

Original Article

Action of L-Arginin on oxidative- nitrosative stress induced by acute exercise in muscle of rats

Masume Kazemi¹, Sayed Mohammad Marandi¹, Ahmad Movahedian^{2*}, Zeinab Rezaee³, Hossien Mohammadian⁴,
Samaneh Noori Emamzadeh⁵

¹Department of Exercise Physiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

²Department of Clinical Biochemistry, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³Student of Exercise Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴Student of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵The School of Science, Department of Statistics, University of Isfahan, Isfahan, Iran

*Corresponding author; E-mail: movahedian.ahmad@gmail.com

Received: 9 November 2016 Accepted: 15 January 2017 First Published online: 29 April 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July; 40(2):64-71

Abstract

Background: Acute phase exercises can cause severe morphological damages to skeletal muscles involved in those activities. According to the growing importance of sports supplements, the aim of the present investigation was to evaluate the effect of L- Arginine supplements on the oxidative and nitrosative stress induced in gastrocnemius muscle acute exercises in rats.

Methods: Thirty two male Vistar rats were randomly divided into four groups: sedentary control (SC); sedentary control with L-Arg treatment (SC + Arg); exhaustive exercise (E); and exhaustive exercise with L-Arg treatment (E + Arg). E and E+Arg groups performed a 1 hour acute running test, or until exhaustion on a treadmill (16-26 m/min) and Arg and E+Arg groups treated orally with the L-Arg (2% diet, for 30 days). Sampling was performed 1 hour after exercise. Nitric oxide production was evaluated by measuring nitrite formation, using Griess reagent. oxidant-Antioxidant's ratio was measured as TOS / TAC levels.

Results: Acute exercise decreased NO in (SC + Arg), (E) and (E + Arg) groups compared to the control group but it was significant change just in (E + Arg) group. The antioxidant-oxidant's balance of TOS / TAC decreased in (E) group compared to the control group. CPK increased in (E), (SC + Arg) and (E+Arg) groups compared to the control group (SC). ($p \leq 0.05$).

Conclusion: The results of the present study didn't show existence of oxidative-nitrosative stress and supplementation effect in gastrocnemius muscle 1 h after the acute phase exercise.

Keywords: Acute Exercise, Oxidative-Nitrosative Stress, L- Arginine, Nitric Oxide

How to cite this article: Kazemi M, Marandi S.M, Movahedian Attar A, Rezaee Z, Mohammadian H, Noori Emamzadeh S. [Action of L-Arginin on oxidative- nitrosative stress induced by acute exercise in muscle of rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July;40(2):64-71. Persian.

مقاله پژوهشی

اثر ال-آرژنین بر استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو احتمالی ناشی از فعالیت ورزشی حاد در عضله دوقلو موش نر ویستار

معصومه کاظمی^۱، سید محمد مرندی^۱، احمد موحدیان^{۲*}، زینب رضایی^۳، حسین محمدیان^۴، سمانه نوری^۵

^۱گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^۲گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۳دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^۴دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۵دانشکده علوم پایه، گروه ریاضی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^{*} نویسنده مسئول؛ ایمیل: movahedian.ahmad@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۲/۹
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۷؛ ۴۰(۲): ۶۴-۷۱

چکیده

زمینه: ورزش شدید یا حاد می‌تواند موجب آسیب مورفولوژیک به عضلات اسکلتی درگیر در فعالیت شود و با توجه به گرایش روزافزون به مصرف مکمل‌های ورزشی، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر مکمل دهی ال-آرژنین بر تغییرات استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو احتمالی ناشی از فعالیت ورزشی حاد در عضله دوقلو موش می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۳۲ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی (۲۱۰-۱۶۰g) به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (C)، ورزش حاد (E)، مکمل ال-آرژنین (Arg) و ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین (E+Arg)، تقسیم شدند. ال-آرژنین به میزان دو درصد رژیم غذایی به دو گروه Arg و E+Arg طی ۳۰ روز خورانده شد. برای اعمال فعالیت ورزشی حاد دو گروه E و E+Arg با سرعت ۱۶-۲۶ متر بر ثانیه، به مدت ۱ ساعت و یا تا رسیدن به واماندگی بر روی تردمیل مخصوص دویدند. بافت برداری ۱ ساعت پس از فعالیت ورزشی حاد صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها تست آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی دانت با سطح خطای ۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها: میزان نیتریک اکساید در سه گروه ورزش حاد، مکمل ال-آرژنین، ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین در مقایسه با گروه کنترل، کاهش داشت که فقط در گروه ورزش+مکمل معنی‌دار بود. نسبت اکسیدان-آنتی اکسیدان (TOS /TAC) در عضله گروه ورزش حاد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. کراتین فسفوکیناز در سه گروه ورزش حاد، مکمل ال-آرژنین و ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین نسبت به گروه کنترل افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: در حال حاضر به دلیل محدودیت منابع در خصوص نتیجه‌گیری درباره اثرات ال-آرژنین بر تغییرات مارکرهاى مورد بررسی و افزایش کاهش استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو پس از فعالیت ورزشی حاد در عضله دوقلو، نمیتوان سازوکارهای دقیق و دخیل را در این حیطه عنوان کرد.

