی یکنواخت توسط آزمودنی‌ها بوده (۲) که مشابه برنامهٔ غذایی دیگر روزهای آزمودنی‌هاست.

جدول ۲ - برنامهٔ غذایی و چرخهٔ خواب - بیداری آزمودنی‌ها در ۴۸ ساعت حضور در آزمایشگاه

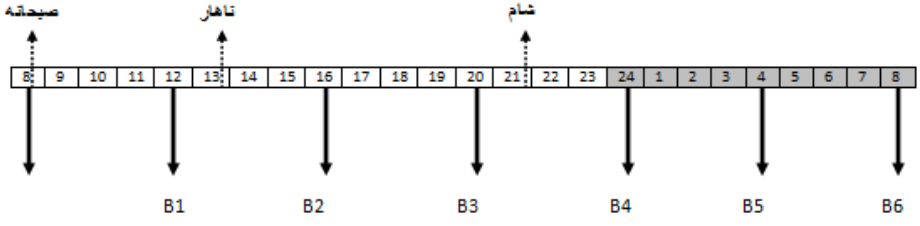
وعده‌های غذایی	چرخهٔ خواب	صرف غذا	ترکیبات
صبحانه	۸ بیدار شدن	۸:۱۵ تا ۸:۴۵	۵۰ گرم پنیرسفید ایرانی، نصف نان بربری یا یک قرص نان لواش، ۵۰ گرم انگور، یک استکان چای
میان وعده	-	۱۰ تا ۱۰:۱۵	معادل یک وعده غذایی خربزه یا سیب
ناهار	-	۱۳:۳۰ تا ۱۴	چلومرغ شامل ۱۲۵ گرم برنج و سینه یا ران به‌وزن ۲۰۰گرم، یک نوشابه، یک استکان چای
میان وعده	-	۱۹ تا ۱۹:۱۵	معادل یک وعدهٔ غذایی خربزه یا سیب
شام	۱۲:۱۵ خوابیدن	۲۱:۳۰ تا ۲۲	چلوکوبیده شامل ۱۲۵ گرم برنج و ۱۰۰ گرم گوشت گاو،یک نوشابه و یک استکان چای

www.SID.ir

Archive of SID

پروتکل اجرای تحقیق

در ابتدا هماهنگی‌های لازم با ارگان‌های مربوط برای اسکان شبانه‌روزی آزمودنی‌ها در مهمانسرای دانشگاه، خون‌گیری در ۶ زمان شبانه‌روز، تأمین ناهار و شام آزمودنی‌ها و در اختیار گرفتن فریزر ۲۰- درجه انجام گرفت. همهٔ آزمودنی‌ها از روز قبل از نمونه‌گیری در مهمانسرای دانشگاه حضور یافتند و وعدهٔ ناهار و شام استاندارد و یکسانی را مصرف کرده و شب را در شرایط تحت کنترل محقق سپری کردند. در روز خون‌گیری، آزمودنی‌ها فعالیت‌های روزمرهٔ خود را انجام دادند و از آنها خواسته شد که از اجرای فعالیت‌های سنگین و استرس‌زا خودداری کنند. آزمودنی‌ها در ساعت ۱۱:۵۰ دقیقه در محل آزمایشگاه حاضر شدند و نمونه‌های خونی توسط متخصص خون‌گیری از ورید بازویی به مقدار ۴ سی‌سی گرفته شد. خون‌گیری از آزمودنی‌ها در فواصل زمانی ۴ ساعته طی شبانه‌روز (شش بار) از ساعت ۱۲:۰۰ تا ساعت ۸:۰۰ روز بعد گرفته شد. زمان‌های خون‌گیری عبارت بود از: ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۴ و ۸. در فواصل زمانی بین ۸:۰۰ تا ۲۴:۰۰، آزمودنی‌ها بعد از ساعت ۲۴ می‌خوابیدند و در ساعت ۴:۰۰ برای خون‌گیری لحظه‌ای از خواب بیدار می‌شدند و بعد از خون‌گیری دوباره می‌خوابیدند (شکل ۱).



