Research Paper

The effect of pumpkin seed and endurance training on oxidative stress factors and DNA damage

Nahid Shokohi Rad[1]*, Tahereh Bagherpour[1], Nematollah Nemati[2], Vida Hojati[2]

1. Department of Sport Physiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran
2. Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran

*** Corresponding author e-mail: shokouhi.nahid94@gmail.com**

Citation: Shokohi1 Rad N, Bagherpour T, Nemati N, Hojati V. The effect of pumpkin seed and endurance training on oxidative stress factors and DNA damage. Daneshvar Medicine 2020;28(3):28-40.

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the effect of pumpkin seed and endurance training on oxidative stress factors and DNA damage of slow-twitch muscle tissue in male rats poisoned with hydrogen peroxide.

Materials and Methods: A total of 48 adult male rats weighing 220±20 g at eight weeks were administered in accordance with stress interventions (hydrogen peroxide), pumpkin seed and endurance training. To induce oxidative stress, intraperitoneal injection of H_2O_2 at a dose of 2 mmol/kg was performed three times a week. Inoculation of pumpkin seeds was performed at 0.5 µg per day with intraperitoneal injection at a concentration of 300000 U/ml. The training groups performed daily aerobic exercise on a treadmill for 8 weeks, the endurance training protocol started at a speed of 8 m/min and a slope of 10 degrees for 30 minutes on the treadmill in the first week and gradually at a speed of 20 m/min at an angle of ten. The degree reached 60 minutes in the eighth week. Data were analyzed using repeated-measures analysis of variance and Bonferroni post hoc test at the level of $\alpha = 0.05$.

Results: The results of the present study showed that training and receiving pumpkin seeds separately has a significant effect on ATP, ADP, ATP / ADP ratio, MDA and PAB of horseshoe muscle (P= 0.001); But the interaction between training and pumpkin seeds did not have a significant effect only on MDA of soleus muscle (P = 0.025) but had a significant effect on other variables (P = 0.001).

Conclusion: Taking pumpkin seed supplement along with endurance training can reduce oxidative stress in the body.

Keywords: Pumpkin seeds, Endurance training, Oxidative stress

Received: 30 May 2020
Last revised: 12 Aug 2020
Accepted: 23 Aug 2020

مقاله پژوهشی

اثر بذر کدو و تمرین استقامتی بر نشانگان فشار اکسیداتیو و تخریب DNA

نویسندگان: ناهید شکوهی راد[1]*، طاهره باقرپور[1]، نعمت اله نعمتی[1]، ویدا حجتی[2]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، سمنان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، سمنان، ایران

*نویسنده مسئول: ناهید شکوهی راد **Email: shokouhi.nahid94@gmail.com**

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۲

چکیده

مقدمه و هدف: این پژوهش با هدف بررسی نقش بذر کدو و تمرین استقامتی بر نشانگان فشار اکسیداتیو و تخریب DNA بافت عضلات کند انقباض در موش های صحراییی نر مسموم شده با پراکسید هیدروژن انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد ٤٨ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۰±۲۲۰ گرم و ۸ هفته ، مطابق با مداخلات استرس (پراکسیدهیدروژن)، مکمل بذر کدو و تمرین استقامتی اجرا شد. جهت القا استرس اکسیداتیو تزریق درون صفاقی H2O2 با دوز2 mmol/kg به صوموش صحرایی سه بار در هفته‌یک روز در میان انجام شد. القا مکمل بذر کدو به صوموش صحرایی ۰/۵ میکروگرم روزانه با تزریق درون صفاقی با غلظت ۳۰۰۰۰۰ UI/ml انجام شد. گروه های تمرینی روزانه تمرین هوازی بر روی تردمیل را به مدت ۸هفته انجام دادند، پروتکل تمرین با سرعت 8 m/min و شیب ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی تردمیل در هفته‌ی اول شروع و به تدریج به سرعت 20 m/min با زاویه ده درجه به مدت ٦٠ دقیقه در هفته‌ی هشتم رسید. جهت تجزیه تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر و آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح α =۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین و دریافت بذر کدو به صوموش صحرایی جداگانه اثر معنی داری بر غلظت ATP، ADP، نسبت ATP/ADP، MDA و PAB عضله نعلی دارد (P=۰/۰۰۱)؛ اما تعامل تمرین و بذر کدو فقط بر MDA عضله نعلی اثر معنی داری نداشت (P=۰/۰۲۵) ولی بر سایر متغیرها تأثیر معناداری داشت (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مصرف مکمل بذر کدو به همراه تمرین استقامتی می تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بدن گردد.

واژه های کلیدی: بذر کدو ، تمرین استقامتی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

در دو دهه اخیر استرس اکسیداتیو ناشی از فعالیت های بدنی و آنتی اکسیدان ها به یکی از حیطه های پژوهشی مهم و پر طرفدار در بین محققین علوم ورزشی تبدیل شده است. استرس اکسیداتیو به مفهوم به هم خوردن توازن بین گونه های فعال و سیستم آنتی اکسیدانی بدن به نفع گونه های فعال و رادیکال های آزاد است. رادیکالهای آزاد عموماً ترکیباتی ناپایدار، بسیار واکنش پذیر و مولکولهایی پرانرژی هستند (۱). گونه های فعال اکسیژن و گونه های فعال نیتروژن که طی فرآیندهای متابولیکی نرمال در همه ارگانیزم های هوازی تولید می شوند، نمونه هایی از رادیکالهای آزاد هستند (۲). گونه های فعال اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال آلکوکسیل، رادیکال پراکسیل، پراکسید هیدروژن و اکسیژن تک می باشند. گونه های فعال نیتروژن شامل نیتریک اکساید، نیتریک دی اکساید و پراکسی نیتریت هستند. علاوه بر منابع بیولوژیک، رادیکالهای آزاد دارای منابع خارجی نیز می باشند. منابع خارجی آنها عباموش صحراییند از: دود سیگار، تشعشع، نور ماوراءبنفش، آلودگی محیطی، حلالهای صنعتی، داروها، آفت‌کش‌ها و فعالیت های ورزشی. از بین گونه های اکسیژن واکنش پذیر، گروه رادیکال هیدروکسیل موجب پراکسیداسیون چربی ها می شود که از محصولات آن می توان مالون دی آلدهید (MDA) را نام برد و به عنوان شاخص فشار اکسایشی در نظر گرفت (۳).