کلید واژه‌ها: فعالیت ورزشی حاد، استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو، ال آرژنین، نیتریک اکساید

نحوه استناد به این مقاله: کاظمی م، مرندی س م، موحدیان عطار ا، رضایی ز، محمدیان ح، نوری س. اثر ال-آرژنین بر استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو احتمالی ناشی از فعالیت ورزشی حاد در عضله دوقلو موش نر ویستار. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۴۰(۲): ۶۴-۷۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپیروایت (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

اگر چه ورزش دارای اثرات سودمندی است، ورزش شدید یا حاد می‌تواند موجب آسیب مورفولوژیکی به عضلات اسکلتی درگیر در فعالیت، و همچنین به ارگان‌های دیگر شود. آسیب بافتی ناشی از ورزش حاد یا مزمن از آسیب فیزیکی قابل توجهی به آسیب تحت سلولی منتهی می‌شود. چنین آسیبی ممکن است از استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS Reactive Oxygen Species) باشد، که بسته به نوع اندام یا بافت و سطح آنتی اکسیدانی درون زاپاس‌های مختلف موجود می‌آورد. افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی پس از ورزش با حداکثر سرعت دویدن، در نمونه‌های خون ورزشکاران سرعتی و در عضله اسکلتی موش‌ها پس از حداکثر سرعت دویدن و ورزش حاد شناسایی شده است (۱). رادیکال آزاد اتم یا مولکولی است که با داشتن یک یا چند الکترون جفت نشده و قابلیت تکثیر در بیشتر سلول‌ها، توانایی آسیب به بافت‌های مختلف را دارد (۲). نوع ورزش، شدت و طول مدت آن، و همچنین نمونه‌های مورد آزمایش، همه می‌تواند میزان اکسیداسیون را تحت تأثیر قرار دهند (۳). تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS Reactive Oxygen and Nitrogen Species) در واقع می‌تواند از قرار گرفتن در معرض انواع محرک‌ها، از جمله، استرس‌های جسمانی مانند ورزش‌های هوازی و بی‌هوازی حاد، و همچنین از طریق مواد غذایی مصرفی و مراحل آزاد شدن انرژی در بدن، ایجاد شود (۴). تولید RONS و استرس اکسیداتیو-نیتروژن حاد می‌تواند از طریق چند مسیر، در پاسخ به ورزش حاد رخ دهد. این موارد شامل تنفس میتوکندریایی (نشت الکترون از زنجیره انتقال الکترون و تولید متعاقب رادیکال سوپراکسید)، متابولیسم پروستاگلندین، خود اکسیداسیونی کاتکولامین‌ها، و فعالیت آنزیمی NADPH اکسیداز و گزانتین اکسیداز می‌باشند. افزایش اولیه در RONS طی ورزش و همچنین به دنبال توقف آن، می‌تواند به تولید ثانویه پراکسیدان‌های اضافی منجر شود (۳).

در فعالیت ورزشی شدید با افزایش سطح برخی رادیکال‌های آزاد و همچنین افزایش آنزیم کراتین فسفوکیناز (CPK)، افزایش در تولید و رهاسازی آنتی اکسیدان‌ها از دستگاه ایمنی بدن گزارش شده است. کراتین فسفوکیناز آنزیمی است که در تولید انرژی در شرایط بی‌هوازی دخالت دارد و یکی از روش‌های اندازه‌گیری فشار اکسایشی ناشی از تخریب بافت سلول اندازه‌گیری این آنزیم است (۲ و ۵). همچنین تمرین ورزشی حاد یا نا آشنا می‌تواند موجب آسیب عضلانی و بافت همبند شود و با یک پاسخ التهابی و آزاد شدن CPK همراه می‌شود (۶).

سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بدن ترکیبات مختلف آنزیمی (مثل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پاراکسوناز و گلوکاتینون پراکسیداز) و غیر آنزیمی (مثل ویتامین E، C و A) را شامل می‌شود که در

پیشگیری و یا کاهش فشارها و آسیب‌ها، پس از فعالیت بدنی نقش دارد. هر یک از این ترکیبات، نقش منحصر به فردی دارند و برآیند آن‌ها تحت عنوان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (Total Antioxidant Capacity, TAC) بدن نامیده می‌شود (۷). کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی، محافظت در برابر ROS و (Reactive Nitrogen Species, RNS) را مختل می‌کند و از طریق آسیب رسیدن به دیواره سلول‌ها، میتوکندری‌ها، DNA و پروتئین‌های عملکردی، اختلال در سلول، و حتی آپوپتوزیس یا مرگ سلول را ممکن است در پی داشته باشد. استرس اکسیداتیو-نیتروژن زمانی اتفاق می‌افتد که یک عدم تعادل در دفاع آنتی اکسیدانی با توجه به افزایش تولید ROS و RNS وجود داشته باشد که ممکن است با کاهش غلظت آنتی اکسیدان در بدن و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ایجاد شود (۸).