شکل ۱ - طرح شماتیک پروتکل چرخهٔ شبانه‌روزی

B: زمان خون‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری ضربان قلب استراحتی و فشار خون

ضربان قلب استراحتی و فشار خون متوسط سرخرگی آزمودنی‌ها بلافاصله قبل از خون‌گیری و از دست غیربرتر و با استفاده از فشارسنج بیورر[1] اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه خون‌گیری در فواصل ۴ ساعته در ۲۴ ساعت طی ساعات ۱۲، ۱۶،۲۰، ۲۴، ۴، ۸ به‌عمل آمد، در زمان روشنایی آزمودنی‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی صندلی به حالت ریلکس نشستند و سپس ضربان قلب و فشار متوسط سرخرگی آنها اندازه‌گیری شد تا در مقایسه با زمان تاریکی نیز بدن در حالت آرامش قرار داشته باشد.

شرایط و نحوهٔ خون‌گیری

در این تحقیق آزمودنی‌ها فعالیت معمول روزانه و استراحت شبانه را داشتند و برای خون‌گیری به مدت ۱۰ دقیقه روی صندلی نشستند و در شش زمان (در هر زمان ۴ میلی‌لیتر) خون از ورید بازویی دست چپ آزمودنی-ها گرفته شد. خون اخذشده در لوله‌های حاوی ضدانعقاد (EDTA 3mg/ml) ریخته شد و سپس به‌آرامی با ضد انعقاد مخلوط شده و بلافاصله با سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس پلاسمای حاصل که حدود ۲ میلی‌لیتر بود، در ۴ میکروتیوب ۵۰۰ لاندا الیکوت و تا زمان جمع‌آوری کل نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری شاخص اکسیداسیون و آنتی‌اکسیداسیون

در این تحقیق برای سنجش شاخص اکسیداسیونی از دو شاخص MDA و PC استفاده شد. اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدهید به روش رنگ‌سنجی شیمیایی با استفاده از کیت شرکت کای من (Cayman) آمریکا بود. حساسیت کیت مذکور ۰/۰۸µM و ضریب تغییرات درون آزمونی آن ۵/۸ درصد است. اندازه‌گیری مقدار پروتئین کربونیل در نمونه‌های مورد بررسی از طریق روش رنگ‌سنجی شیمیایی به کمک کیت شرکت کایمن انجام شد. بررسی مقدار شاخص ضداکسایشی آنزیمی (SOD) به روش رنگ‌سنجی آنزیمی با کمک کیت شرکت کایمن انجام گرفت.

1 . Beurer

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های آماری

با استفاده از آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف نرمال بودن توزیع ثابت شد. برای بررسی اختلاف معنادار در زمان‌های مختلف شبانه‌روز از تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر استفاده شد. در صورت معنادار بودن تأثیر زمان از آزمون تعقیبی حداقل سطح معناداری (LSD) برای مقایسهٔ زوج‌ها (مراحل اندازه‌گیری) استفاده شد. سطح معناداری (آلفا) ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و یافته‌های تحقیق

نتایج تحلیل آماری نشان داد در عامل MDA تفاوت معناداری در زمان‌های مختلف شبانه‌روز وجود دارد ($F_{۵,۴۵}$=۹/۳۱۷ و P=۰/۰۱۴). در عامل SOD تفاوت معناداری در تحلیل واریانس یک‌راههٔ مکرر مشاهده نشد ($F_{۵,۴۵}$=۳/۶۹۴ و P=۰/۰۸۹)، ولی در بررسی زوج‌ها بین برخی ساعات شبانه‌روز اختلاف معناداری مشاهده شد. در عامل PC بین هیچ‌کدام از زمان‌های شبانه‌روز تفاوت معناداری مشاهده نشد ($F_{۵,۴۵}$=۰/۴۳۷ و P=۰/۸۰۸) (جدول ۴ و شکل ۲).

