Sport Physiology **Volume 13, No 49, 2021, Page 65-88**

Research Paper

Effect of Aerobic Exercise and Ethanol Consumption on Nrf2 Gene Expression in Heart Tissue and Some Antioxidant Indices in Male Rats

Z. Farajtabar[1], R. Fathi[2], K. Nasiri [4], F. Ahmadi [5]

1. M.Sc. Graduate in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2. Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran (Corresponding Author)
3. Assistance Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
4. Ph.D. Graduate in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: 2019/07/11 **Accepted: 2019/09/16**

Abstract

There have been limited studies on the effect of the combination of aerobic exercise and alcohol consumption on regulators of antioxidant defense systems, especially erythroid nuclear factor 2 associated with factor 2 (Nrf2) in heart muscle. The aim of this study was to investigate the effect of eight-week aerobic exercise with ethanol consumption on Nrf2 gene expression in heart tissue and antioxidant parameters of plasma in male rats. Totally, 32 rats with an average weight of 230 ± 6 g were divided into four groups including control, aerobic exercise, ethanol 20% at a dose of 4 g/kgbw, and ethanol+ aerobic exercise. At the end of the period, levels of Nrf2 gene expression, total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) were evaluated. Data were analyzed by two-way ANOVA at the significant level of $p \leq 0.05$. The results showed that aerobic exercise had a significant effect on Nrf2 gene expression (P=0.0068). The results suggested no significant effect of ethanol consumption (P=0.312) and interaction effect between aerobic exercise and ethanol consumption (P=0.237) on Nrf2 gene expression. Aerobic exercise significantly increased the expression of Nrf2 gene in the aerobic exercise and ethanol+ aerobic exercise groups compared to the control. Ethanol consumption significantly reduced TCA and increased MDA levels compared to other groups. The findings suggested that ethanol consumption was decreased and plasma levels of TAC and MDA were increased, respectively. In contrast, aerobic exercise through increasing TAC and Nrf2 gene expression levels led to a decrease in the oxidative damage caused by ethanol consumption.

Keywords: Ethanol, Aerobic Exercise, Erythroid Nuclear Factor 2 Related to Factor (2) (Nrf2), Gene Expression, Antioxidant

1. Email: roz_fathi@yahoo.com; r.fathi@umz.ac.ir
2. Email: z.farajtabar19@gmail.com
3. Email: kh.nasiri@umz.ac.ir
4. Email: farhadahmadi19@yahoo.com

Extended Abstract

Background and Purpose

There have been limited studies on the effect of the combination of aerobic exercise and alcohol consumption on regulators of antioxidant defense systems, especially erythroid nuclear factor 2 associated with factor 2 (Nrf2) in heart muscle. The transcription factor Nrf2 is a major regulator of antioxidant proteins (1). Nrf2 is expressed in all tissues of the body, but most strongly in the heart, brain, kidney, muscle, lung, and liver (2). Regulation of Nrf2 transcription factor is affected by various factors including exercise (3). Physical activity has been suggested as a useful non-pharmacological approach to modulate gene expression of this antioxidant pathway, especially in the heart muscle. The aim of this study was to investigate the effect of eight-week aerobic exercise on the damages caused by 20% ethanol consumption on oxidative stress indices (malondialdehyde (MDA) and total capacity antioxidant (TAC)) in plasma and Nrf2 gene expression in the heart tissue in rats.

Materials and Methods

Totally, 32 male rats with an average weight of 230 ± 6 g were divided into four groups including control, aerobic exercise, ethanol 20% at a dose of 4 g/kgbw and ethanol+aerobic exercise. All groups were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (30-50 mg/kg body weight) and xylazine (3-5 m /kg body weight) 48 hours after the last ethanol ingestion and exercise session during overnight fasting. The blood sample was taken from the liver vein, and immediately the heart tissue was collected and frozen at -80°C. The whole RNA was extracted from the heart tissue of different rat groups. The extracted RNA samples were used for cDNA synthesis after genomic contamination with DNasI, RNase-free enzyme (Sinaclone, Iran). Nrf2 gene expression was evaluated using real-time PCR performed using SYBER Green qPCR Master Mixes (Ampliqon, Denmark) in Rotor gene 6000 (Corbett). Real-time PCR reactions were conducted in a final volume of 20 µl and each reaction was performed duplicate. The reaction mixture consisted of 3 µl cDNA (50 ng/µl), 8 µL RealQ Plus 2x Master Mix Green (Amplioqon, Denmark), 0.4 µL of each specific primer (10 pmol), and 8.2 µL of DNase/RNase free water. PCR in real-time was applied with the following primers: Forward: 5'- GCTGCCATTAGTCAGTCGCTCTC -3' and Reverse: 5'- ACCGTGCCTTCAGTGTGCTTC -3' for the rat Nrf2 gene (4) and Forward: 5'- GGCAAGTTCAACGGCACAG -3' and Reverse: 5'- GACGCCAGTAGACTCCACGAC -3' for the rat GAPDH gene. Relative gene expression was quantified by the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. Plasma TAC was determined by the ferric reducing antioxidant power assay proposed by Benzi et al. (1996) (5), and MDA was measured using the thiobarbituric acid method (6). Graph Pad

Prism 6.07 was applied for data analysis. Data were analyzed through two-way ANOVA analysis at the significant level of $p \leq 0.05$.

Result

The results showed that aerobic exercise had a significant effect on Nrf2 gene expression (P=0.0068). The findings indicated no significant effect of ethanol consumption (P=0.312) and interaction effect between aerobic exercise and ethanol consumption (P=0.237) on Nrf2 gene expression. Aerobic exercise significantly increased the expression of Nrf2 gene in the aerobic exercise and ethanol+ aerobic exercise groups compared to the control group ($p \leq 0.05$). In the current study, TAC was measured as an estimate of the potential composition of different antioxidants in the body. The results of two-way ANOVA analysis suggested that the effect of aerobic exercise (P=0.013) and ethanol consumption (P=0.024), as well as the interaction effect between aerobic exercise and ethanol consumption (P=0.0005) were significant for TAC. The results of Tukey's post-hoc test demonstrated that ethanol consumption significantly decreased TAC in the ethanol group compared to the other groups. The TAC decreased significantly in the ethanol group (0.0809ng/mgProtein) compared with the control group (1.121ng/mgProtein) ($p \leq 0.01$) and the exercise group (0.825ng/mgProtein) ($p \leq 0.05$). Moreover, TAC increased significantly ($p \leq 0.01$) in ethanol+ aerobic exercise group (1.172ng/mgProtein) compared with the ethanol group. In the present study, MDA was measured as an index for lipid peroxidation. The results of the two-way ANOVA analysis showed that the effect of aerobic exercise (P=0.0001), ethanol consumption (P = 0.0001) and interaction effect between aerobic exercise and consumption ethanol (P=0.0001) was significant for plasma MDA levels. The results of Tukey's post hoc test showed that ethanol consumption significantly increased MDA in the ethanol group compared to other groups. The amount of MDA in the ethanol group was 0.365ng/mgProtein which was significantly increased compared with the control group (0.149ng/mgProtein) ($p \leq 0.0001$). The level of MDA in the aerobic exercise group was 0.104 ng/mgProtein, which was significantly decreased compared to the ethanol group ($p \leq 0.0001$) and the control group ($p \leq 0.05$). Further, the MDA in the ethanol + aerobic exercise group was 0.128 ng/mg Protein, which was significantly decreased compared to the ethanol group ($p \leq 0.0001$). The present study evaluated the combined effects of physical exercise and chronic ethanol consumption and concluded that alcohol consumption might increase cardiac MDA and reduce myocardial antioxidant potential. Like the ongoing study, Benzie et al. (6) suggested that resistance exercise could reduce the harmful effects of alcohol on the heart and improve the heart's capacity antioxidant. Regular exercise might improve the damage caused by oxidative stress and reduce lipid peroxidation

through adaptations created by the expression level of genes controlling antioxidant defense systems.