RNS نیز مانند ROS، می‌تواند نقش مهمی در پاتوژنز برخی بیماری‌ها بازی کنند که در سال‌های اخیر توجه به سمشان معطوف شده است. نیتریک اکساید (Nitric oxide/ NO) تولید شده توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز یکی از مهم‌ترین و گسترده ترین زمینه‌های مورد مطالعه RNS است (۹). نیتریک اکساید رادیکال آزادی است که به عنوان مولکول پیام رسان و در دفاع بدن از اهمیت عمده‌ای برخوردار است. با این حال، در غلظت‌های بالا، در همه سلول‌ها سمی است. NO می‌تواند منجر به کاهش یا اکسایش شده و در نتیجه یک سری از ترکیبات که در مجموع به عنوان گونه‌های نیتروژن واکنش پذیر خوانده می‌شوند، ایجاد کند. چنان که غلظت آن از حد طبیعی بالاتر رود، احتمالاً به عنوان یک عامل محدود کننده فعالیت، می‌تواند عملکرد ورزشی را تحت تأثیر قرار دهد (۱۰ و ۱۱). نیتریک اکساید از واکنش مولکول اکسیژن با نیتروژن گوانیدین انتهایی اسید آمینه ال-آرژنین تولید می‌شود. کاتالیز این واکنش توسط خانواده‌ای از آنزیم‌های سنتز کننده نیتریک اکساید (Nitric Oxide Synthetase, NOS) صورت می‌گیرد (۱۲).

همچنین قادر است با مولکول اکسیژن واکنش ایجاد نموده دی نیتروژن تری اکسید (N_2O_3) تولید نماید که این ماده باعث دامینه شدن DNA می‌شود. علاوه بر این N_2O_3 می‌تواند با مولکول‌های اکسیژن دیگری مانند سوپراکسید (O_2^-)، (از گونه‌های واکنشگر اکسیژنی که به سرعت با نیتریک اکساید در عروق واکنش می‌دهد) واکنش ایجاد نموده پراکسی نیتريت ($ONOO^-$) تولید کند، که این ماده باعث آسیب‌های بافتی می‌شود. همچنین اخیراً مشخص شده است که NO می‌تواند سلول‌های بدن را در برابر اکسیدانت‌ها حفاظت نماید (۱۳).

ال-آرژنین اسید آمینه‌ای نیمه ضروری است که بسته به مرحله رشد و وضعیت سلامتی فرد ضروری می‌باشد. به عنوان پیش ماده

حیوان به دویدن، از شوک الکتریکی خفیف در قسمت انتهایی نوارگردان استفاده می‌شد. این دو هفته تمرین برای این منظور طراحی شد که موش‌ها با تردمیل و دویدن بر روی آن آشنا شوند. حیوانات در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف نگهداری می‌شدند. در نهایت گروه‌های ورزش حاد و مکمل + ورزش حاد در روز آزمایش نهایی، با شدت تمرینی ۲۶-۱۶ متر در دقیقه برای ۱ ساعت و یا تا رسیدن به واماندگی بر روی تردمیل دویدند. ملاک خستگی عدم توان موش در حفظ قامت در مسیر مستقیم و ادامه دویدن با سرعت تردمیل (عقب ماندن) بود (۱۹). یک ساعت پس از انجام کار (۱)، موش‌ها از طریق استنشاق ماده اتر (۲۰)، بیهوش شدند.

بعد از خونگیری، برشی به طول ۴-۳ سانتی‌متر در ناحیه بالای ران جانور ایجاد شد، پس از برداشتن پوست به کمک خط تاندون عضلانی، بافت عضله دوقلو جدا شد بر روی یخ قرار داده شد. بافت آماده شده جهت هموژن به یخچال ۲۰- منتقل شد. پس از شستشوی بافت با سرم فیزیولوژی، تکه‌ای از آن جدا شده و به نسبت ۴ به ۱ به ترتیب از فسفات بافر و بافت عضله جهت هموژن استفاده شد. با استفاده از تعدادی گویچه‌ی شیشه‌ای (پرل)، طی سه مرحله یک دقیقه‌ای با استفاده از هموژنایزر MS-100، بافت آماده شد. پس از هر مرحله میکروتیوب‌ها با استفاده از یخ کاملاً سرد می‌شدند، و در نهایت توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت، با سمپلر برداشته شد و جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین بافتی و سایر اندازه‌گیری‌ها تمامی نمونه‌های آماده شده به یخچال ۲۰- منتقل شدند.