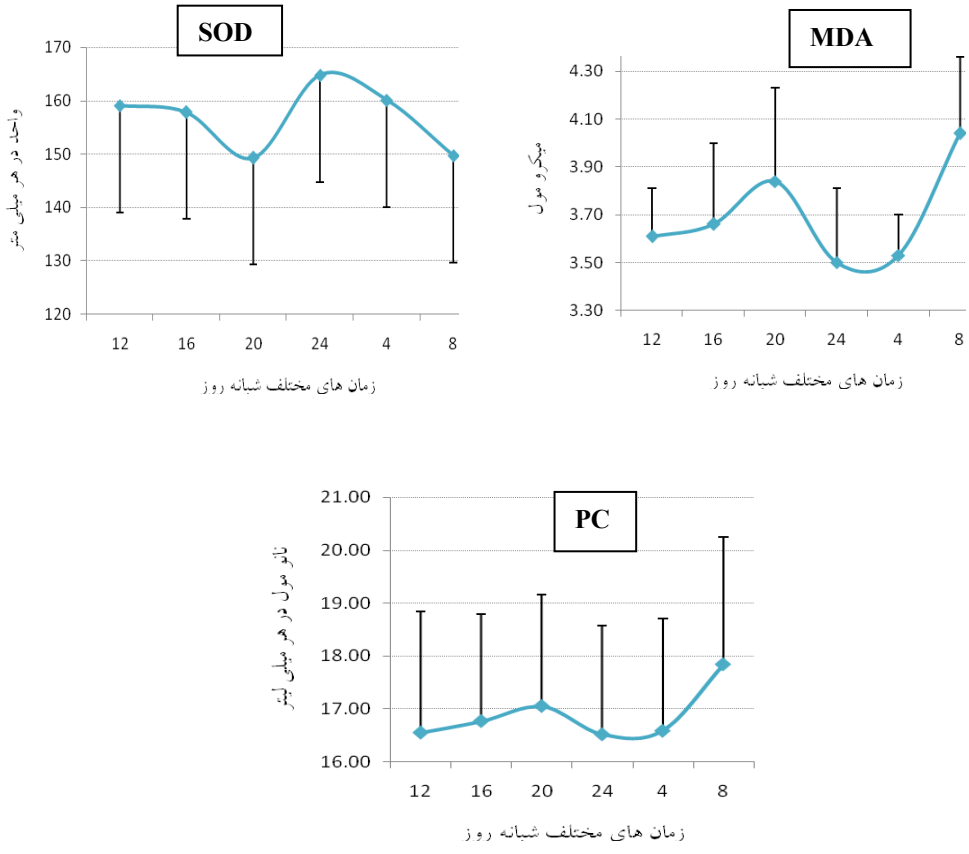
جدول ۴ - میانگین و انحراف استاندارد اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در ساعات مختلف شبانه‌روز

ساعات شبانه‌روز	SOD (واحد در هر میلی‌لیتر)	MDA (میکرو مول)	PC (نانو مول در هر میلی-لیتر)	فشار خون سرخرگی (میلی‌متر جیوه)
ساعت ۱۲	۱۵۹/۱۰±۳۱/۳۴*	۳/۵۰±۰/۳۱ **	۱۶/۵۵±۲/۲۹	۹۰/۶۳±۸/۸۸
ساعت ۱۶	۱۵۷/۸۰±۳۱/۷۹*	۳/۶۶±۰/۳۴ **	۱۶/۷۷±۲/۰۲	۸۷/۱۳±۸/۸۹
ساعت ۲۰	۱۴۹/۳۰±۲۷/۷۸	۳/۸۴±۰/۳۹**	۱۷/۰۵±۲/۱۱	۸۳/۱۷±۶/۵۹ ***
ساعت ۲۴	۱۶۴/۸۰±۳۲/۴۳*	۳/۵۰±۰/۳۱ **†	۱۶/۵۲±۲/۰۶	۸۵/۵۰±۵/۶۷
ساعت ۴	۱۶۰/۱۰±۳۴/۰۰	۳/۵۳±۰/۱۷ †	۱۶/۵۹±۲/۱۲	۸۶/۰۰±۷/۱۶ ***
ساعت ۸	۱۴۹/۷۰±۳۷/۳۵	۴/۰۴±۰/۳۲	۱۷/۸۴±۲/۴۱	۸۶/۶۷±۶/۲۳