Conclusion

The findings of the present study showed that ethanol consumption was decreased and TAC and MDA levels in plasma were increased. In contrast, aerobic exercise through increasing TAC levels in plasma and Nrf2 gene expression levels led to a decrease in the oxidative damage caused by ethanol consumption. On the other hand, the results of the current study illustrated that regular aerobic exercise combined with ethanol consumption improved ethanol-induced oxidative damage. Regular and moderate exercise seems to maintain health and reduce the risk of cardiovascular disease not only by modulating some of the genes that control cell oxidation/reduction status but also by improving the performance of the cardiovascular system via various mechanisms. If the positive effects of the current study are repeated in human subjects, regular aerobic exercise may have therapeutic potential to counter the harmful effects of chronic alcohol usage.

Keywords: Ethanol, Aerobic exercise, Erythroid nuclear factor 2 related to factor (2) (Nrf2), Gene expression, Antioxidant

References

1. Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress–a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. Int J Cosmet Sci. 2015;37:1-8.
2. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43(1):233-60.
3. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. PloS one. 2012; 7(9):e45697.
4. Liang J, Li L, Sun Y, He W, Wang X, Su Q. The protective effect of activating Nrf2/HO-1 signaling pathway on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization in rats. BMC Cardiovasc Disord. 2017; 17(1):272.
5. Esterbauer H, Cheeseman KH. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 186: Elsevier; 1990. p. 407-21.
6. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1):70-6.
7. Chicco AJ, McCarty H, Reed AH, Story RR, Westerlind KC, Turner RT, et al. Resistance exercise training attenuates alcohol-induced cardiac oxidative stress. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2006; 13(1):74-9.

فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۳ ، شماره ۴۹ ،بهار ۱۴۰۰ .صص ۸۸-۶۵

مقالهٔ پژوهشی

اثر هشت هفته تمرین هوازی توأم با مصرف اتانول بر بیان ژن Nrf2 در عضلهٔ قلب و برخی از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی موش صحرایی نر

زهرا فرج‌تبار[۱]، رزیتا فتحی[۲]، خدیجه نصیری[۳]، فرهاد احمدی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران (نویسندهٔ مسئول)
۴. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۵. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵

چکیده

مطالعات محدودی دربارهٔ تأثیر ترکیب تمرینات ورزشی و مصرف الکل بر تنظیم‌کننده‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه فاکتور هسته‌ای اریتروئید دوی مرتبط با فاکتور دو (Nrf2) در عضلهٔ قلب انجام شده‌اند. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرین هوازی توأم با مصرف اتانول بر بیان ژن Nrf2 عضلهٔ قلب و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسما در موش صحرایی نر انجام شد. تعداد ۳۲ سر موش صحرایی با میانگین وزنی۶ ± ۲۳۰ گرم به چهار گروه کنترل، تمرین هوازی، اتانول ۲۰ درصد با دوز چهار گرم بر کیلوگرم وزن بدن و اتانول به‌همراه تمرین تقسیم شدند. در پایان دوره، سطوح میزان بیان ژن Nrf2 و میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TCA) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) ارزیابی شدند. داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس دوسویه در سطح معناداری $P \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که تمرین هوازی اثر معناداری بر بیان ژن Nrf2 داشت ($P = 0.0068$). نتایج، تأثیر معنادار نداشتن مصرف اتانول ($P = 0.312$) و اثر تعاملی بین تمرین هوازی و مصرف اتانول ($P = 0.237$) را در بیان ژن Nrf2 نشان داد. تمرین هوازی به‌طور معناداری بیان ژن Nrf2 را در گروه‌های تمرین و تمرین به‌همراه اتانول در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. مصرف اتانول به‌طور معناداری سبب کاهش میزان TCA و افزایش MDA در مقایسه با سایر گروه‌ها شد. نتایج نشان داد که مصرف اتانول به‌ترتیب سبب کاهش و افزایش سطوح پلاسمایی TAC و MDA شد، اما درمقابل انجام‌دادن تمرین هوازی از طریق افزایش سطوح TAC و افزایش بیان ژن Nrf2 به کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول منجر شد.

واژگان کلیدی: اتانول، تمرین هوازی، فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ مرتبط با فاکتور۲ (Nrf2)، بیان ژن، آنتی-اکسیدان.

1. Email: roz_fathi@yahoo.com; r.fathi@umz.ac.ir
3. Email: z.farajtabar19@gmail.com
4. Email: kh.nasiri@umz.ac.ir
5. Email: farhadahmadi19@yahoo.com

مقدمه

اتانول یکی از شناخته‌شده‌ترین نویشیدنی‌های الکلی است که بخش بزرگی از جمعیت جهان به‌طور منظم آن را مصرف می‌کنند. مصرف اتانول با وجود دربرداشتن منبع چشمگیری انرژی یعنی حدود هفت کیلوکالری در هر گرم، پیامدهای زیادی نیز به‌دنبال دارد و ممکن است سبب سوءمصرف آن شود. براساس گزارشی که سازمان بهداشت جهانی[1] در سال ۲۰۱۸ منتشرکرد، بیش از سه میلیون نفر در سال ۲۰۱۶ به‌دلیل استفادهٔ مزمن از الکل جان خود را از دست داده‌اند (۱)؛ این نشان‌دهنده یک مرگ از هر ۲۰ مرگ است که بیش از سه‌چهارم این مرگ‌ومیر در مردان اتفاق می‌افتد (۲). مصرف بیش‌ازحد الکل سومین عامل خطر بیماری بعد از مصرف دخانیات و فشارخون بالاست (۳).

مصرف الکل هم در دوزهای تفریحی و هم به‌صورت مزمن بر عملکرد سیستم قلبی و عروقی به‌طور چشمگیری زیان‌آور است؛ به‌طوری‌که بسیاری از مرگ‌ومیرهای مرتبط با بیماری‌های قلبی و عروقی ازجمله اختلالات بطنی زیرشکمی، کاردیومیوپاتی الکلی با نارسایی احتقانی قلب، کاهش برون‌ده و پرفشار خونی به مصرف مزمن و حاد الکل وابسته است (۴).

همچنین مطالعات نشان داده‌اند که آسیب‌های قلبی و عروقی ناشی از مصرف الکل به نوع الکل وابسته نیست (برای مثال، آبجو در مقابل مشروبات الکلی)؛ بلکه با میزان الکل مصرف‌شده تعیین می‌شود؛ بااین‌حال برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که مصرف کم تا متوسط الکل در مقایسه با مصرف مزمن با دوزهای زیاد و همچنین افرادی که هیچ‌گونه الکلی مصرف نمی‌کنند، کمتر درمعرض مرگ‌ومیر ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی قرار دارند (۵). احتمالاً این اثر به‌دلیل تحریک حفاظت سلولی میوسیت‌های قلبی و پیش‌شرطی‌شدن آن‌ها در برابر ایسکمی است؛ بااین‌حال نقش الکل به‌عنوان یک عامل خطر عمده برای بیماری‌های قلبی و عروقی به‌مراتب مهم‌تر از نقش حفاظتی مصرف متوسط آن است (۶).

سلول‌های قلب به‌دلیل فعالیت اکسیداتیو مداوم و قابلیت تکثیر محدود، بیشتر از بافت های دیگر درمعرض آسیب ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد قرار دارند؛ به‌طوری‌که امروزه کاهش عملکرد قلب طی پیری را به آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو و کاهش تودهٔ سلولی قلب به‌دلیل مرگ سلولی ناشی از این آسیب‌ها نسبت می‌دهند (۷).