همچنین عدم توانایی برای حفظ ATP، ADP و همچنین نسبت بین این دو متناسب با انرژی مصرف شده و افزایش مصرف اکسیژن که باعث تخریب بافت عضلانی و استرس اکسیداتیو در عضلات می شود؛ که تغییرات موارد یاد شده با فعالیت ورزشی همبستگی بالایی دارند (٤). فعالیت بدنی شدید و طولانی مدت می تواند باعث افزایش تولید گونه های فعال و رادیکال های آزاد شده و منجر به بروز استرس اکسیداتیو شود (۵). ضمناً استرس اکسیداتیو می تواند باعث تسریع پدیده پیری و بروز بسیاری از بیماری های مختلف از قبیل سرطان و سندرم متابولیک شود (٦).

تعداد قابل ملاحظه ای از افراد جامعه از اختلالاتی رنج می برند که التهاب و آسیب های اکسیداتیو عاملی مهم در بروز این اختلالات به شمار می رود و فعال شدن مسیرهای التهاب باعث اختلال در بیان ژن های مختلف، ایجاد رادیکال های فعال اکسیژن و فعال شدن مسیرهای تخریب سلولی می شود. بدن انسان دارای انواع مختلف آنتی‌اکسیدان ها جهت مقابله با اکسیدان ها و حفظ تعادل بین اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها و جلوگیری از بروز استرس اکسیداتیو می باشد. به نظر می رسد ورزش می تواند در تنظیم تعادل آنتی اکسیدان/ اکسیدان نقش داشته باشند (۷). بدن دارای سیستم های آنتی اکسیدانی طبیعی است که به کاهش سیستم عامل کمک می کند و این سیستم ها با تمرینات ورزشی افزایش می یابد و نقش مهمی در مهار و کاهش ROS و اثرات منفی آنها ایفا می نماید (۸).

فعالیت هوازی در صوموش صحراییی که با شدتهای متوسط و پایین انجام شود منجر به تحریک سیستم آنتی اکسیدانی برای مقابله با رادیکالهای آزاد می شود. با این حال بسیاری از محققین بر این باروند که فعالیت های با شدت بالا نیز در صوموش صحراییی که به طور منظم انجام شوند منجر به سازگاری می گردند (۹).

در پژوهشی که توسط شین و همکاران (۲۰۱٦) انجام شد نشان داده شده است که روغن دانه کدو به واسطه تأثیرات آنتی اکسیدانی توانسته است میزان آب میان بافتی ناشی از ایسکمی مغزی را در دوز ۰,۷۵ گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی کاهش دهد. نتایج این پژوهش نشان داد روغن تخم کدو میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی و آدم مغزی را کاهش می دهد که این به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و اسیدها چرب غیراشباع موجود در دانه کدو است (۱۰). همچنین قنبری و همکاران (۱۳۹۱) اثر

تمرین استقامتی را بر روی تغییرات ATP کبد بررسی کردند. یافته ها حاکی از آن بود که تمرین استقامتی کوتاه مدت و بلند مدت موجب افزایش معنی‌دار در غلظت ATP کبد گردید، در حالی که تمرین های ۹ هفته‌ای تغییری در غلظت ATP کبد ایجاد نکرد (۱۱). همچنین سیف و همکاران در سال۲۰۱٤ نشان دادند که ترکیبات موجود در کدو می تواند کبد را در برابر سمیت کبدی ناشی از الکل و استرس اکسیداتیو حفظ کند (۱۲).

در سالهای اخیر توجه اکثر پژوهشگران به استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی معطوف شده است. از طرفی دیگر، در حال حاضر مصرف بعضی از گیاهان دارویی برای درمان و پیشگیری بسیاری از بیماریها افزایش یافته است. بنابراین با توجه به اینکه مصرف مکمل‌های گیاهی در مقایسه با داروهای صنعتی اثرات جانبی کمتری دارد. استفاده از این مکمل‌های گیاهی در برخی موارد می تواند جایگزین مناسبی برای دارودرمانی باشد. یکی از این گیاهان طبیعی ضد اکسایشی بذر کدو[1] است. بذر کدو که از منابع غنی اسیدهای چرب غیراشباع ، آنتی اکسیدانها و فیبر است که به عنوان ضد گرفتگی عروق و محافظت کننده‌ی کبد شناخته می شود. دانه های کدو سرشار از آنتی اکسیدان هستند که وجود آنها در غلظت کم اکسیداسیون را به تأخیر می اندازند یا کاهش می دهند (۱٤،۱۳).

گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن واکنش‌های اکسیداسیون با مولکول‌های دیگر مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را به‌منظور پایداری‌شان افزایش می‌دهند. گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن شامل آنیون‌های سوپراکسید، هیدروژن پرواکسیداز و محصولات واکنش پذیر هیدروژن پراکسید با رادیکال های هیدروکسیل هستند که قادر به واکنش و صدمه زدن به DNA، پروتئین ها و چربی ها هستند. نامطلوب بودن وضعیت تغذیه‌ای در سالمندان و ورزشکاران به دلیل کاهش کیفیت زندگی یا عدم توجه به آن، زمینه بروز بسیاری از بیماری ها از جمله قلبی-عروقی، دیابت و سرطان را فراهم می‌کند (۱۳) و از آنجا که مصرف مواد غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان از بروز این بیماری ها جلوگیری می‌کند، توجه به مکمل های آنتی‌اکسیدانی در حال رشد است. ورزشکاران نیز برای کاهش سطوح و یا حذف رادیکال های آزاد مکمل‌های ویتامینی را مصرف می‌کنند (۱٦،۱۵). علاوه بر مصرف مواد ویتامینی مانند ویتامین های A ,E و C که دارای خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی هستند. توجه به سایر آنتی‌اکسیدان ها در رژیم غذایی مانند میوه و سبزیجات ضروری است.