*** معنادار نسبت به ساعت ۲۰ در عامل SOD، ** معنادار نسبت به ساعت ۸ در عامل MDA، *** معنادار نسبت به ساعت ۱۲ در عامل فشار خون سرخرگی (α=۰/۰۵) , † تفاوت معنادار نسبت به ساعت ۲۰ در عامل MDA (α=۰/۰۵)**

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تغییرات شبانه‌روزی SOD، MDA و PC در آزمودنی‌های غیرورزشکار

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات انجام گرفته در زمینهٔ ریتم شبانه‌روزی نشان می‌دهد تولید پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی-اکسیدان‌ها ریتم‌های شبانه‌روزی را به نمایش می‌گذارند (۱). ولی دربارهٔ بیشترین و کمترین مقادیر اکسیدان‌ها در زمان‌های مختلف شبانه‌روز نتایج این تحقیقات همخوانی ندارند. یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد دامنهٔ تغییرات شبانه‌روزی در عامل MDA بیشتر بوده و تفاوت بین مقادیر MDA در زمان‌های مختلف شبانه‌روز

www.SID.ir

Archive of SID

معنادار است. با وجود این، دامنهٔ این تغییرات در عامل PC کم بوده و تفاوت معناداری در ریتم شبانه‌روزی PC مشاهده نشده است، ولی الگوی تغییرات شبانه‌روزی اکسیدانی در هر دو عامل مشابه است، یعنی بیشترین مقادیر اکسیدانی در هر دو عامل در ساعت ۸ صبح است. در ادامه مقادیر MDA و PC در ساعت ۱۲ کاهش و سپس به‌تدریج در ساعت ۱۶ افزایش یافت و این افزایش تا ساعت ۲۰ ادامه یافت. سپس مقادیر در ساعت ۲۴ و ۴ صبح کاهش یافت و با نزدیک شدن به صبح و در ساعت ۸ به اوج خود رسید. در بررسی ریتم شبانه‌روزی SOD نقطهٔ اوج SOD در ساعت ۲۴ و حداقل مقادیر آن در ساعات ۲۰ و ۸ صبح مشاهده شد.

نتایج یافته‌های رودریگوز[1] (۱۹۹۹) با نتایج تحقیق حاضر همسوست. در این تحقیق مقادیر آنیون سوپر اکساید در ۲۴ ساعت در اینتروال‌های دو ساعته در هتروفیل‌های کبوترها بررسی شد و نتایج نشان داد مقادیر یون آنیون سوپراکساید در دورهٔ تاریکی کم بوده و کمترین مقدار آن در ساعت ۴ صبح بوده است. در دورهٔ روشنایی مقادیر آن افزایش یافته و در ساعت ۱۴ به نقطهٔ اوج رسیده است. نتایج تحقیق دیگر روی ۹ آزمودنی سالم (۵ زن و ۴ مرد) با میانگین سنی ۳۰ سال، نشان داد MDA دارای ریتم سیرکادین بوده و اوج آن در ساعت ۱۵:۱۵ است. علت تناقض نتایج این پژوهش با نتایج تحقیق حاضر ممکن است ویژگی‌های آزمودنی های تحقیق باشد، چرا که پاسخ‌های اکسیدانی و ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها در زنان و مردان تا حدودی متفاوت است. اولاً، زنان نسبت به مردان غلظت ملاتونین بیشتری دارند (رون برگ و همکاران، ۱۹۹۰)، دوماً، استرادیول که یک هورمون زنانه است، اثر آنتی‌اکسیدانی دارد که می‌تواند بر ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها تأثیر بگذارد (۶). نتایج تحقیق روی ریتم روزانهٔ (۸ صبح تا ۲۲ شب) PC در افراد سالم، افراد مبتلا به آلزایمر و هچنین افراد مبتلا به اختلال شناختی نشان می‌دهد اوج مقادیر PC در گروه سالم در ساعت ۱۴ بود (۲۴). علت متفاوت بودن نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر را می‌توان در زمان‌های خون‌گیری متفاوت و استفاده از بزاق آزمودنی‌ها به‌جای خون و پلاسما عنوان کرد.