در مطالعات مکانیسم‌های متعددی برای اثرات سوء نوشیدنی‌های الکلی مانند اتانول و متابولیت آن، استالدئید، درنظر گرفته شده است که این اثرات از طریق اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز سلول‌های عضلهٔ قلبی، کاهش پروتئین‌های انقباضی و رسوب بیش از حد کلاژن اعمال می‌شود (۸). استرس اکسیداتیو به وضعیتی اشاره دارد که تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و گونه‌های

1. World Health Organization (WHO)

واکنش‌پذیر اکسیژن[1] به‌دلیل تخلیهٔ آنتی‌اکسیدان‌ها یا افزایش تولید ROS دچار اختلال می‌شود. علاوه‌بر متابولیسم ناقص سوخت‌های متابولیک، تولید ROS توسط عوامل محیطی مانند آلاینده‌های زیستی، مصرف دخانیات و مصرف الکل نیز صورت می‌گیرد. عضلهٔ قلب یکی از بافت‌های مستعد برای بروز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ROSها مانند یون‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل است (۹).

هنگامی که استرس اکسیداتیو روی می‌دهد، سلول‌ها برای مقابله با اثرات اکسیدکنندگی ناشی از ROS تلاش می‌کنند که از طریق فعال‌کردن یا خاموش‌کردن ژن‌های رمزگذاری فاکتورهای رونویسی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌های ساختاری، تعادل را بازیابی کنند. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی کنترل‌کنندهٔ اکسیداسیون/احیای سلول‌های فاکتور هسته‌ای اریتروئید دو مرتبط با فاکتور دو[2] (فاکتور رونویسی Nrf2) است که از طریق تولید بیش از حد ROS فعال می‌شود و سبب تولید آنزیم‌ها و پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی و سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود (۱۰).

فاکتور رونویسی Nrf2 تنظیم‌کنندهٔ اصلی پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی است و بیش از ۲۰۰ ژن پروتئین سلولی را در پاسخ به استرس اکسیداتیو تنظیم می‌کند (۱۱). فاکتور رونویسی Nrf2 در همهٔ بافت‌های بدن بیان می‌شود، اما بیشترین بیان آن در قلب، مغز، کلیه، ماهیچه، شش و کبد است (۱۲).

تنظیم بیان فاکتور رونویسی Nrf2 تحت‌تأثیر عوامل مختلفی ازجمله ورزش است (۱۳)؛ ازاین‌رو فعالیت بدنی به‌عنوان یک راهکار غیردارویی مفید برای تعدیل بیان ژن این مسیر آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه در عضلهٔ قلبی مطرح است. در شرایط طبیعی، مقادیر ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها در وضعیتی متعادل قرار دارند؛ بنابراین Nrf2 نقش حداقلی در تنظیم سیستم آنتی‌اکسیدانی در قلب دارد (۱۴، ۹). زمانی که این تعادل در جهت افزایش ROS به‌خصوص هنگام انجام‌دادن تمرینات ورزشی شدید مختل شود، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش بیان Nrf2 در سلول می‌شود. در همین راستا پژوهش‌های فراوانی با هدف تعیین روابط بین مواد آنتی‌اکسیدان و محصولات استرس اکسیداتیو در شدت‌های مختلف تمرینی انجام شده‌اند. براساس این پژوهش‌ها، پروتکل تمرینات ورزشی با وضعیت استرس اکسیداتیو مرتبط است (۱۵). این اتفاق‌نظر وجود دارد که تمرینات شدید، نامنظم و طولانی‌مدت به‌علت افزایش تولید ROS سبب افزایش آسیب اکسیداتیو سلولی در عضلهٔ قلب می‌شود (۱۶). از طرفی ورزش منظم و متوسط به‌نظر می‌رسد اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدانی داشته باشد و از تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از تمرین جلوگیری می‌کند (۱۷، ۱). همچنین نشان داده شده است که

1. Reactive Oxygen Species (ROS)
2. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2)

تمرینات ورزشی منظم می‌تواند استرس اکسیداتیو عضله قلبی را کاهش دهد و سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت کند و افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از پیری در قلب را نیز کنترل کند (۱۳).
اثرات تمرینات بدنی بر وضعیت اکسیداتیو بافت‌هایی مانند کبد، قلب، مغز، عضلات و کلیه بررسی شده است و علاوه براین بررسی‌های زیادی در حیطهٔ اثر دوزهای متفاوت اتانول بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو انجام گرفته است؛ بااین‌حال براساس بررسی پیشینهٔ این حوزه، مطالعات محدودی با اعمال هر دو متغیر الکل و تمرین با شدت متوسط بر وضعیت اکسیداتیو بافت قلب انجام شده‌اند. همچنین تاکنون مطالعات محدودی دربارهٔ تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌واسطهٔ اثر ورزش بر بیان ژن Nrf2 در قلب انجام گرفته‌اند؛ بنابراین این پژوهش با هدف بررسی اثر تمرین هوازی با شدت متوسط بر آسیب‌های ناشی از مصرف اتانول ۲۰ درصد بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو (مالون‌دی‌آلدئید[1] و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی[2] پلاسما) و فاکتور رونویسی Nrf2 در عضلهٔ قلبی موش‌های صحرایی نر انجام می‌شود.

روش پژوهش

روش پژوهش حاضر با توجه به ماهیت و اهداف آن از نوع تجربی و بنیادی بود. در این مطالعه ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۶ ± ۲۳۰ گرم و سن شش هفته، از مرکز انستیتو پاستور آمل تهیه شدند. حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه جانوری، در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت ۳۵ تا ۴۵ درصد و چرخهٔ تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. در طی دورهٔ پژوهش حیوانات به مصرف آب و غذای مخصوص موش (ساخت شرکت به‌پرور-ایران) دسترسی آزاد داشتند. حیوانات پس از یک هفته آشنایی با محیط نگهداری جدید و نحوهٔ فعالیت روی تردمیل به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل، اتانول، تمرین و تمرین + اتانول تقسیم شدند.
پروتکل تمرینی: هشت هفته تمرین هوازی با یک دوره آشناسازی یک‌هفته‌ای حیوانات با دویدن روی تردمیل آغاز شد. در طی دورهٔ آشناسازی، گروه‌های تمرینی هفته‌ای سه جلسه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه تمرین داده شدند. پس از دورهٔ سازگاری آزمون خستگی به‌منظور تعیین حداکثر سرعت دویدن اجرا شد. این آزمون به شرح زیر انجام شد:
حیوانات به تردمیل با سرعت پنج متر بر دقیقه منتقل شدند. تازمانی‌که هریک از حیوانات گروه تمرینی به خستگی رسیدند، با گذشت هر سه دقیقه، سه متر بر دقیقه به‌سرعت قبل اضافه شد. هنگامی‌که حیوانات به حفظ سرعت در دویدن موفق نبودند، خستگی آغاز شد و آزمون متوقف شد.

1. Malondialdehyde
2. Total Antioxidant Capacity (TAC)

سپس ۶۵ درصد حداکثر سرعت محاسبه شد که مطابق با فعالیت بدنی با شدت متوسط است. جلسات تمرینی پنج روز در هفته برای دو هفتهٔ متوالی انجام شد. در اولین روز تمرینی مدت زمان تمرین ۳۰ دقیقه بود و در روزهای بعدی مدت تمرین به میزان ۱۰ دقیقه در روز اضافه شد تا به‌مدت ۶۰ دقیقه رسید. از روز پنجم حیوانات برای یک ساعت در روز تمرین کردند. هر دو هفته یک‌بار دوباره آزمون حداکثر سرعت به همان روش قبل انجام شد و ۶۵ درصد حداکثر سرعت محاسبه شد (۱۸).