تمرین تداومی منظم هم به عنوان عاملی مؤثر در تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بدن شناخته شده است. به طور کلی اگر چه فعالیت ورزشی از یکسو با افزایش فشار اکسایشی، احتمال تشکیل رادیکال‌های آزاد مضر را افزایش می‌دهند، اما از سوی دیگر با القای آنزیم‌های ضد اکسایشی سبب کاهش رادیکال‌های آزاد می شود. مطالعات تأثیر تمرینات منظم و با شدت متوسط را در افزایش ظرفیت دفاع ضد اکسایشی و کاهش فشار اکسایشی نشان داده‌اند (۱۷).

به نظر می رسد تمرین ورزشی استقامتی به طور منظم سازگاری‌های آنتی اکسیدانی مناسبی را ایجاد می‌کند و مانع از افزایش عوامل فشار اکسایشی می‌شود. با توجه به مطالب فوق‌الذکر و از آنجا که مسمومیت با آب اکسیژنه منجر به آسیب اکسیداتیو شده و ممکن است فعالیت بدنی منظم با تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی منجر به کاهش فشار اکسیداتیو شود. همچنین در این زمینه استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی احتمال دارد بتواند این اثر فعالیت بدنی منظم را تقویت کند؛ با عنایت به کمبود و شاید حتی نبود مطالعه ای که اثر همزمان فعالیت بدنی منظم و عصاره بذر کدو را بر آسیب اکسیداتیو بررسی کرده باشد، پژوهشگران پژوهش حاضر بدنبال بررسی این مسئله هستند که آیا تلفیق تمرین استقامتی و مصرف بذر کدو بر بهبود نشانگان فشار اکسیداتیو و تخریب DNA بافت

[1] Pumpkin seeds

عضلات کند انقباض در موش های صحراییی نر مسموم شده با پراکسیدهیدروژن اثر دارد یا خیر.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع تحقیقات تجربی است. این مطالعه تجربی در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود با کد IR.IAU.SHAHROOD.REC.1398.031 تصویب و بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این پژوهش ٤٨ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور تهران با میانگین وزنی حدود ۲۵۰- ۲۰۰ گرم خریداری گردیده و به طور جداگانه در قفس های ویژه نگهداری موش صحرایی قرار داده شد. پس از انتقال موش های صحرایی به حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، موش های صحرایی به مدت یک هفته جهت تطابق با محیط جدید، بدون دریافت هیچ نوع مداخله ای در قفس های پلی کربنات شفاف به طول ۳۰، عرض و اموش صحراییفاع ۱۵ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد، نگهداری شدند. در این زمان موش های صحرایی به غذای مخصوص جوندگان به صوموش صحرایی پلت دسترسی داشته و همچنین از آب شهری برخوردار بودند. همچنین آزمودنی ها در دمای ۲°C ± ۲۲ و رطوبت ۵ ± ۵۰٪ در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت تاریکی: ۱۲ ساعت روشنایی) قرار گرفتند. در این تحقیق کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبار در تمرینات مد نظر قرار گرفت. این اعمال قبل و بعد از آزمونها انجام گردید.

پس از یک هفته آشنایی با محیط جدید، موش های صحرایی به صورت تصادفی به شش گروه هشت تایی تقسیم شدند:

گروه یک: گروه کنترل

هشت موش صحرایی بر روی یک تردمیل شش کاناله به مدت ۵ روز در هفته برای مدت ۲ ماه و با سرعت ۲ متر در دقیقه برای ۵ دقیقه انجام دادند. موش های صحرایی محلول نرمال سالین (۰٫۹٪) را به صوموش صحرایی خوراکی از طریق یک لوله اورو گاستریک دریافت کردند.

گروه دو: گروه مکمل بذر کدو یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن

این گروه از موش های صحرایی یک گرم مکمل بذر کدو به ازای هر کیلوگرم از وزنشان در روز از طریق یک لوله اورو گاستریک برای مدت ۸ هفته دریافت کردند. این گروه از موش های صحرایی هیچگونه تمرینی را انجام ندادند.

گروه سه: گروه مکمل بذر کدو دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن

این گروه از موش های صحرایی دو گرم مکمل بذر کدو به ازای هر کیلوگرم از وزنشان در روز از طریق یک لوله اورو گاستریک برای مدت ۸ هفته دریافت کردند. این گروه از موش های صحرایی هیچگونه تمرینی را انجام ندادند.

گروه چهار: گروه تمرین

هشت موش صحرایی با تمرینات استقامتی بر روی یک تردمیل شش کاناله برای انجام تمرینات استقامتی به صوموش صحرایی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته با سرعت ۲۳ متر بر دقیقه ، روزانه ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. تمام موش های صحرایی دوره ۸ هفته ای را تکمیل کردند پروتکل تمرین برنامه بین ساعت ٦:۰۰ و ۸:۰۰ صبح اجرا گردید.

گروه پنج: گروه تمرین- بذر کدو یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن

در این گروه، هشت موش صحرایی تمرینات استقامتی را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی تردمیل همانگونه که در گروه دوم شرح داده شد ، انجام دادند؛ و همچنین یک گرم مکمل بذر کدو به ازای هر کیلوگرم از وزنشان همانگونه که در گروه ۲ شرح داده شد، برای مدت ۸ هفته دریافت کردند.

گروه شش: گروه تمرین- بذر کدو دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن

در این گروه، هشت موش صحرایی تمرینات استقامتی را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی تردمیل همانگونه که در گروه دوم شرح داده شد ، انجام دادند؛ و همچنین یک گرم مکمل بذر کدو به ازای هر کیلوگرم از وزنشان همانگونه که در گروه ۳ شرح داده شد، برای مدت ۸ هفته دریافت کردند.

القای فشار اکسیداتیو از طریق تزریق پراکسید هیدروژن

تمامی گروهها۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ساخت شرکت سیگما آلدریچ را به مدت ١٤ روز و به صوموش صحرایی درون صفاقی دریافت نمودند.