نحوه سنجش TOS: به روش (FOX-1 Ferrous ion oxidation xyleneol orange version 1)، معرف FOX-1، زایلینول ارینج ۱۰۰ میکرومولار، آمونیوم فروس سولفات ۲۵۰ میکرومولار، سوربیتول ۱۰۰ میکرومولار، و اسید سولفوریک ۲۵ میلی‌مولار تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از نمونه در یک میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتر به ۹۵۰ میکرولیتر از معرف FOX-1 افزوده و ورتکس شد و برای ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۴۰ درجه سانتیگراد (بدون CO₂) انکوبه گردید. جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر، خوانده شد (نمونه‌ها تیره رنگ می‌شود).

نحوه سنجش TAC: روش (FRAP Ferric reducing ability of plasma)، بر اساس توانایی پلازما در احیای یون‌های Fe³⁺ (فریک) به Fe²⁺ در حضور ماده‌ای به نام TPTZ استوار است و کمپلکس Fe²⁺-TPTZ کمپلکس آبی رنگ با ماکزیمم جذب در طول موج ۵۹۳ nm است که میزان قدرت احیا کنندگی سرم یا پلازما از طریق افزایش غلظت کمپلکس فوق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر را به دست می‌دهد (۲۱).

برای کراتین است، که نقش مهمی در متابولیسم انرژی عضلانی و اعصاب بازی می‌کند (۱۴). سه ایزوform آنزیم سنتز کننده آرژنین (NOS) برای سنتز به آرژنین نیاز دارند (۱۵). تغییرات غلظت آرژنین، ممکن است تولید و فعالیت NO را تحت تاثیر قرار دهد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که یک رژیم با مکمل‌دهی ال-آرژنین به طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو قلبی و ریوی در طول ورزشی درمانده ساز در موشهای صحرایی جوان SD را کاهش می‌دهد (۱۶ و ۱۷). از طرفی با توجه به آثار مخرب NO در غلظت-های بالا، NO تولید شده بر اثر تمرین، احتمال دارد به سلول صدمه بزند (آثار سیتوتوکسیک، سیتواستاتیک نیتریک اکساید)، احتمالاً به عنوان یک عامل محدود کننده فعالیت، می‌تواند عملکرد ورزشی را تحت تاثیر قرار دهد. برای مثال، افزایش بیش از حد NO مانع از مصرف اکسیژن و متعاقب آن کاهش ظرفیت هوازی می‌شود (۱۲).

امروزه با روی آوردن ورزشکاران به مصرف مکمل‌ها از جمله ال-آرژنین، که پیش ساز NO می‌باشد، این فرضیه مطرح است که مکمل ال-آرژنین ممکن است استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو احتمالی ناشی از ورزش وامانده ساز را تحت تاثیر قرار داده و یا بر بافت‌های مهم تاثیر پذیر از فعالیت ورزشی حاد، چون عضله اثرات مفیدی داشته باشد. بنابراین در تحقیق حاضر به بررسی اثر یک دوره مکمل‌دهی ال-آرژنین بر استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو احتمالی ناشی از فعالیت ورزشی حاد می‌پردازیم.

روش کار

نمونه آماری این تحقیق ۳۲ سر موش نر نژاد ویستار ۴-۳ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۲۰-۱۶۰ گرم می‌باشد که از لانه حیوانات دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه گردیدند. موش‌ها در لانه حیوانات دانشکده داروسازی، تحت شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۲۳±۱) درجه سانتی‌گراد و رطوبت (۳±۵ درصد) در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند و در سرتاسر دوره تحقیق، توسط یک کارشناس جابجا می‌شدند. موش‌ها به ۴ گروه کنترل، مکمل ال-آرژنین، ورزش حاد و مکمل + ورزش تقسیم شدند. به گروه‌های مکمل و مکمل + ورزش طی ۳۰ روز به میزان ۲٪ رژیم غذای روزانه مکمل ال-آرژنین (۱۸) (محصول شرکت داروسازی و مکمل‌های غذایی حیاتی کارن) خورانده شد. جهت کنترل استرس وارده از طریق خورانده شدن مکمل با لوله، به موش‌های دو گروه دیگر طی این ۳۰ روز به همین روش آب خورانده شد. دو هفته قبل از روز آزمایش، موش‌های تمامی گروه‌ها ۲ روز در هفته به مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۱۶ متر در دقیقه در هر روز بر روی نوار گردان مخصوص موش‌های صحرایی می‌دویدند. برای وادار کردن

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار نیتریک اکساید، اکسیدان/آنتی اکسیدان و کراتین فسفوکیناز به دنبال فعالیت ورزشی حاد و استفاده از مکمل