روش مصرف اتانول: در این پژوهش از الکل (اتانول) ۲۰ درصد با دوز چهار گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت روزانه استفاده شد. برای خوراندن اتانول به موش‌ها از گاواژ استفاده شد. برای سازگاری موش‌ها با اتانول از دوز ۰/۵ گرم شروع شد و هر روز ۰/۵ گرم به مقدار قبل اضافه شد. روز هشتم به دوز مدنظر یعنی چهار گرم رسید. بعد از رسیدن به دوز چهار گرم بر کیلوگرم با فاصلهٔ دو روزه وزن‌گیری مجدد برای تعیین مقدار دقیق دوز انجام شد (۱۹، ۱۸).

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر با توجه به اصول راهنمای اخلاقی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی[1] (IACUC) انجام شد. تمام آزمایش‌ها به تأیید کمیتهٔ اخلاق دانشگاه مازندران (کد اخلاق پژوهش حاضر IR.UMZ.REC.1397.054) رسید. گونهٔ خاص حیوانی برای آزمایش مناسب با پژوهش انتخاب شد. از حداقل حیوان مورد نیاز برای صحت آماری و حقیقی پژوهش استفاده شد. با حیوانات ازجمله اجتناب یا کاهش فشار، استرس، رنج و درد واردشده به آن‌ها به‌صورت شایسته رفتار شد. تدابیر و داروهای لازم به‌منظور ایجادنشدن عفونت یا عوارض جانبی پس از تمرین و مصرف اتانول حیوانات درنظر گرفته شد. قربانی‌کردن حیوانات طبق اصول اخلاقی با کمترین درد و آزار حیوان انجام شد. شرایط زیستی، تغذیه‌ای، نگهداری و دفع لاشهٔ حیوانات به بهترین نحو و با رعایت اصول اخلاقی صورت پذیرفت.

استخراج بافت

تمام گروه‌ها ۴۸ ساعت پس از مصرف اتانول و آخرین جلسهٔ تمرینی در شرایط کاملاً مشابه ناشتایی شبانه با تزریق درون‌صفاقی کتامین[2] (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین[3] (سه تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. سپس قفسهٔ سینه شکافته شد و خون از طریق ورید کبدی گرفته شد و بلافاصله بافت قلب جمع‌آوری شد.

1. Institutional Animal Care and Use Committee
2. Ketamine
3. Xylazine

استخراج RNA، سنتز cDNA و بیان ژن

برای استخراج RNA توتال از بافت قلب موش صحرایی از کیت پارس طوس[1] (ایران) استفاده شد. استخراج طبق دستورالعمل کیت شرکت سازنده انجام شد. به میکروتیوب‌های RNase & DNase Free، ۵۰ میلی‌گرم نمونه هموژنه اضافه شد و به آن بافر لیزکننده به مقدار ۷۵۰ میکرولیتر افزوده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت پنج دقیقه انکوباسیون شدند. ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط حاصل اضافه شد و برای ۱۵ ثانیه مخلوط حاصل به‌شدت تکان داده شد و به‌مدت سه دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۲ دقیقه در چهار درجهٔ سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ مخلوط سه فاز تشکیل شد که فاز مایع بالایی حاوی RNA بود. این فاز بادقت جدا شد و با ۴۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. سپس به ستون سیلیکا اضافه شد و به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مواد زایدی که پس از عبور از فیلتر در میکروتیوب کالکتور زیر ستون جمع شده بود، دور انداخته شد. دوباره میکروتیوب کالکتور به ستون برگردانده شد و به ستون ۷۰۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشو (PW) اضافه شد. سپس به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ شد. میکروتیوب کالکتور زیر ستون که مایع شسته‌شده در آن جمع شده بود، خالی شد و دوباره ۵۰۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو به ستون برای خلوص بیشتر RNA استخراجی اضافه شد و به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ شد. درنهایت ۳۰ میکرولیتر آب تیمارشده با DEPC[2] به ستون سیلیکا اضافه شد و به‌مدت سه دقیقه در محیط نگهداری شد. سپس ستون به‌مدت دو دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شد تا RNA جدا شد و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. نمونهٔ RNAهای استخراجی در ادامه پس از حذف آلودگی‌های ژنومی با آنزیم DNasI, RNase-free (سیناکلون، ایران) برای سنتز cDNA استفاده شدند.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت یکتاتجهیز آزما[3] (ایران) استفاده شد. بدین‌منظور، یک میکروگرم RNA توتال با استفاده از آغازگر Oligo dT طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA سنتز شد. طراحی آغازگر ژن مرجع GAPDH[4] با نرم‌افزار پرایمر پریمیر[5] نسخهٔ پنج براساس اطلاعات ژن GAPDH در بانک ژنی NCBI[6] انجام شد. برای تکثیر اختصاصی ژن Nrf2 از آغازگرهای اختصاصی

1. Pars Tous
2. Diethyl Pyrocarbonate
3. Yektatajhiz Azma
4. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
5. Primer Premier
6. National Center for Biotechnology Information

گزارش‌شده در مطالعهٔ لیانگ[1] و همکاران (۲۰) استفاده شد. سپس آغازگرها توسط شرکت ماکروژن[2] کرهٔ جنوبی سنتز شد. مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده در این پژوهش در جدول شمارهٔ یک نشان داده شده است.

جدول۱- مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده در فرایند Real Time PCR

Table 1-The charactriziation of primers used in Real Time PCR process

ژن **Gene**	توالی آغازگر **Primer sequence (5´–3´)**	کد دسترسی ژن **Accession number**	طول محصول (جفت باز) **Product length (bp)**
Nrf2	F 5´- GCTGCCATTAGTCAGTCGCTCTC-3´ R 5´- ACCGTGCCTTCAGTGTGCTTC -3´	NM_031789.2	104
GAPDH	F 5´- GGCAAGTTCAACGGCACAG-3´ R 5´- GACGCCAGTAGACTCCACGAC-3´	NM_017008.4	144

بعد از انجام‌دادن واکنش‌های مربوط به PCR معمولی و به‌دست‌آوردن شرایط و دمای اتصال مطلوب برای ژن‌ها، PCR در زمان واقعی به روش Syber Green با استفاده از دستگاه Rotor gene Corbett 6000 انجام شد. واکنش‌های Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر cDNA (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر)، هشت میکرولیتر RealQ Plus 2x Master Mix Green (Amplioqon, Denmark)، ۰/۴ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) و ۸/۲ میکرولیتر آب عاری از ریبونوکلئاز بود. برنامهٔ دمایی به‌کاررفته در Real Time PCR شامل یک سیکل دمایی ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۳دقیقه، ۴۰ سیکل دمایی (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای واسرشته‌شدن به‌مدت۳۰ ثانیه، ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرهای ژن Nrf2 و ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرهای GAPDH به‌مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای بسط به‌مدت۳۰ ثانیه) بود. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها رسم شد. میزان بیان ژن‌های مدنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

1. Liange
2. Macrogen Inc. Seoul, Korea

سنجش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدئید

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما با استفاده از روش FRAP[1] که بنزی و استراین [2](۲۱) ارائه کرد، انجام شد. در این روش،توانایی پلاسما در احیای یون فریک (Fe^{3+}) به یون فروس (Fe^{2+}) در حضور TPTZ[3] اندازه‌گیری می‌شود. در pH اسیدی، زمانی که کمپلکس FeIII-TPTZ به فرم FeII احیا می شود، رنگ آبی تولید می‌شود که در طول موج ۵۹۳ نانومتر دارای بیشترین جذب است. این واکنش غیراختصاصی است و هر نیم‌واکنشی که در این شرایط، پتانسیل احیای کمتری از نیم‌واکنش FeIII/FeII-TPTZ داشته باشد، باعث احیای FeIII-TPTZ می‌شود.

مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید[4] اندازه‌گیری شد (۲۲). در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسمای بافت هموژن‌شده با ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد و یک میلی‌لیتر تیوباربیوتیک اسید ۰/۶۷ درصد مخلوط شد. بعد از گرمادیدن به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی 156 Mm-1Cm-1 محاسبه شد.

تحلیل آماری داده‌ها

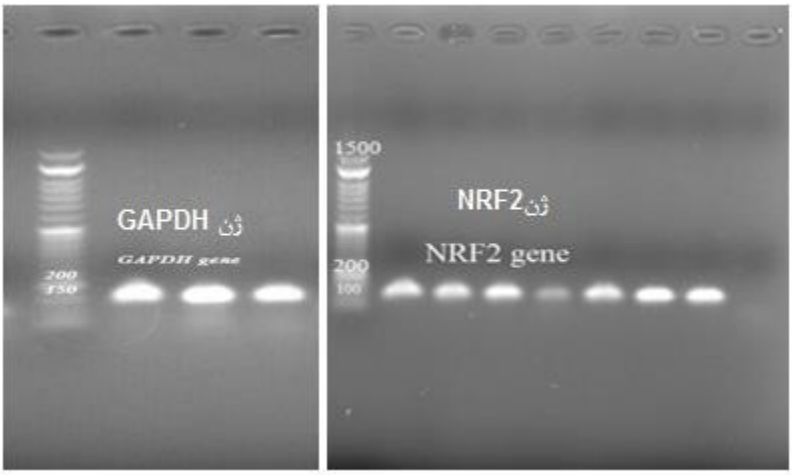
در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی برای تعیین طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف[5] استفاده شد. همچنین همسان‌بودن واریانس‌ها با آزمون لون[6] سنجیده شد. برای بررسی تغییرات گروهی از آزمون تحلیل واریانس دوسویه و از آزمون توکی به‌منظور بررسی تغییرات بین‌گروهی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار گراف‌پد پریسم[7] نسخهٔ 6.07 استفاده شد.

نتایج

نتایج محصولات حاصل از Real Time PCR روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که ژن‌های GAPDH و Nrf2 در بافت قلب موش صحرایی تکثیر شده است. مشاهدهٔ تک‌باند در محدودهٔ ۱۰۴ و ۱۴۴ جفت

1. Ferric Reducing-Antioxidant Power
2. Benzie & Strain
3. Tripyridyl-s-triazine
4. Thiobarbituric Acid
5. Kolmogorov–Smirnov Test
6. Leven’s Test
7. GraphPad Prism

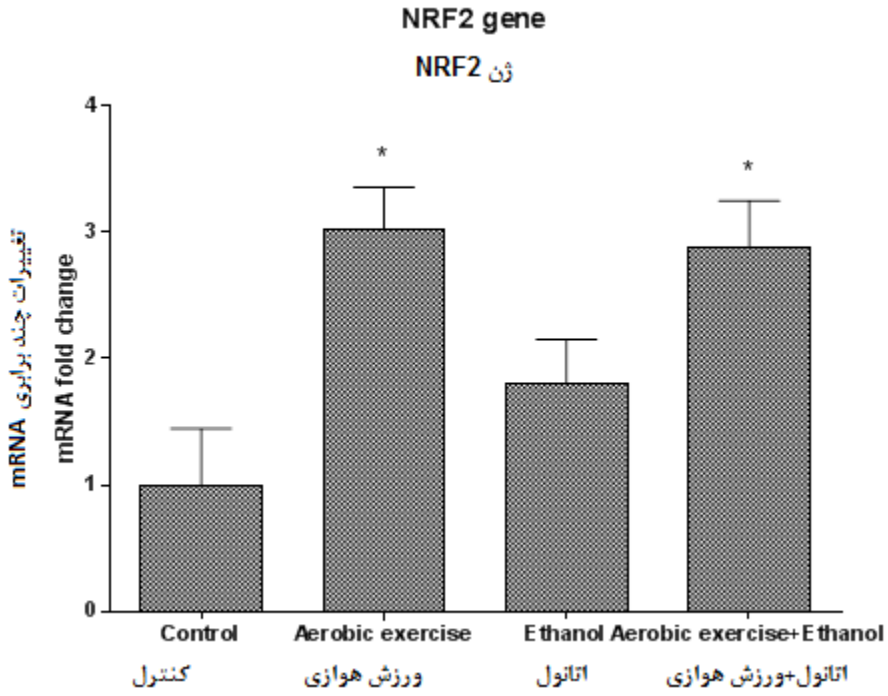
باز به‌ترتیب برای ژن‌های Nrf2 و GAPDH در بافت قلب در همهٔ نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعهٔ مدنظر بود (شکل شمارهٔ یک).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های GAPDH و Nrf2 روی ژل آگارز یک درصد

Figure 1- PCR product electrophoresis using specific primers of GAPDH and Nrf2 genes on 1% agarose gel

نتایج تحلیل آزمون تحلیل واریانس دوسویهٔ بیان ژن Nrf2 در عضلهٔ قلب موش صحرایی نشان داد که تمرین هوازی اثر معناداری بر بیان ژن ذکرشده داشته است ($P = 0.0068$). همچنین نتایج پژوهش تأثیر معنادارنداشتن مصرف اتانول ($P = 0.312$) و اثر تعاملی بین تمرین هوازی و مصرف اتانول را ($P = 0.237$) بر بیان ژن Nrf2 نشان داد. نتایج آزمون تعیبی توکی نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی بیان ژن Nrf2 را در بافت قلب به‌طور معناداری در گروه‌های تمرین و تمرین به‌همراه مصرف اتانول در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد ($P \leq 0.05$) و مصرف اتانول در این مدت نیز تأثیر معناداری بر بیان ژن Nrf2 در گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل نداشت.



شکل ۲- تغیرات چندبرابری ژن Nrf2 در گروه‌های تمرین، اتانول و تمرین + اتانول در مقایسه با گروه کنترل

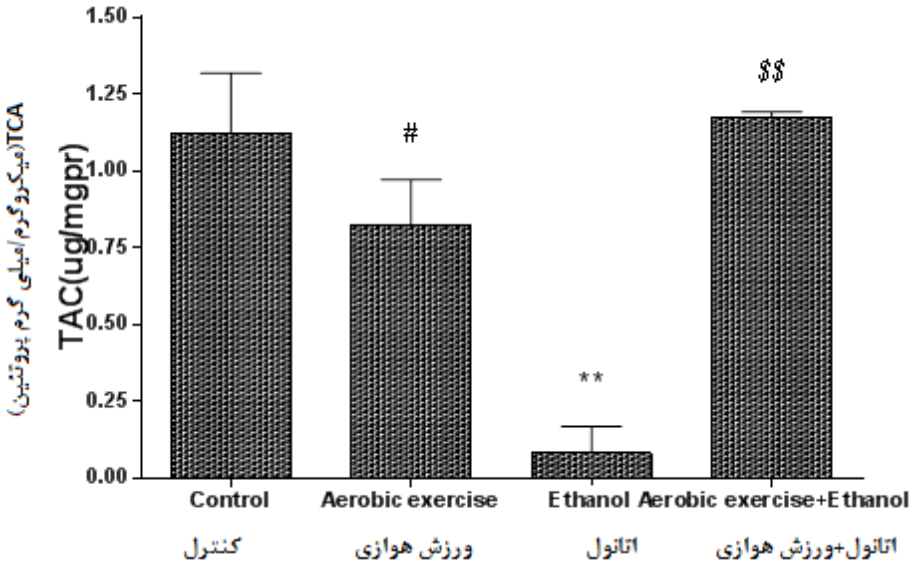
Figure 2- Fold change of Nrf2 gene in exercise, ethanol and exercise + ethanol groups compared to control group