علت متفاوت بودن نتایج برخی یافته‌ها دربارهٔ ریتم سیرکادین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند در نوع بافتی که نمونه‌گیری از آن انجام می‌گیرد، نهفته باشد. برای مثال، ثانی[2] و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیق بر روی موش در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نشان داد متوسط MDA در ۲۴ ساعت در ارگان‌های

1 . Rodriguez
2 . Sani

www.SID.ir

Archive of SID

موش تفاوت داشت. الگوی تغییرات MDA در مغز و کبد مشابه هم بود و اوج MDA در اواسط روز و کمترین مقدار آن در اواسط تاریکی بود، ولی این الگو در کلیه‌ها فرق می‌کرد و اوج MDA اواسط دورهٔ تاریکی بود. به‌علاوه، الگوی تغییرات MDA در پلاسما نسبت به بافت‌های دیگر متفاوت بود. اوج MDA در شروع تاریکی و کمترین مقدار آن در اواسط تاریکی و اواسط روشنایی بود (۲۲). این یافته، یافته‌های تحقیق حاضر را نیز تأیید می‌کند، زیرا در موش ریتم شبانه‌روزی برعکس ریتم انسان است و در دورهٔ تاریکی فعالیت موش افزایش می‌یابد و در دورهٔ روشنایی به خواب می‌رود. ازاین‌رو افزایش مقدار MDA در شروع دورهٔ فعالیت و کاهش آن در اواسط دوره فعالیت و اواسط دورهٔ خواب با یافته‌های تحقیق حاضر همسوست. با این حال، بررسی تغییرات ریتمی MDA در بافت‌های مختلف می‌تواند عامل تأثیرگذار بر تغییرات اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها باشد، زیرا مقدار استفادهٔ بافت از اکسیژن، ترکیب بافت لیپیدی و ظرفیت سم‌زدایی در بافت‌های مختلف، متفاوت است (۲۲).

یکی از سازوکارهایی که موجب کاهش مقادیر MDA و PC در اوقات شبانه شده است، ممکن است حاصل ترشح هورمون ملاتونین در این زمان باشد. ملاتونین، هورمون عصبی غدهٔ صنوبری است. ترشح این هورمون ریتم دارد و مقادیر اوج آن در شب رخ می‌دهد (۸). ترشح این هورمون با آغاز تاریکی و از ساعت ۱۰ شب شروع و در ساعت ۲ نیمه شب به مقادیر اوج خود می‌رسد و سپس به‌تدریج کاهش می‌یابد و در ساعت ۶ صبح به حداقل مقدار خود می‌رسد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد این هورمون در روند پیری و مهار استرس اکسایشی تأثیرگذار است (۸، ۱۸، ۱۹) و می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را به‌صورت افزایشی تنظیم کند (۲۱). در برخی تحقیقات هم اشاره شده ملاتونین آنتی‌اکسیدانی قوی است (۱، ۸) و می‌تواند به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنشی را تجزیه کند (۱۷). همچنین، ملاتونین انواع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکساید دسموتاز و کاتالاز را فعال می‌کند که می‌تواند بر مقادیر اکسیدان‌ها تأثیر بگذارد و آنها را کاهش دهد (۱۵). تستوسترون نیز به‌عنوان هورمونی با ویژگی‌های پیش‌آنتی‌اکسیدانی در مردان شناخته شده است (۲۵) و بیشترین غلظت این هورمون نیز در ساعات آغازین صبح و در دورهٔ شبانه است و در زمان عصر مقدار آن کاهش می‌یابد و به حداقل مقدار می‌رسد (۱۰). ازاین‌رو کاهش مقادیر MDA و PC در اوقاتی که مقادیر ملاتونین در اوج است، محتمل به‌نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Archive of SID