مارکرهای مورد بررسی	کنترل	ورزش حاد	مکمل	مکمل + ورزش حاد
نیتریک اکساید میکرومول/میلی گرم $\times 10^{-3}$	$9/84 \pm 2/33^{ab}$	$7/40 \pm 0/83^{ab}$	$7/19 \pm 0/67^{ab}$	$6/83 \pm 0/51^d$
اکسیدان/آنتی اکسیدان میلی مول/میلی گرم	$16/20 \pm 0/94^d$	$11/14 \pm 2/33^a$	$14/35 \pm 3/49^{ab}$	$15/14 \pm 2/99^{ab}$
کراتین کیناز یک واحد بین الملل/لیتر	$246/85 \pm 83/06^a$	$1418/25 \pm 386/12^c$	$1079/28 \pm 141/02^{bc}$	$862 \pm 260/34^d$

^{a,b,c,d} میانگین‌هایی که با حرف لاتین مشابه مشخص شده‌اند، از نظر آماری (آزمون تعقیبی دانت) تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد ندارند.

جدول ۲: تحلیل واریانس اثر ال-آرژنین بر میزان نیتریک اکساید، اکسیدان/آنتی اکسیدان و کراتین کیناز به دنبال فعالیت ورزشی حاد

مارکرهای مورد بررسی	درجه آزادی ۱	درجه آزادی ۲	آماره آزمون F	سطح معناداری آزمون F
نیتریک اکساید	۳	۲۸	۸/۰۵	۰/۰۰۶*
اکسیدان/آنتی اکسیدان	۳	۲۸	۴/۱۲۲	۰/۰۱۸*
کراتین کیناز	۳	۲۸	۲۹/۸۶۱	۰/۰۰۰۱*

*در سطح ۵ درصد معنادار است. ($P < 0/05$)

اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید در عضله: به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر نیتریک اکساید، اندازه‌گیری مستقیم آن نسبتاً مشکل است، لذا اندازه‌گیری آن با استفاده متابولیت‌های پایدارش صورت می‌گیرد. این سنجش تخمین قابل اطمینانی از برون ده نیتریک اکساید در محیط *in vivo* فراهم می‌آورد. همبستگی بالایی بین تولید نیتریک اکساید درون زا و سطوح نیتريت/نیترات (NOX) در سرم، پلاسما و ادرار گزارش شده است. ساده‌ترین و رایج‌ترین روش اندازه‌گیری این آنیون‌ها روش رنگ سنجی بر مبنای واکنش گریس می‌باشد. اساس این واکنش تشکیل رنگ از دی‌آزوتاسیون یک سولفانامید به کمک نیتريت در محیط اسیدی و سپس کنژگاسیون آن با یک آمین آروماتیک مثل NEDD (N-1-naphthyl ethylenediamine) می‌باشد (۲۲).

روش‌های آماری: پس از ورود داده‌ها به نرم افزار SPSS، توزیع طبیعی داده‌ها به وسیله آزمون کلموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. میانگین و انحراف معیار هر یک از شاخص‌های بیوشیمیایی محاسبه و نتایج مربوط با استفاده از تحلیل واریانس تک راهه بین گروه‌های مذکور در سطح خطای ۵ درصد، مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت از آزمون تعقیبی دانت برای مقایسه جفتی بین گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

طبق اندازه‌گیری‌هایی که یک ساعت پس از فعالیت ورزشی حاد صورت گرفت میزان نیتریک اکساید در سه گروه ورزش حاد، مکمل ال-آرژنین، ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین در مقایسه با گروه کنترل، کاهش داشت، اما این کاهش فقط در گروه ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین معنی‌دار بود. نسبت اکسیدان-آنتی اکسیدان (TOS/TAC) در عضله گروه ورزش حاد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. کراتین فسفوکیناز در این سه گروه نسبت به گروه کنترل افزایش داشت، این در حالیست که کراتین

فسفوکیناز گروه مکمل تفاوت معناداری با کراتین گروه ورزش حاد ندارد. همچنین کراتین فسفوکیناز گروه مکمل + ورزش حاد تفاوت معناداری با کراتین فسفوکیناز گروه مکمل ندارد.