*: **تفاوت معنادار بین گروه تمرین و تمرین + اتانول در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.05$)**

* **:Significant difference between exercise group and exercise + ethanol compared to control group ($P \leq 0.05$)**

در این پژوهش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به‌عنوان برآوردی از ترکیب پتانسیلی آنتی اکسیدان‌های مختلف در بدن اندازه‌گیری شد که مقادیر آن در گروه‌های مطالعه‌شده در شکل شمارهٔ سه نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوسویه نشان داد که اثر تمرین ($P = 0.013$)، مصرف اتانول ($P = 0.024$) و اثر تعاملی بین تمرین و مصرف اتانول ($P = 0.0005$) بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام معنادار بود. نتایج آزمون تعیبی توکی نشان داد که مصرف اتانول سبب کاهش معناداری در میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در در گروه اتانول در مقایسه با سایر گروه‌ها شد؛ به‌طوری‌که مقدار TAC در گروه اتانول (۰/۰۸۰۹ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین) کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل

(۱/۱۲۱ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین) ($P \leq 0.01$**) و گروه تمرین (۰/۸۲۵ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین) ($P \leq 0.05$ #) نشان داد. همچنین مقدار TAC در گروه اتانول + تمرین (۱/۱۷۲ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با گروه اتانول افزایش معناداری را نشان داد ($P \leq 0.01$ $$).



شکل ۳ - میزان سطوح پلاسمایی TCA در گروه‌های مطالعه‌شده

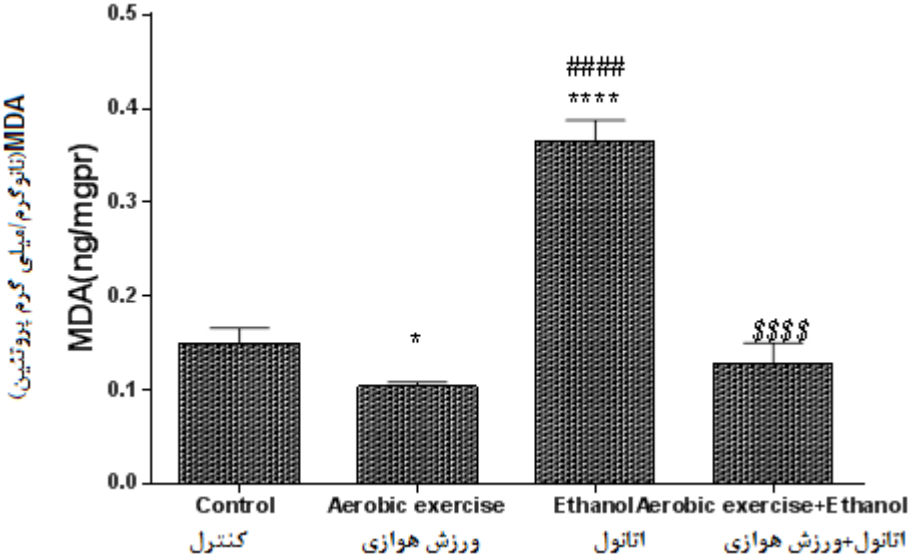
Figure 3- The rate of plasma TCA levels in the studied groups

میزان TCA در گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.01$ **)، میزان TCA در گروه اتانول در مقایسه با گروه تمرین ($P \leq 0.05$ #)، میزان TCA در گروه تمرین + اتانول در مقایسه با گروه اتانول ($P \leq 0.01$ $$)

TCA level in ethanol group compared to control group ($P \leq 0.01$ **), TCA level in ethanol group compared to exercise group ($P \leq 0.05$ #), TCA level in exercise + ethanol group compared to ethanol group ($P \leq 0.01$ $$)

در این پژوهش مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخصی برای پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری شد که مقادیر آن در گروه‌های مطالعه‌شده در شکل شمارهٔ چهار نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوسویه دربارهٔ متغیر ذکرشده نشان داد که اثر تمرین ($P = 0.0001$)، مصرف اتانول ($P = 0.0001$) و اثر تعاملی بین تمرین و مصرف اتانول ($P = 0.0001$) بر میزان سطوح مالون‌دی‌آلدئید

پلاسما معنادار بود. نتایج آزمون تعیبی توکی نشان داد که مصرف اتانول سبب افزایش معناداری در میزان MDA در گروه اتانول در مقایسه با سایر گروه‌ها شد؛ به‌طوری‌که میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه اتانول ۰/۳۶۵ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین بود که در مقایسه با گروه کنترل (۰/۱۴۹ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین) به‌طور معناداری افزایش یافت ($P \leq 0.0001$ ****). میزان MDA در گروه تمرین ۰/۱۰۴ نانـوگرم بر میلی‌گرم پروتئین بود که در مقایسه با گروه اتانول ($P \leq 0.0001$ ####) و گروه کنترل ($P \leq 0.05$ *) به‌طور معناداری کاهش یافت. همچنین میزان MDA در گروه اتانول + تمرین ۰/۱۲۸ نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین بود که در مقایسه با گروه اتانول به‌طور معناداری کاهش یافت ($P \leq 0.0001$ $$$$).



شکل ۴- میزان سطوح پلاسمایی MDA در گروه‌های مطالعه‌شده

Figure 4- Plasma levels of MDA in the studied groups

میزان MDA در گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.0001$ **)، میزان MDA در گروه اتانول در مقایسه با گروه تمرین ($P \leq 0.0001$ ####)، میزان MDA در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل (* $P \leq 0.05$)، میزان MDA در گروه تمرین + اتانول در مقایسه با گروه اتانول ($P \leq 0.0001$ $$$$)**

MDA level in ethanol group compared to control group (** $P \leq 0.0001$), MDA level in ethanol group compared to exercise group (#### P 000 0.0001), MDA level in exercise group compared to control group (* $P \leq 0.05$), MDA in exercise + ethanol group compared to ethanol group ($$$$ $P \leq 0.0001$)**