تهیه عصاره بذر کدو

بذر کدو خشک از پژوهشگاه گیاهان دارویی تهیه شد. سپس با آسیاب برقی به صوموش صحرایی پودر درآمد. پودر حاصله در دو مرحله یک ساعته در اتانول ۸۰ درصد به نسبت یک به ده خیسانده شد. پس از آن از فیلتر کاغذی ۰/۲ میلی‌متری عبور نمود. ماده باقی مانده در دستگاه پرکولاسیون قرار داده شد تا اتانول آن تبخیر گردد. هر ۵۰ میلی گرم پودر عصاره خشک باقیمانده در ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر حل شده و با روش گاواژ به موش های صحرایی خورانده شد.

بافت برداری

در روز آزمایش، بافت عضله نعلی(کند انقباض) بعد از جداسازی و شستشو با محلول PBS قرار داده شده و در محلول RNA Later (Ambion, L/N: 1206029) قرار داده شد. این محلول برای تثبیت و محافظت از بافت RNA سلولی مورد استفاده قرار می گیرد. کل RNA از ۳۰ میلی‌گرم بافت (وزن مرطوب) با استفاده از مینی کیت کیاژن استخراج شد (kit, QIAGEN, Germany) . ۳۰ میلی گرم بافت عضله نعلی(کند انقباض) (بافت مرطوب) با استفاده از روتور – استاتور TissueRuptor (230V, 50-60 Hz_ QIAGEN, Germany) هموژنیزه شد. محلول هموژنات در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با افزودن ۵۹۰ میکرولیتر آب بدون RNase و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به محلول انکوبه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و به لوله جدید منتقل شد. پس از آن به مقدار نصف حجم (معمولاً ٤٥٠ میکرو لیتر) اتانول خالص به محلول حاوی RNA اضافه شد. پس از شستشو با بافر RW1 به طور مستقیم به مخزن مجهز به فیلتر مخصوص در مرحله آخر، RNA با اضافه کردن ۳۰ میکرو لیتر آب آزاد RNase جمع آوری و در دمای منفی ۲۰ نگهداری شد.

اندازه گیری های آزمایشگاهی

بافت عضله نعلی (کند انقباض) بعد از کشتن موش صحرایی به روش قطع نخاع جدا شده و بعد از شستن با محلول PBS بلافاصله در نیتروژن مایع (۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) منجمد شده و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قبل از استخراج پروتئین ذخیره می شود. پروتئین کل بافت عضله نعلی(کند انقباض) با استفاده از کیت(PRO-PREP, Intron،UK) استخراج شد. اندازه گیری پروتئین برای تعیین غلظت پروتئین نمونه ها با استفاده از کیت Micro BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific™- US) انجام شد. غلظت نمونه ها از طریق نمودار خطی غلظت استاندارد کیت BCA محاسبه وجهت انجام وسترن بلات آماده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

در بخش توصیف از شاخص های میانگین و انحراف استاندارد استفاده شده است. در بخش آمار استنباطی و آزمون فرضیه ها، پس از غربالگری داده ها از نظر توزیع طبیعی (آزمون کولموگروف-اسمیرنوف)، تجانس واریانس (آزمون لوین) و دیتای پموش صحرایی (نمودار جعبه ای) با استفاده از تحلیل دوراهه واریانس برای گروههای مستقل نتایج به دست آمده مورد تحلیل قرار گرفت. بر اساس این

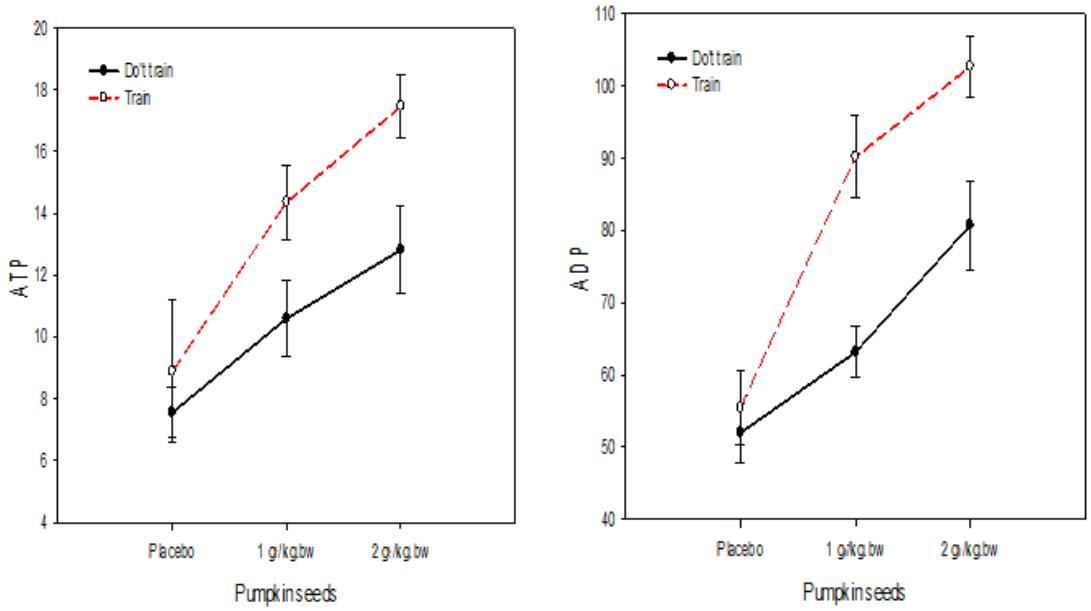
مدل ابتدا اثرهای اصلی تمرین و بذر کدو به تنهایی بر پیامد های مورد مطالعه مورد آزمون قرار گرفت. سپس اثر تعاملی تمرین وبذر کدو مورد آزمون قرار گرفت. سطح معناداری نیز برای تمام محاسبات (p<۰/۰۵) در نظر گرفته شده است.