از دیگر عوامل تأثیرگذار بر تغییرات شبانه‌روزی اکسیدان‌ها، می‌توان به تغییرات دمای بدن در اوقات مختلف شبانه‌روز اشاره کرد. دمای بدن حدود ۱ تا ۳ ساعت قبل از بیدار شدن در کمترین حد خود خواهد بود. برعکس، دمای بدن در زمان عصر به اوج خود می‌رسد. افزایش دمای بدن و دمای محیط (۱۲) ممکن است موجب افزایش مقادیر گلوکوکورتیکوئیدها شود. افزایش مقادیر گلوکوکورتیکوئید (که مهم‌ترین آنها کورتیزول است)، ریتم شبانه‌روزی دارد و اوج آن در صبح و در زمان‌های نزدیک به بیدار شدن است (۱۲). گزارش شده است افزایش گلوکوکورتیکوئید، گلوتاتیون خون و فعالیت سوپر اکساید دسموتاز اریتروسیتی را در رت‌ها کاهش می‌دهد (۱۴). ازاین‌رو افزایش دمای محیط می‌تواند استرس اکسایشی را از طریق افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در پلاسما و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی افزایش دهد. این مسئله می‌تواند افزایش مقادیر اکسیدانی MDA و PC را در اوقات عصر که در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد و کاهش مقادیر اکسیدانی را در ساعت ۴ صبح که دمای بدن در حداقل مقدار است، توجیه کند.

بیشتر اجزای عملکردی به طور دقیق با منحنی دمای بدن ارتباط دارد. اوج آن در ساعت ۱۸ بوده و افت ۵ تا ۱۰ درصدی عملکرد در زمان‌های شبانه نسبت به اوقات روزانه مشاهده شده است (۱۶). ازاین‌رو با توجه به نتایج تحقیق حاضر که بیشترین مقادیر اکسایشی MDA و PC را در ساعت ۸ صبح گزارش کردند، همچنین مقدار فشار خون متوسط سرخرگی که با وجود غیرمعنادار بودن در ساعت ۸ و ۱۲ صبح نسبت به زمان‌های دیگر شبانه‌روز بیشتر بودند، می‌توان گفت اجرای فعالیت ورزشی در ساعات آغازین روز از لحاظ سیستم اکسایشی ممکن است برای انسان مضر باشد و خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی را افزایش دهد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی تأثیر اجرای فعالیت ورزشی در زمان‌های مختلف روز بر ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بررسی شود.

منابع و مآخذ

1. Baydas,G, Ercel,G, Canatan, H, Donder, E. & Akyol, A, (2001). "Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure". Cell Biochem. Funct. 19: PP:37–41.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Bridges A B, Fisher TC, Scott N, McLaren M, Belch JJf. (1992). "Orcadian Rhythm of White Blood Cell Aggregation and Free Radical Status in Healthy Volunteers". Free Radical Research.16(2):PP: 89-97.

3. Bruckner, J, Ramanathan, R, Lee, K, Muralidhara, S, (2002). "Mechanisms of circadian rhythmicity of carbon Tetrachloride Hepatotoxicity". Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 300(2): PP:273-281.

4. Hardeland, R, Coto-Montes, A, Poeggeler, B,(2003). "Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms". Chronobiol. Int. 20: PP:921–962.

5. Kanabrocki EI, Murray D, Hermida RC, et al.(2002). "Circadian variation in oxidative stress markers in healthy and type II diabetic men".Chronobiology International, 19(2): PP:423-439.

6. Kappila A, Pakarinen A, Kirkinen P, Makila U, (1987). "The effectof season on the circulating concentrations of anterior pituitary, ovarian and adrenal cortex hormones and hormone binding proteins in the sub-artic area: evidence of increased activity of the pituitary- ovarian axis in spring". Agaynecological Endocrinology, 1:PP: 137-150.