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مصرف اتانول به‌ترتیب سبب کاهش و افزایش سطح پلاسمای TAC و MDA می‌شود که می‌تواند نشان‌دهندهٔ آسیب‌های اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید باشد. از طرفی نتایج نشان داد که انجام‌دادن تمرینات ورزشی منظم توأم با مصرف اتانول توانست آسیب‌های آکسیداتیو ناشی از اتانول را بهبود دهد. این یافته با یافته‌های پژوهش چیکو[1] و همکاران (۲۳) همسوست. آن‌ها تأثیر توأم تمرینات بدنی و مصرف مزمن اتانول را بررسی کردند و نشان دادند که مصرف الکل به افزایش مالون‌دی‌آلدئید قلبی و کاهش پتانسیل آنتی‌اکسیدان میوکارد منجر می‌شود و تمرین مقاومتی می‌تواند اثرات مضر الکل بر قلب را کاهش دهد و ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های قلب را بهبود ببخشد. اکبری و همکاران (۲۴، ۱۹) نشان دادند که مصرف مزمن اتانول با دوز مشابه به‌مدت دو ماه توانست سبب کاهش سطح سرمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت کبد و بیضه شود. علاوه‌براین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که هشت هفته تمرین هوازی در مردانی که مصرف الکل زیاد داشتند، میزان آنتی‌اکسیدان خون ،کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش می‌دهد (۲۵). بیشتر مطالعات بر این نکته اتفاق‌نظر دارند که مصرف مزمن یا حاد اتانول سبب افزایش تولید ROS و مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) می‌شود که می‌تواند به آسیب‌های اکسیداتیو در بافت‌های مختلف به‌ویژه کبد و قلب منجر شود. تجزیهٔ اتانول در کبد علاوه‌بر تولید ROSموجب تشکیل مولکول‌هایی می‌شود که به تولید بیشتر آن‌ها می‌انجامد. اتانول فعالیت آنزیم-هایی به نام سیتوکروم P450s[2] را تحریک می‌کند و تولید ROS را افزایش می‌دهد. علاوه‌براین اتانول می‌تواند سطح فلزات خاصی در بدن را تغییر دهد و تولید ROS را تقویت کند (۲۶). همچنین نشان داده شده است که انجام‌دادن تمرینات ورزشی حاد میزان اکسیدان و استرس اکسیداتیو را در افراد تمرین‌نکرده افزایش می‌دهد، اما ورزش متوسط و طولانی‌مدت سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان و کاهش تولید اکسیدان‌ها در قلب و سایر بافت ها می‌شود (۱۷، ۱۶). گزارش شده است که با افزایش شدت فعالیت بدنی به‌خصوص تمرینات شدید هوازی و استقامتی استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و بی‌کفایت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بروز می‌کند (۱۴). شین[3] و همکاران (۲۷) گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌دنبال انجام‌دادن تمرینات ورزشی بلندمدت

1. Chicco
2. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)
3. Shin

و منظم افزایش می‌یابد. در مطالعهٔ دیگری نشان داده شد که میزان گلوتاتیون پراکسیداز بلافاصله پس از تمرینات کوتاه‌مدت و شدید کاهش می‌یابد (۲۸)؛ درحالی‌که با ۱۲هفته تمرین مقاومتی منظم و مستمر میزان مالون‌دی‌آلدئید کاهش می‌یابد (۲۹). با توجه به تفاوت‌های موجود در پروتکل تمرین، نوع بافت بررسی‌شده و تفاوت در برخی فاکتورهای ارزیابی‌شده نمی‌توان به نتیجه‌گیری قاطعی دربارهٔ نحوهٔ تأثیرپذیری پراکسیداسیون لیپیدی و دفاع آنتی‌اکسیدانی در اثر فعالیت ورزشی منظم دست یافت. به‌طورکلی می‌توان اظهار کرد که انجام‌دادن تمرینات بدنی حاد و شدید موجب افزایش پراکسداسیون لیپیدی و اختلال در دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود، اما تمرینات منظم در اثر سازگاری-هایی که به احتمال زیاد در سطح بیان ژن‌های کنترل‌کنندهٔ سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌وجود می‌آید، سبب بهبود آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. این بهبود وضعیت می‌تواند از طریق تنظیم مثبت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (۳۰)، تولید مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی داخلی (۳۱)، جابه‌جایی ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی از ذخایر بافتی و انتقال آن‌ها از طریق پلاسما به محل وقوع آسیب اکسیداتیو انجام شود (۳۲) که به نظر می‌رسد کاندید اصلی برای بیشتر این موارد، بیان بیشتر فاکتور نسخه‌برداری Nrf2 است.

همان‌طورکه در پژوهش حاضر مشاهده شد، سطوح پلاسمای آنتی‌اکسیدان تام و پراکسیداسیون لیپید در گروهی که ضمن دریافت اتانول تمرین نیز داشته‌اند، در مقایسه با گروه اتانول بهبود درخور ملاحظه‌ای داشته است. در همین راستا داده‌های حاصل از بیان ژن فاکتور نسخه‌برداری Nrf2 در این گروه افزایش چشمگیری را از خود نشان داد که می‌توان نتیجه گرفت تمرینات بدنی منظم از طریق افزایش بیان این ژن می‌تواند اثرات اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول را تا حد زیادی خنثی کند.

همچنین نتایج پژوهش نشان داد علاوه‌بر گروه تمرین + اتانول، بیان فاکتور نسخه‌برداری Nrf2 در گروه تمرین افزایش چشمگیری در مقایسه با سایر گروه‌ها داشت. درمجموع این نتایج با نتایج پژوهش‌های ناراسیمان و راجزکاران[1] (۳۳) و دان[2] و همکاران (۳۴) همسوست. آن‌ها به‌ترتیب نشان دادند شش هفته تمرین هوازی و ۳۰ دقیقه تمرین حاد هوازی توسط تردمیل به افزایش بیان Nrf2 در گروه‌های تمرین در مقایسه با گروه کنترل منجر می‌شود. از طرفی نشان داده شده است که تمرینات بدنی به‌مدت شش هفته با شدت متوسط می‌تواند به‌طور چشمگیری بیان پروتئین Nrf2 هسته‌ای را در قلب موش‌های جوان و مسن افزایش دهد که می‌توان نتیجه‌گیری کرد تمرین متوسط باعث افزایش بیان Nrf2 می‌شود (۳۳). همچنین ماجرزاک[3] و همکاران (۳۵) گزارش کردند پنج هفته

1. Narasimhan & Rajasekaran
2. Done
3. Majerczak

تمرین استقامتی با شدت متوسط موجب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی در مردان جوان می‌شود. راداک[1] و همکاران (۳۶) نشان دادند تمرین استقامتی اثری محافظتی بر آسیب اکسیداتیو مستقل از سن دارد . دان و همکاران (۳۴) نشان دادند تمرینات هوازی حاد انجام‌شده توسط دو پروتکل دوچرخه سواری ۳۰ دقیقه‌ای (اینتروال شدید و بار ثابت) در مردان جوان سبب افزایش بیان پروتئین Nrf2 می‌شود. در شرایط عادی، Nrf2 دارای نقش کمتری در تنظیم آنتی‌اکسیدانی در قلب است، اما تمرینات ورزشی منظم باعث افزایش بیان و عملکرد Nrf2 می‌شود. افزایش فعالیت Nrf2 تنظیم رونویسی آنتی-اکسیدان‌های وابسته به ARE[2] را انجام می‌دهد و موجب افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی می-شود؛ ازاین‌رو ورزش به‌عنوان یک آگونیست غیرفارماکولوژیک مسیر سیگنالینگ ARE-Nrf2 است. مسیر Nrf2-ARE شاخص و تنظیم‌کنندهٔ اصلی استرس اکسیداتیو است که توانایی تعدیل بیان صدها ژن آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی را دارد. این مسیر در تنظیم حالت اکسیداسیون/ احیای سلولی نقش کلیدی را ایفا می‌کند. در شرایط هومئوستاتیکی طبیعی، فاکتور رونویسی Nrf2 در سیتوپلاسم به‌وسیلهٔ Keap1[3] مهار می‌شود که به‌محض مواجهه با ROS، فاکتور Nrf2 از مهارکنندهٔ Keap1 جدا می‌شود و به درون هسته منتقل می‌شود و در آنجا به ARE در ناحیهٔ پروموتور ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم های آنتی‌اکسیدانی متصل می‌شود و تولید آنزیم های آنتی‌اکسیدانی درونی را القا می‌کند (۱۲). این آنزیم‌ها شامل سوپراکسید دیسموتاز[4] (SOD)، کاتالاز، پراکسی ردوکسین و... است که در مهار ROS نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۳۷). در شرایطی که سلول با محصولات اکسیداتیو مقابله می‌کند، یک لوپ فیدبک منفی به‌منظور خاموشی این مسیر برای جلوگیری از فعالیت زیاد آن در سلول آغاز می‌شود (۱۲).