یافته ها

جدول ۱. نتایج آزمون تحلیل دوراهه واریانس مستقل بر غلظت فاکتورهای مورد بررسی در عضله نعلی. (تعامل تمرین* بذرکدو)

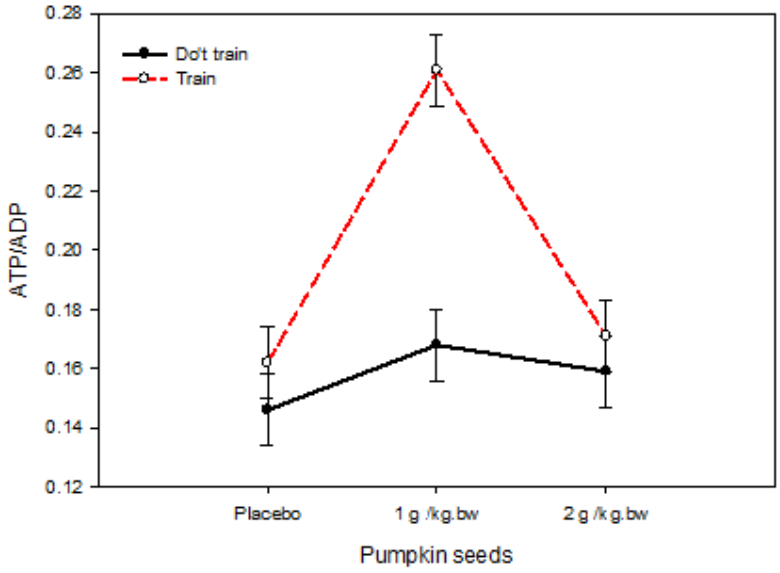
عامل	مجموع مربعات	DF	میانگین مربعات	F	SIG
ATP	۱۷/٦۷۱	۲	۸/۸۳۵	٤/۸۳۹	*۰/۰۲۱
ADP	۹۲۲/٤٥۷	۲	٤٦۱/۲۲۸	۱۸/۹۸٤	*۰/۰۰۱
ATP/ADP	۰/۰۱۲	۲	۰/۰۰٦	۷/۷۹۹	*۰/۰۰۲
MDA	۳۰۹۸٥/۸٥۷	۲	۱٥٤۹۲/۹۲۸	۱/٤۱٦	۰/۲٥۸
PAB	٥۹۰۸/۳۳۱	۲	۲۹٥٤/۱٦٥	۱۷/۱۰۱	*۰/۰۰۱

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دوراهه مشخص شد، تمرین و دریافت بذر کدو به صوموش صحرایی جداگانه اثر معنی داری بر غلظت ATP، ADP، نسبت ATP/ADP، MDA و PAB عضله نعلی دارد (P=۰/۰۰۱). تعامل تمرین و بذر کدو نیز اثر معنی داری بر غلظت ATP،ADP ، نسبت ATP/ADP و PAB عضله نعلی داشت(P=۰/۰۰۱)؛ اما تعامل تمرین و بذر کدو اثر معنی داری بر MDA عضله نعلی نداشت (P=۰,۰۲٥). یافته های پژوهش حاضر نشان داد که غلظت ATP و ADP در پایان دوره به طور معنی داری در گروه های بدون مکمل کمتر از گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) و گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین میزان ATP در گروه دریافت دوز دو بیشتر از دوز یک (P=۰/۰۰۱) بود (نمودار ۱).



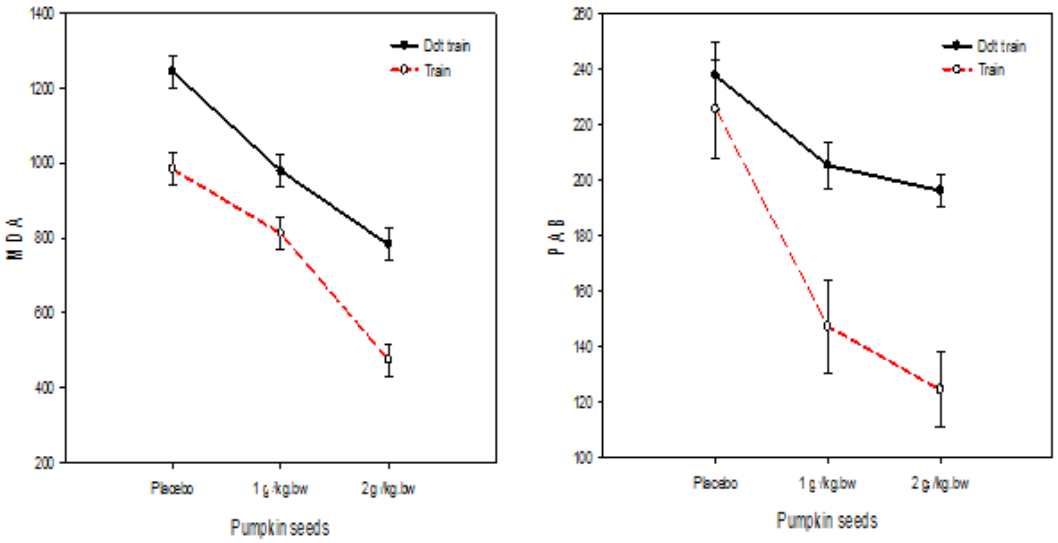
نمودار ۱. غلظت ATP و ADP عضله نعلی در گروههای مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است

همچنین نسبت ATP/ADP در پایان دوره در گروه های بدون مکمل اختلاف معنی داری با گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) نداشت؛ اما گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن اختلاف معنی داری با گروه دارونما (P=۰۰۱/۰) داشت. نسبت ATP/ADP در گروه دریافت دوز دو و دوز یک نیز اختلاف معنی داری با یکدیگر داشتند (P=۰/۰۰۱) (نمودار ۲).



نمودار ۲. نسبت ATP/ADP عضله نعلی در گروههای مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است

همچنین نتایج آزمون بون فرونی نشان داد غلظت MDA و PAB در پایان دوره به طور معنی داری در گروه های بدون مکمل بیشتر از گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) و گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین میزان MDA و PAB در گروه دریافت دوز دو کمتر از دوز یک (P=۰/۰۰۱) بود (نمودار ۳).