بحث

میزان نیتریک اکساید در سه گروه ورزش حاد، مکمل ال-آرژنین، ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین در مقایسه با گروه کنترل، کاهش داشت اما این کاهش فقط در گروه ورزش حاد + مکمل ال-آرژنین معنی‌دار است. که با پژوهش Lin و همکاران بر عضله قلب بدنبال فعالیت ورزشی حاد، و Khosravi و همکاران اندازه‌گیری NO در خون بدنبال یک دوره تمرین استقامتی، همخوانی ندارد اما طبق گزارش Kazeem و دیگران شاید بتوان عدم تغییر یا کاهش NO را به خاصیت آنتی اکسیدانی و مصرفش در این زمینه نسبت داد (۱۷ و ۲۱)؛ از طرفی در پژوهش Paula و همکاران (۱)، بدنبال ورزش حاد، علی‌رغم گزارش استرس اکسیداتیو-نیتروزی با افزایش میزان نیتريت و پراکسیداسیون لیپیدی در بافت‌های مختلف کبد، عضله و مغز، زمان پاسخ اندام‌ها به ورزش حاد را متفاوت اعلام کرده‌اند. نتایج این کار با پژوهش حاضر همخوانی ندارد که می‌تواند به سن موش‌ها، نوع عضله، و نحوه اعمال فعالیت ورزشی حاد مربوط باشد. اما درکل بنظر می‌رسد جهت بررسی تغییر میزان نیتریک اکساید بدنبال تغییر استرس اکسیداتیو-نیتروزی با احتمالاً با ورزش حاد و در پی مصرف مکمل ال-آرژنین بهتر است بافت عضله همزمان با چند بافت دیگر مورد بررسی قرار گیرد تا امکان مقایسه و اظهار نظر در این زمینه بهتر فراهم شود. چراکه افزایش میزان نیتریک اکساید در کبد ۶ ساعت و در عضله ۱ ساعت پس از فعالیت ورزشی حاد گزارش شده است. طبق این پژوهش سطح پایه نیتريت در عضله تیبال قدامی پنج برابر کبد و فعالیت NOS در عضله اسکلتی در مقایسه با سایر ارگان‌ها بیشتر اعلام شده است. همچنین این اختلاف زمانی در

با تولید سوپر اکسید و اکسی رادیکال ها در حین ورزش درمانده ساز افزایش می دهد (۲۴). برخی مطالعات حیوانی نشان داده اند که ورزش، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در عضلات مخطط، و به میزان کمتر در بافت قلب و کبد را تحریک می کند و احتمالاً میزان تغییر در این شاخص ها به وضعیت تمرین و نوع تارهای عضلانی (کند یا تند انقباض) درگیر هم بستگی دارد. بین پژوهشگران در خصوص تاثیر ورزش بر فرآیند استرس اکسیداتیو و نیز بر سیستم آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی، اختلاف نظر وجود دارد. کورکو (۲۰۱۰) و لیروگراییل و همکاران (۲۰۰۵) به ترتیب در تمرین قدرتی و تمرینات فزاینده در افراد ورزشکار و غیرورزشکار، کاهش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را گزارش کرده اند، اما Afzalpour و همکاران با انجام یک جلسه تمرین حاد مقاومتی و هوازی، پاسخ افزایشی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی بدن و مهار پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تمرین را گزارش کرده اند (۷).

در پژوهش حاضر در پایان ۳۰ روز مکمل دهی ال-آرژنین و به دنبال فعالیت ورزشی حاد افزایش میزان کراتین کیناز پلاسما در سه گروه بیان شده ورزش حاد، مکمل ال-آرژنین و ورزش حاد+مکمل ال-آرژنین می تواند گویای آسیب عضلانی در این گروه ها باشد. بررسی محققین به افزایش آنزیم کراتین کیناز در اثر فعالیت شدید بدنی اشاره داشته و گزارش شده است که افزایش این آنزیم در خون نشان دهنده آسیب بافتی و شرایط التهابی می باشد (۲).

از آنجا که میزان CK به طور معنی داری در گروه مکمل + ورزش در مقایسه با ورزش کاهش داشت، نتایج با پژوهش Lin و همکاران (۱۷) همخوانی داشت. البته پژوهش مذکور بر عضله قلب طی فعالیت ورزشی انجام گرفته است. این فرضیه مطرح است که مکمل ال-آرژنین ممکن است سطح آسیب بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو در بافت عضلانی را کاهش دهد چرا که در مطالعه Lin و همکاران ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ مکمل ال-آرژنین به طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو قلبی و ریوی را در طول ورزش درمانده ساز در موش صحرایی کاهش داده است (۱۶ و ۱۷).

در پژوهشی افزایش میزان آن پس از ورزش استقامتی در گروه های مکمل و مکمل + ورزش حاد مربوط به رابطه ال-آرژنین و کراتین بیان شده است که کراتین پیش ساز CPK می باشد، از طرفی کاهش میزان آن در گروه مکمل + ورزش در مقایسه با گروه ورزش را نشان دهنده تاثیر مثبت توام مکمل و ورزش با هم بر کاهش میزان آن دانسته اند (۱۲).