به‌نظر می‌رسد انجام‌دادن تمرینات ورزشی منظم و متوسط برای حفظ سلامتی و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی ضروری و مفید است. این امر نه‌تنها از طریق تعدیل برخی ژن‌های کنترل‌کنندهٔ وضعیت اکسیداسیون/ احیای سلول، بلکه از طریق مکانیسم‌های مختلفی سبب بهبود عملکرد سیستم قلب و عروق می‌شود و خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی را کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ای دیگر پاورز[5] و همکاران (۳۸) نشان دادند تمرینات ورزشی منظم اثرات محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن میوکارد دارد. این احتمال وجود دارد که تمرین هوازی از طریق

1. Radak
2. Antioxidant Response Element
3. Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
4. Superoxide Dismutase
5. Powers

مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین‌های استرس شبکهٔ آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلواکسیژناز دو، القای پروتئین های شوک حرارتی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی و همچنین تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی غشای داخلی میتوکندریایی، سبب بهبود عملکرد قلب می‌شود.

پیام مقاله

نتایج این مطالعه نشان داد که هشت هفته تمرین استقامتی منظم از طریق تعدیل در بیان فاکتور رونویسی هستهٔ Nrf2 و افزایش سطوح TAC و کاهش سطوح MDA ممکن است سبب بهبود آسیب-های اکسیداتیو عضلهٔ قلب ناشی از مصرف اتانول شود. اگر اثرات مثبت یافته‌های پژوهش حاضر در آزمودنی‌های انسانی نیز تکرار شود، تمرین هوازی منظم ممکن است پتانسیل درمانی برای مقابله با اثرات آسیب‌رسان ناشی از مصرف مزمن الکل داشته باشد.

منابع

1. Organization WH. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization; 2018. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639 [cited 2018 Sep 27]
2. Manthou E, Georgakouli K, Fatouros IG, Gianoulakis C, Theodorakis Y, Jamurtas AZ. Role of exercise in the treatment of alcohol use disorders. Biomed Rep.2016;4(5):535-45.
3. World Health Organization. Management of Substance Abuse. Global status report on alcohol and health 2014. World Health Organization, 2014
4. Fernandez-Sola J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. Nat Rev Cardiol 2015;12(10):576-87.
5. Saravanan R, Pugalendi V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. Pharmacol Rep. 2006;58(1):41-7.
6. Nikaj A, Cakani B, Shkoza A, Ranxha E, Vyshka G. Effects of ethanol on the heart and blood vessels. OA Alcohol. 2014;2(1):7.
7. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. Ann N Y Acad Sci. 2002;959(1):93-107.
8. Gardner JD, Mouton AJ. Alcohol effects on cardiac function. Compr Physiol. 2011;5(2):791-802.
9. Ascensão A, Ferreira R, Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection—biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. Int J Cardiol. 2007;117(1):16-30.
10. Sun J, Fu J, Li L, Chen C, Wang H, Hou Y, et al. Nrf2 in alcoholic liver disease. Toxicol Appl Pharmacol. 2018;357:62-9.

11. Kandola K, Bowman A, Birch-Machin M. Oxidative stress–a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. Int J Cosmet Sci. 2015;37:1-8.
12. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43(1):233-60.
13. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. PloS One. 2012;7(9):e45697.
14. Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. Phys Sportsmed. 2002;30(5):37-44.
15. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. J Strength Cond Res. 2005;19(2):276-85.
16. Davies KJ. Cardiovascular adaptive homeostasis in exercise. Front Physiol. 2018;9:369.
17. Farney TM, Mccarthy CG, Canale RE, Schilling BK, Whitehead PN, Bloomer RJ. Absence of blood oxidative stress in trained men after strenuous exercise. Med Sci Sports Exerc. 2012;44(10):1855-63.
18. de Lucca MS, Pereira ET, Righi T, de Carvalho CA, Israel C, Nogueira DNQdC, et al. Liver histology after chronic use of alcohol and exercise training in rats. J Pharm Pharmacol. 2018;6:52-60.
19. Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Mosavat SH, Iraji A. The protective effect of hydroalcoholic extract of Zingiber officinale Roscoe (Ginger) on ethanol-induced reproductive toxicity in male rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2017;22(4):609-17.
20. Liang J, Li L, Sun Y, He W, Wang X, Su Q. The protective effect of activating Nrf2/HO-1 signaling pathway on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization in rats. BMC Cardiovasc Disord. 2017;17(1):272.
21. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6.
22. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990;186: 407-21.
23. Chicco AJ, McCarty H, Reed AH, Story RR, Westerlind KC, Turner RT, et al. Resistance exercise training attenuates alcohol-induced cardiac oxidative stress. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2006;13(1):74-9.
24. Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Nimrouzi M, Afsar T. Ameliorating potential of ginger (zingiber officinale roscoe) extract on liver function and oxidative stress induced by ethanol in male rats. Zahedan **J** Res Med Sci. 2019;21(2): e86464.
25. Georgakouli K, Manthou E, Fatouros IG, Georgoulias P, Deli CK, Koutedakis Y, et al. Enhanced erythrocyte antioxidant status following an 8-week aerobic exercise training program in heavy drinkers. Alcohol. 2018;69:57-62.

26. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health. 2003;27:277-84.
27. Shin Y-A, Lee J-H, Song W, Jun T-W. Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length. Mech Ageing Dev 2008;129(5):254-60.
28. Roh H-T, Ha HZ, Woo J-H, Lee Y-H, Ko K, Bae J-Y. Effect of different exercise intensities on biomarkers of oxidant-antioxidant balance, inflammation, and muscle damage. Journal of the Korean Applied Science and Technology. 2018;35(3):778-86.
29. Alikhani S, Sheikholeslami-Vatani D. Oxidative stress and anti-oxidant responses to regular resistance training in young and older adult women. Geriatr Gerontol Int. 2019;19(5):419-22.
30. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc Soc Exp Biol Med. 1999;222(3):283-92.
31. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW, et al. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. Clin Sci. 1999;96(4):381-5.
32. Balakrishnan S, Anuradha C. Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. Cell Biochem Funct. 1998;16(4):269-75.
33. Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and antioxidant signaling in cardiac aging. Front Physiol. 2016;7:241.
34. Done AJ, Newell MJ, Traustadóttir T. Effect of exercise intensity on Nrf2 signalling in young men. Free Radic Res 2017;51(6):646-55.
35. Majerczak J, Rychlik B, Grzelak A, Grzmil P, Karasinski J, Pierzchalski P, et al. Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UPC3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young healthy men. J Physiol Pharmacol. 2010;61(6):743-51.
36. RAdak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, SASVari M, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. Free Radic Biol Med. 1999;27(1-2):69-74.
37. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants Are a Major Contributor to Aging a. Ann **N** Y Acad Sci. 1992;663(1):85-96.
38. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. Free Radic Biol Med. 2008;44(2):193-201.

استناد به مقاله

فرج‌تبار زهرا، فتحی رزیتا، نصیری خدیجه، احمدی فرهاد. اثر هشت هفته تمرین هوازی توأم با مصرف اتانول بر بیان ژن Nrf2 در عضله قلب و برخی از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی موش صحرایی نر. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۴۰۰؛ ۱۳(۴۹): ۸۸-۶۵.
شناسهٔ دیجیتال: 10.22089/spj.2019.7664.1940

Farajtabar Z, Fathi R, Nasiri Kh, Ahmadi F. The Effect of Aerobic Exercise and Ethanol Consumption on Nrf2 Gene Expression in Heart Tissue and Some Antioxidant Indices in Male Rat. Sport Physiology. Spring 2021; 13 (49): 65-88. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2019.7664.1940