نمودار ۳. غلظت MDA و PAB عضله نعلی در گروههای مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است

همانطور که نشان داده شده است، به صوموش صحرایی کلی میانگین گروه هایی که تمرین نکرده بودند به صوموش صحرایی معنی داری از گروه هایی که تمرین کرده بودند بیشتر بود. با افزایش دوز مصرفی، غلظت MDA و PAB به صوموش صحرایی کلی کاهش یافت. الگوی تغییرات در دوزهای مختلف با توجه به تمرین کردن یا تمرین نکردن مشابه بود. لذا با وجود معنی دار بودن اثر اصلی تمرین و مکمل، تعاملی مشاهده نشد و نتایج نشان داد که تمرین هوازی و مکمل بذر کدو بر غلظت MDA عضله نعلی در موش های صحرایی مسموم شده با پراکسید هیدروژن اثر معنی دار ندارد. همچنین نتایج آزمون بن فرونی نشان داد غلظت PAB در پایان دوره به طور معنی داری در گروه های بدون مکمل بیشتر از گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز یک گرم و دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) و گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین میزان PAB در گروه دریافت دوز دو کمتر از دوز یک (P=۰,۰۱۶) بود.

بحث

پژوهش حاضر بررسی نقش مکمل یاری بذر کدو و فعالیت ورزشی بر عوامل استرس اکسیداتیوی بافت عضله نعلی موش های صحراییی نر مسموم شده با پراکسید هیدروژن را مورد مطالعه قرار داده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد پس از اجرای پروتکل ۸ هفته ای، تمرین اثر معنی داری بر غلظت ATP بافت عضله نعلی دارد، به طوری که در گروه تمرین کرده میزان مصرف ATP بعد از ۸ هفته افزایش داشت. بر اساس گزارش های موجود، عوامل متعددی بر غلظت ATP عضلانی اثرگذار هستند (۱۸). آنچه که مسلم است فعالیت ورزشی از جمله عوامل بارزی است که موجب تغییرات غلظت ATP عضلانی می

شود. البته تاکنون پاسخ های متفاوتی در این مورد گزارش شده است. برخی پژوهشگران افزایش معنی دار، تعدادی نیز کاهش معنی دار و در برخی دیگر عدم تغییر معنی دار در غلظت ATP عضلانی را گزارش نموده اند (۲۶،۱۹،۱۸،۱۲). قنبری و همکاران (۱۳۹۱) اثر تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه با شدت ۲۵ متر بر دقیقه) را در سه گروه تمرینی کوتاه مدت (۳ هفته)، متوسط (۹ هفته) و بلندمدت (۱۲ هفته) روی تغییرات ATP کبد بررسی کردند. یافته ها حاکی از آن بود که تمرین استقامتی کوتاه مدت و بلند مدت موجب افزایش معنی‌دار در غلظت ATP کبد گردید، در حالی که تمرین های ۹ هفته‌ای تغییری در غلظت ATP کبد ایجاد نکرد (۱۹). هاگتون و همکاران کاهش ATP کبدی را به دنبال فعالیت تمرینی در موش صحرایی گزارش کردند (۲۰). از دلایل این تفاوت می توان به تغییر متابولیت های موجود در اثر تمرین یاد شده است و مهم ترین علت کاهش ATP را، تلاش اندام ها برای کاهش لاکتات تولیدی در طی تمرین دانست. بر اساس پژوهش های یاد شده به نظر می رسد عواملی مانند شدت تمرین، مدت تمرین، طول دوره ی تمرین و فاصله ی آخرین جلسه تمرین تا بیهوشی در غلظت ATP نقش مهمی داشته باشند (۲۱).

دریافت بذر کدو نیز اثر معنی داری بر غلظت ATP بافت عضله نعلی داشت. به طوری که با افزایش میزان دوز مصرفی میزان مصرف ATP افزایش نشان داد. تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر بذر کدو بر میزان ATP نپرداخته است. با این وجود با توجه به اینکه بذر کدو علاوه بر چربی، پروتیئن، کربوهیدرات ، فیبر و ... دارای مواد دیگر مانند مواد معدنی و عناصر عالی دیگر است که بر اساس گزارشات بذر کدو خاصیت ضد التهابی، آنتی اکسیدانی دارد و در مطالعات دیگر نشان داده شده است که زمان واماندگی شنا را افزایش می دهد و به عنوان یک ماده ضد خستگی شناخته می شود و می تواند عملکرد ورزشی را بالا ببرد (۲۲). در ایجاد خستگی عضلانی بسته به ترکیب فیبر عضله (تند یا کند)، شدت، نوع و مدت زمان انقباض و تناسب اندام در هر فرد، چندین عامل نقش دارند. برخی از این عوامل شامل: تخلیه سریع گلیکوژن ، تجمع موادی مثل لاکتات، یون هیدروژن و فسفر داخل سلولی، اختلال در ترشح کلسیم از شبکه سارکوپلاسمیک، عدم توانایی برای حفظ ATP کافی متناسب با انرژی مصرف شده و افزایش مصرف اکسیژن که باعث تخریب بافت عضلانی و استرس اکسیداتیو در عضلات می شود، می باشند. هر کدام از این عوامل به تنهایی یا به همراه یکدیگر به طور مؤثری باعث از بین رفتن نیروی عضلانی و در نتیجه ایجاد خستگی می شوند. همانطور که در بالا اشاره شد بذر کو به عنوان یک آنتی اکسیدان می تواند از استرس اکسیداتیو جلوگیری کند و هر چه مقدار دوز این مکمل بیشتر باشد اثر بهتری به جای می گذارد. با توجه به این نکات به نظر می رسد افزایش ATP عضلانی در راستای افزایش عملکرد کلی منطقی به نظر برسد. تعامل تمرین و بذر کدو اثر معنی داری بر غلظت ATP بافت عضلانی داشت (p=001/0).