7. Kaplan JE, Chrenek RD, Morash JG, et al, (2008). "Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species zebrafish leukocytes". Journal of comparative biochemistry and physiology, part A, 151: PP:726-730.

8. Karasek, M, (2007). "Does melatonin play a role in aging processes?" Journal of Physiology and Phamacology, 58(6):PP: 105-113.

9. Kondratov, RV,(2007). "A role of the circadian system and circadian proteins in aging". Ageing Res. Rev. 6:PP: 12–27.

10. Kraemer William j. lobel chad C, Vokek Jeff S & et al.(2001). "The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in men". Eur. Journal of apply physiology. 84: PP:13-18.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Krishnan N, Krishnan N, Davis AJ, Giebultowicz JM. (2008). "Circadian regulation of response to oxidative stress in Drosophila melanogaster". Biochemical and Biophysical Research Communications. 374(2):PP: 299-303.

12. Kudielka, BM, Kirschbaum C.(2003). "Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase". Psychoneuroendocrinology, 28: PP:35–47.

13. Langmesser, S, and Albrecht U.(2006). "Life time-circadian clocks, mitochondria and metabolism". Chronobiol. Int. 23:PP: 151–157.

14. Orzechowski A, Ostaszewski P, Brodnicka A, et al. (2000). "Excess of glucocorticoids impairs whole-body antioxidant status in young rats- relation to the effect of dexamethasone in soleus muscle and spleen". Horm Metab research, 32(5): PP:174-180 .

15. Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R. (1995). "Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks". Journal of Pineal Research. 19:PP: 111–115.

16. Reilly T. (1990). "Human Circadian- Rhythms and Exercise". Critical Reviews in Biomedical Engineering, 18(3), PP:165-180.

17. Reiter RJ. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions". Endocr. Rev. 12: PP:151–180.

18. Reiter RJ.(1995). "Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain". FASEB Journal, 9: PP:526–533.

19. Reiter RJ, Pablos MI, Agapito TT. & Guerrero JM.(1996). "Melatonin in the context of the free radical theory of aging". Ann. N. Y. Acad. Sci. 786: PP:362–378.

20. Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G,et al. (1999). "Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils". Journal of Pineal Research, 26(1):PP: 35-42.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. (1990). "Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration". The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 71: PP:492-496.

22. Sani M, Boughanmi NG, Gadacha W, et al. (2007). "Malondialdehyde content and circadian variations in brain, kidney, liver, and plasma of mice". Journal of Chronobiology International, 24(4):PP: 671-685.

23. Schnell RC, Bozigian HP, Davies MH, et al. (1983). "Circadian rhythm in acetaminophen toxicity: role of nonprotein sulfhydryls". Toxicol. Apply pharmacology.71:PP:353-361.

24. Su H, Gornitsky M, Geng G, et al. (2008). "Diurnal variations in salivary protein cabonyl levels in normal and cognitively impaired human subjects". Age, 30:PP:1-9.

25. Svartberg J, Jorde R, Sundsfjord J, Bonaa KH, Barrett-Connor E.(2003). "Seasonal variation of testosterone and waist to hip ratio in men: the Tromso study". Journal of clinical endocrinology and metabolism, 88: PP:3099-3104.

26. Tunon MJ, Gonzalez P, Lopez P, Salido GM, Madrid JA. (1992). "Circadian rhythms in glutathione and glutathione-S transferase activity of rat liver". Arch Int Physiol Biochim Biophys, 100(1):PP: 83-87.

27. Valencia E, Marin A, Hardy G. (2001). "Circadian rhythmicity of whole-blood glutathione in healthy subjects". Nutrition. 17(9):PP:731-733.

28. Vollaard Niels BJ, Shearman Jerry P, and Cooper Chris E. (2005). "Exercise - induced oxidative stress: Myths,realities and physiological relevance (Review article)". Journal of Sports Medicine, 35 (12): PP:1045-1062.

www.SID.ir