نتیجه گیری

طبق یافته های پژوهش حاضر، کاهش میزان نیتریک اکساید بدنبال فعالیت ورزشی حاد می تواند دال بر افزایش رادیکال های

افزایش نیتريت پس از ورزش حاد، می تواند به افزایش مقدار کلسیم داخل سلولی الیاف عضلانی به هنگام انقباض مربوط باشد، چرا که هر دو ایزوفورم nNOS و eNOS برای فعال شدن به کلسیم به عنوان یک کوفاکتور نیاز دارند. شواهدی وجود دارد که کلسیم خارج سلولی می تواند در فعال شدن NOS تاثیر داشته باشد. مکانیسم کاهش NO در پژوهشی در اثر افزایش استرس اکسیداتیو گزارش شده است که کاهش NO و غیر فعال شدن آن، به علت ترکیب با رادیکال های آزاد بیان شده است، در فعالیت ورزشی نامنظم افزایش میزان رادیکال های آزاد را داریم، از طرفی تصور می شود عضله اسکلتی منبع اصلی تولید رادیکال های آزاد در حین ورزش باشد. عضله اسکلتی به علت تولید ROS فراوان در زمان ورزش تحت فشار اکسیداتیو بیشتری نسبت به کبد و قلب قرار می گیرد. همزمان با انجام تمرینات هوازی و هم بی هوازی رادیکال های آزاد فراوانی تولید می شود. شدت اختلال ایجاد شده در هموستاز اکسیداسیون/احیا در یک وهله ورزش به عوامل زیادی از جمله نوع و شدت ورزش، وضعیت جسمانی، سن، جنس و عادت غذایی ورزشکار بستگی دارد (۲۴).

مسیر احتمالی دیگر در دیگر مطالعات، که البته در کار ما بررسی نشده است؛ مسیر مهار و یا سرکوب گزانتین اکسیداز (یک متالوفلاووپروتئین) توسط NO فعال شده است، مطالعات متعدد نشان داده اند که NO با پیش ساز ال-آرژنین، عملکردهای تعدیلی بسیاری در سلول ها و بافت ها اعمال می کند. مهار XO توسط NO ممکن است از طریق اتصال مستقیم اعمال شود که می تواند منجر به تولید سوپر اکسید و هیدروژن پراکسید شود و به عنوان مکانیسم اصلی تولید رادیکال آزاد در برخی شرایط مانند تمرین ورزشی حاد یا بی هوازی باشد. در نتیجه کاهش گزانتین اکسیداز، احتمالاً به کاهش مکانیسم تولید رادیکال های آزاد منجر شود. برخی تحقیقات کاهش میزان XO و افزایش برخی آنزیم های آنتی اکسیدانی با مصرف ال-آرژنین را گزارش کرده اند (۲۰).

میزان NO با مصرف مکمل ال-آرژنین در مقایسه با سایر تحقیقات در دسترس گویا تغییر توجیه پذیری نداشته است، احتمالاً مقدار ال-آرژنین مصرفی در شرایط محیط زنده دارای آستانه است، به طوری که مقدار بالا، امکان جذب و انتقال سیستم های انتقالی را به داخل سلول ندهد و در مقدار پایین نیز به نظر می رسد، به علت زیر آستانه بودن فعالیت ال-آرژنین، نتواند با کاهش سوبسترا تاثیر مناسبی بر تولید NO ایجاد کند و فقط با آزمایشات بیشتر می توان درک درستی از آثار مفید و مضر بالقوه این مسیر مهم متابولیکی (ال-آرژنین - نیتریک اکساید) به دست آورد و حد مطلوبی از مقدار مکمل ال-آرژنین را برآورد کرد (۱۲). در مورد کاهش میزان نسبت اکسیدان/ آنتی اکسیدان در گروه ورزش حاد نسبت به گروه کنترل، مطالعات نشان داده اند که ورزش شدید فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را در نتیجه سازش

قدردانی

بدینوسیله از مسئولان محترم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در هموار کردن مسیر اجرای این پژوهش نقش بسزایی داشتند و همچنین شرکت داروسازی و مکمل‌های غذایی - حیاتی کارن، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

آزاد باشد اما اظهار نظر در مورد اثر یک دوره مکمل‌دهی ال-آرژنین بر تغییرات این مارکر و بالانس اکسیدان/آنتی اکسیدان و کراتین کیناز به بررسی‌های بیشتر با تعداد مارکر مورد بررسی بیشتری نیاز دارد، به عبارتی در حال حاضر به دلیل محدودیت منابع در خصوص نتیجه‌گیری درباره اثرات ال-آرژنین بر تغییرات مارکرهای مورد بررسی و افزایش یا کاهش استرس اکسیداتیو-نیتروزاتیو پس از فعالیت ورزشی حاد، بر عضله دوقلو نمی‌توان سازوکارهای دقیق و دخیل را در این حیطه عنوان کرد.