ATP نه تنها به عنوان یک منبع رایج انرژی برای سلولها محسوب می شود بلکه می تواند به عنوان یک مولکول پیام رسان بین سلولی ایفای نقش کند و سبب ایجاد پاسخ های فیزیولوژیک متنوع در سلولهای مختلف شود. به صوموش صحرایی خارج سلولی می تواند از طریق گیرنده های سطح سلولی پورینی موسوم به گیرنده های P2، سبب راه اندازی مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی و القای اثرات کوتاه مدتی چون ترشح سیتوکین، تجمع پلاکتها، التهاب و موارد بسیار دیگر شود. از طرفی ATP می تواند در سلولهای مختلف اثرات بلند مدت مختلفی چون آپوپتوز، تمایز و تکثیر اعمال کند که اشاره به اهمیت این نوکلئوتیدها در فرآیندهایی چون رشد و مرگ سلولی دارد (۲۳). در واقع با مصرف مکمل بذر کدو می توان از کاهش ATP جلوگیری کرد و در نهایت از پیشرفت مرگ سلولی پیشگیری کرد. مطالعات

مختلف بیشتر ثابت کرد که ATP سبب مهار همانندسازی DNA و رشد سلولی در رده های سلولی سرطان پانکراس، کلون، ملانوما، روده و سینه می شود. همچنین مطالعات متعددی که بر روی مدلهای حیوانی صوموش صحرایی گرفته است حاکی از اثر ضد توموری این مولکول در موجود زنده نیز می باشد. مطالعات بالینی بر روی انسان نیز نشان می دهد که ATP اثرات مؤثری در درمان برخی بیماریها دارد در حالی که هیچ اثر جانبی از آن مشاهده نشده است (۲٤).

در این مطالعه PAB به عنوان یک فاکتور که تصویری از فعالیت استرس اکسیداتیو و مقایسه آن با سیستم آنتی اکسیدانی است مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر میزان PAB بعد از ۸ هفته تمرین کاهش نشان داد. صرفه نظر از تمرین استقامتی و بذر کدو خود نیز به تنهایی توانسته اثرات معناداری بر PAB داشته باشد به طوری که با افزایش دوز مصرفی میزان PAB کاهش بیشتری داشته است. از طرف دیگر تعامل بین تمرین و بذر کدو سبب کاهش معنادار در میزان PAB در هر دو گروه شده است (p=001/0). سیف و همکاران در سال۲۰۱٤ نشان دادند که ترکیبات موجود در کدو می تواند کبد را در برابر سمیت کبدی ناشی از الکل و استرس اکسیداتیو حفظ کند (۱۲). اسیدهای چرب غیراشباع، پیش–ساز اولیه بسیاری از ترکیبات لیپوئیک اند که در واکنش التهابی نقش دارند که در کدو به وفور یافت می شوند. در مطالعه ی ابوسیف در سال ۲۰۱٤ که با عنوان تأثیر روغن بذر کدو بر مواجهه با مسمومیت کبدی ناشی از الکل و استرس اکسیداتیو انجام شده است مشاهده می شود که مکمل دهی با روغن بذر کدو به موش های صحراییی که با الکل مسموم شده بودند و موش هایی که تحت استرس اکسیداتیو قرار گرفته بودند در هر دو گروه بر شاخص های مسیر آپاپتوز در بافت کبد تأثیر داشت و باعث کاهش این شاخص ها شد و این مطالعه نتیجه می گیرد که ظاهراً ترکیباتی در روغن تخم کدو وجود دارد که بدن را در برابر استرس اکسیداتیو و الکل محافظت می نماید (۱۲). انجام تمرینات ورزشی از طریق افزایش عوامل آنتی اکسیدانی می تواند میزان استرس اکسیداتیو بعد فعالیت را کاهش دهد که این مکانیسم یکی از سازگاری های است که بدن با تمرین می تواند کسب کند از طرفی بذر کدو نیز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده که به نظر می رسد اثرات تمرین و بذر کدو توانسته است میزان استرس اکسیداتیو را بیشتر کاهش دهد به طوری که با افزایش دوز مصرفی کدو، میزان استرس اکسیداتیو در گروه تمرین کرده بیشتر کاهش نشان داد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت MDA در پایان دوره به طور معنی داری در گروه های بدون مکمل بیشتر از گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز یک گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن و گروه دریافت کننده بذر کدو با دوز دو گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بود. همچنین میزان MDA در گروه دریافت دوز دو کمتر از دوز یک بود (P=۰/۰۰۱). به صوموش صحرایی کلی میانگین گروه هایی که تمرین نکرده بودند به صوموش صحرایی معنی داری از گروه هایی که تمرین کرده بودند بیشتر بود. با افزایش دوز مصرفی، غلظت MDA به صوموش صحرایی کلی کاهش یافت. الگوی تغییرات در دوزهای مختلف با توجه به تمرین کردن یا تمرین نکردن مشابه بود. لذا با وجود معنی دار بودن اثر اصلی تمرین و مکمل، تعاملی مشاهده نشد و نتایج نشان داد که تمرین هوازی و مکمل بذر کدو بر غلظت MDA عضله نعلی در موش های صحراییی مسموم شده با پراکسید هیدروژن اثر معنی دار ندارد. این نتایج با تحقیق حبیبان و همکاران (۱۳۹۲) همسو است آن ها در مطالعه ای اثر حمایتی تمرین هوازی بر استرس اکسیداتیو ناشی از سرب در مخچه موش صحرایی را مورد بررسی قرار دادند که تیمار مزمن با استات سرب سطوح MDA مخچه ای را در موش ها افزایش داد، اما اثر متقابل تمرین هوازی و استات سرب سطوح MDA را کاهش داد (۲۵). همچنین مطالعه، اعظمیان جزی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که تمرینات منظم هوازی تأثیر مثبت و معناداری بر کاهش سطوح مالون دی آلدهید دارد که با تحقیق حاضر همسو می باشند. ماروسی و همکاران در سال ۲۰۱۲ تحقیقی با عنوان تأثیر

تمرینات بلند مدت هوازی بر کاهش استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش های سالم را بررسی کردند (۲۷،۲۶). علت عدم تغییر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی به دنبال تمرین هوازی در این تحقیق را می توان توسط چند عامل توجیه کرد. این احتمال وجود دارد که شدت تمرین به کار گرفته شده، در حدی نبوده است که میزان تولید گونه های اکسیژن فعال را افزایش داده باشد. از طرف دیگر، این احتمال وجود دارد که انجام تمرینات منظم با شدت های کم، سبب ایجاد سازگاری در سیستم ضد اکسایشی بدن شود (۲۸). از این رو می توان گفت که میزان طبیعی آنزیم های آنتی اکسیدانی، پاسخگوی مقابله با رادیکال های تولید شده در اثر این نوع تمرین بوده اند که می تواند توجیه مناسبی برای عدم تغییر در فعالیت این آنزیم ها به حساب آید. نوع تمرین (مدت و شدت) و بافتی که برای تحقیق به کار گرفته می شود، تأثیر زیادی در نتایج تحقیق دارد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تمرین استقامتی همراه با بذر کدو سبب کاهش عوامل استرس زا می شود. این نتایج نشان داد که بذر کدو خاصیت آنتی اکسیدانی و سبب بهبود ریکاوری بعد فعالیت می شود. این تحقیق اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی بذر کدو در مطالعات قبلی را بیشتر تأیید می کند.

منابع

1. Wang M, Zheng Y. Oxidative stress and antioxidants in the trabecular meshwork. Peer Journal 2019;7:e8121.
2. Mohammadjafari H, Arazi H, Nemati N, Bagherpoor T, Suzuki K. Acute Effects of Resistance Exercise and the Use of GH or IGF-1 Hormones on Oxidative Stress and Antioxidant Markers in Bodybuilders. Antioxidants 2019;8(12):587.
3. Madany J. Serum malondialdehyde level and activity of total antioxidant status of dogs with age-related cataract. Polish Journal of Veterinary Sciences 2016;19(2):429-31.
4. Fairus AM, Choudhary B, Hosahalli S, Kavitha N, Shatrah O. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors affect ATP depletion, endogenous ROS and mediate S-phase arrest in breast cancer cells. Biochimie 2017;135:154-63.
5. Francesca M, Tania F, Riccardo M, Michele M, Tania G, Pietro M, Alessandra M. Oxidative stress in exercise training: the involvement of inflammation and peripheral signals. Free Radical Research 2019;1-301.
6. Kattoor AJ, Pothineni NV, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. Current Atherosclerosis Reports 2017;19(11):42.
7. Liang R, Shao X, Shi Y, Jiang L, Han G. Antioxidant defenses and metabolic responses of blue mussels (Mytilus edulis) exposed to various concentrations of erythromycin. Science of The Total Environment 2020;698:134221.
8. Park SY, Kwak YS. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. Journal of Exercise Rehabilitation 2016;12(2):113.
9. Tartibian B, Baghaei B, Baradaran B. Catalase enzyme gene expression and oxidant markers' levels in trained women: effect of incremental exercise. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 2013;20(6):778-88.
10. Shiri E, Rahnema M, Bigdeli M. The effect of pumpkin seed oil (Cucurbita Moschata) on the permeability of the blood -brain barrier and on brain edema in stroke animal model. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences 8(2):301-311.

11. Ghanbari-Niaki A, Fathi R, and Hedayati M. Effect of 8 Weeks Endurance Training With Two Different Durations on Plasma HDL-Ghrelin in Male Rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2011;13(3):309-314.

12. Seif HS. Ameliorative effect of pumpkin oil (Cucurbita pepo L.) against alcohol-induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 2014;3(3):178-85.

13. Chen L, Huang G. Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules 2018;118:770-4.

14. Zhao S, Liang T, Zhou T, Li D, Wang B, et al. Biotransformation and responses of antioxidant enzymes in hydroponically cultured soybean and pumpkin exposed to perfluorooctane sulfonamide (FOSA). Ecotoxicology and Environmental Safety 2018;161:669-75.

15. Fusco D, Colloca G, Monaco M R L, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clinical Interventions in Aging 2007; 2(3):377.

16. Dabidi Roshan V, Moslehi Najafabadi E. The Effect of short-term vitamin E supplementation on some indexes of sport performances and lipid per-oxidation in healthy men. World Journal of Sport 2009; 2(2):75-81.

17. Gomes E C, Silva A N, Oliveira M R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2012:756132.

18. Holeček M, Vodeničarovová M. Effects of histidine load on ammonia, amino acid, and adenine nucleotide concentrations in rats. Amino Acids 2019; 11:1-4.

19. Ghanbari-Niaki A, Kraemer R, Abednazari H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. Hormone and Metabolic Research 2011; 43(2): 112-116.

20. Houghton C R, Hawkins R A, Williamson D H, Krebs H A. The effects of physical training on the metabolic response to short-term severe exercise in the rat. Biochemical Journal 1971;124(5): 57P.

21. Broxterman RM, Layec G, Hureau TJ, Morgan DE, Bledsoe AD, et al. Bioenergetics and ATP synthesis during exercise: role of group III/IV muscle afferents. Medicine and Science in Sports and Exercise 2017;49(12):2404.

22. Gastin PB. Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. Sports Medicine 2001;31(10):725-41.

23. Zieliński J, Slominska EM, Król-Zielińska M, Krasiński Z, Kusy K. Purine metabolism in sprint-vs endurance-trained athletes aged 20–90 years. Scientific Reports 2019;9(1):1-0.

24. Puthucheary ZA, Astin R, Mcphail MJ, Saeed S, Pasha Y, Bear DE, Constantin D, Velloso C, Manning S, Calvert L, Singer M. Metabolic phenotype of skeletal muscle in early critical illness. Thorax 2018;73(10):926-35.

25. Habibian M, Dabidi Roshan V, Moosavi SJ, Mahmoody SA. Neuroprotective effect of aerobic training against Lead-induced

oxidative stress in rat cerebellum. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2013;15(3):39-45.

26. Azamian Jazi A, Shokouhi R. The Effect of an Eight Week Combined Exercise Training on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 2016;24(8):667-78.

27. Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. Neuroscience 2012;226:21-8.

28. Bellafiore M, Bianco A, Battaglia G, Naccari MS, Caramazza G, et al. Training session intensity affects plasma redox status in amateur rhythmic gymnasts. Journal of Sport and Health Science 2019;8(6): 561–566.