References

- Paula FB, Gouvêa CM, Alfredo PP, Salgado I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2005; **5**(1): 17-26. (Persian). doi: 10.1186/1472-6882-5-17
- Baghaiee B, Tartibian B, Baradaran B. The relationship between total antioxidant status with creatine phosphokinase and hydrogen peroxide in the athlete girls; influenced by acute exercise training. *Razi Journal of Medical Sciences* 2012; **19**(95): 43-45. (Persian).
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine* 2009; **8**(1): 1-25. doi: 10.1186/1476-5918-8-1
- Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Systemic oxidative stress is increased to a greater degree in young, obese women following consumption of a high fat meal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; **2**(1): 19-25. doi: 10.4161/oxim.2.1.7860
- Daneshmandi H, Bambaiechi E, Rahnama N. Response of some oxidative stress and inflammatory indicators to an acute exercise session following adaption to 8 weeks running training. *Sport Physiology* 2014; **23**: 95-108. (Persian).
- Narimani A, Gharakhanlou R, Aghayari A. The effect of short-term HMB supplementation on plasma creatinephosphokinase level after resistance training program, in untrained women. *JME* 2013; **2**(2): 149-163. (Persian).
- Afzalpour M.E, Saghebjoo M, Zarban A, Jani M. Comparison of the effects of an acute resistance and aerobic exercise session on the antioxidant defense system and lipid peroxidation of healthy young men. *Journal of Sport in Biomotor Sciences* 2012-2013; **6**(2): 39-50. (Persian).
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosamine stress (O & NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2011; **35**(3): 676-692. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004
- Wang G, Pierangeli S.S, Papalardo E, Ansari G, Khan M F. Markers of Oxidative and Nitrosative Stress in Systemic Lupus Erythematosus: Correlation with Disease Activity. *Arthritis & Rheumatism* 2010; **62**(7): 2064-2072. doi: 10.1002/art.27442
- Novo E, Parola M. Redox Mechanisms in Hepatic Chronic Wound Healing and Fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2008; **1**(1): 1-58. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S4
- Rogstam A, Larsson J.T, Kjølgaard P, Von Wachenfeldt C. Mechanisms of Adaptation to Nitrosative Stress in *Bacillus Subtilis*. *Journal of bacteriology* 2007; **189**(8): 3063-3071. doi: 10.1128/JB.01782-06
- Khosravi N, Gharakhanlou R, gaeini AA, Yaghmaei B. The Effect of Endurance Training Program and L-Arginine Supplementation on the Plasma Nitric Oxide in Rats. *Olympic Journal* 2004; **3**(27): 99-112. (Persian).
- Noori Mugahi SMH, Minaee B, Mehran Nia T, AzarNia M, Shirazi R. The Effects of L-Arginine and L-Name on Corpus Luteum and Growing Follicle Changes in Pregnant Rats. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2009; **17**(4): 1-8. (Persian).
- Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. 'L-Arginine'. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; **56**(9): 439-445. doi: 10.1016/S0753-3322(02)00284-6
- Mirfatahi M, Saedi Some Olia A, Sotoudeh G, Mohajeri-Tehrani MR, Keshavarz SA, Hosseini M, et.al. Effects of L-Arginine Supplementation on Blood Pressure in Obese Patients with Pre-Diabetes. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid* 2012; **11**(4): 393-399. (Persian).
- Lin W-t, Yang S-C, Chen K-t, Huang C-C, Lee N-Y. Protective Effects of L-Arginine on Pulmonary Oxidative Stress and Anti-Oxidant Defenses During Exhaustive Exercise in Rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; **26**(8): 992-999. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00155.x
- Lin W-T, Yang S-C, Tsai S-C, Huang C-C, Lee N-Y. L-Arginine Attenuates Xanthine Oxidase and Myeloperoxidase Activities in Hearts of Rats During

- Exhaustive Exercise. *British Journal of Nutrition* 2006; **95**(1): 67-75. doi: 10.1079/BJN20051602
18. Huang C-C, Lin T-J, Lu Y-F, Chen c-c, Huang C-Y, Lin W-T. Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. *Chinese Journal of Physiology* 2009; **25**(5): 306-315.
19. Ji L, Gomez-Cabrera M, Steinhafel N, Vina J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *The FASEB Journal* 2004; **18**(13): 1499-1506. doi:10.1096/fj.04-1846com
20. Huang C-C, Tsai S-C, Lin W-T. Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Experimental Gerontology* 2008; **43**(6): 571-77. doi: 10.1016/j.exger.2008.03.002
21. Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996; **239**(1): 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292
22. Ghasemi A1, Hedayati M, Biyabani H, Khosh Baten A, Asgari A.R. Protein Precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide End Products by the Griess Assay. *Journal of The Faculty of Medicine Shaheed Beheshti University of Medical Science and Health Services* 2007; **31**(1): 33-37. (Persian).
23. Kazeem A, Olubayo A, Ganiyu A. Plasma Nitric Oxide and Acute Phase Proteins after Moderate and Prolonged exercises. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2012; **15**(1): 602-607.
24. Riahy S, Mohammadi M.T, Sobhani V. Role of oxygen and nitrogen free radicals in diabetes-induced atherosclerosis and effects of exercise on it Role of oxygen and nitrogen free radicals in diabetes-induced atherosclerosis and effects of exercise on it. *Physiology and Pharmacology* 2014; **18**(1): 1-15. (Persian).