Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 21(130): 52-62

Exercise-induced Oxidative Shift of Lactate Dehydrogenase Isoforms in Cerebrospinal Fluid of Male Wistar Rats

Nasrin Sheikhhosseini[1], Rohollah Nikooie[2*], Mohsen Aminaei[3]

1. MSc, Department of Excercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Associate Professor, Department of Excercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Excercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Received: 7 Jan 2018, Accepted: 26 Feb 2018

Abstract

Background: The aim of the present study was to investigate the effect of endurance training on the content of lactate dehydrogenase isoforms (LDHA and LDHB) and isozymes in cerebrospinal fluid of male wistar rats.

Materials and Methods: Seventeen animals (5 weeks old) were randomly divided into two groups according their body weight: control (C; n = 9) and trained (T; n = 8). The animals from the T group were underwent a training program for 12 weeks (started at 20 m/min for 30 min and finished at 26 m/min for 60 min at the last week). Cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected from cisterna Magna 72 hours after the last exercise session. LDH Isoforms and isozymes were measured by ELISA and Electrophoresis techniques, and the comparisons between groups were evaluated by student t-test.

Results: Both LDHA and LDHB isoforms were found in the CSF of the C group; LDH1 and LDH5 had the highest and lowest content, respectively. Following the twelve-week training protocol, LDHB ($p<0.01$), LDH1 ($p<0.01$), and LDH2 concentrations ($p<0.01$) were significantly increased in the T group compared with those from the C group and LDH3 concentrations ($p<0.01$) and LDHA/LDHB ratio ($p<0.01$) were significantly decreased. Endurance training had no effect on LDHA and LDH4.

Conclusion: Endurance training is associated with oxidative shift of lactate dehydrogenase isoforms and isozymes in cerebrospinal fluid which could be considered as a prelude to aerobic metabolism of lactate in the brain.

Keywords: Endurance training, Lactate dehydrogenase, Lactate metabolism

*Corresponding Author:
Address: Department of Excercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
Email: r_nikooie@uk.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۱، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۳۰)، فروردین ۱۳۹۷، ۶۲-۵۲

شیفت اکسیداتیو ناشی از تمرین در ایزوفرم های لاکتات دهیدروژناز A و B در مایع مغزی نخاعی رت های نر نژاد ویستار

نسرین شیخ حسینی[۱]، روح الله نیکویی[۲*]، محسن امینایی[۳]

۱. کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۷، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: هدف از پژوهش حاضر، تعیین تأثیر تمرین استقامتی بر غلظت ایزوفرم‌های لاکتات دهیدروژناز (LDHA و LDHB) و ایزوآنزیم های آن در مایع مغزی نخاعی رت های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش ها: ۱۷ سر حیوان براساس وزن همسان سازی و به طور تصادفی به دو گروه کنترل (n = ۹) و تمرینی (n= ۸) تقسیم شدند. پروتکل تمرین استقامتی (شروع با ۳۰ دقیقه، ۲۰ متر در دقیقه و رسیدن به ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۶ متر در دقیقه در هفته آخر) به مدت ۱۲ هفته بر گروه تمرینی اعمال شد. ۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، مایع مغزی نخاعی از سیسترنامگنا جمع آوری گردید. ایزوفرم ها و ایزوآنزیم های لاکتات دهیدروژناز با الایزا و الکتروفورز اندازه گیری و مقایسات بین گروه ها با آزمون آماری تی استیودنت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: هر دو ایزوفرم LDHA و LDHB در مایع مغزی نخاعی رت‌های کنترل وجود داشت. بیشترین و کمترین مقدار ایزوآنزیم‌ها به ترتیب به LDH1 و LDH5 مربوط بود. متعاقب تمرین استقامتی، مقادیر LDHB ($p <$ ۰/۰۱)، LDH1 ($p <$ ۰/۰۱) و LDH2 ($p <$ ۰/۰۱) در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل افزایش و مقادیر LDH3 ($p <$ ۰/۰۱) و نسبت LDHA/LDHB ($p <$ ۰/۰۱) در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت. تمرین استقامتی بر LDHA و LDH4 تاثیری نداشت.

نتیجه‌گیری: انجام تمرین استقامتی با شیفت اکسیداتیو ایزوفرم ها و ایزوآنزیم های لاکتات در مایع مغزی نخاعی همراه است که می تواند پیش درآمدی بر حمایت متابولیسم هوازی لاکتات در مغز باشد.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، لاکتات دهید روژناز، متابولیسم لاکتات

***نویسنده مسئول:** ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی
Email: r_nikooie@uk.ac.ir

مقدمه

لاکتات دهیدروژناز (LDH) آنزیمی است که در محیط بدن تبدیل پیروات به لاکتات و فرآیند معکوس آن را انجام می‌دهد که برای تولید و مصرف لاکتات در سلول امری ضروری است(۱). این آنزیم تترامری است که از سه نوع زیر واحد مجزا شامل LDHA (یا LDH5 در عضله اسکلتی)،LDHB (یا LDH1 در عضله قلبی) و LDHC تشکیل شده است. دو ایزوفرم LDHA و LDHB به طور گسترده در تمامی بافت ها بیان می شوند و هر دو در سیستم عصبی مرکزی(CNS) نیز توزیع گسترده دارند (۲). ماحصل اشتراک دو ژن LDHA و LDHB در سلول پنج ایزوآنزیم مجزا با نام های LDH1، LDH2، LDH3، LDH4 و LDH5 است (۳). LDH5 به طور خاص در تبدیل پیروات به لاکتات نقش دارد، در حالی که LDH1 در تبدیل لاکتات به پیروات شرکت می کند (۱، ۳). براین اساس، LDHB معمولا در بافت هایی که توان بالایی از متابولیسم اکسیداتیو دارند، بیان می شود.از این رو، این ایزوآنزیم در دستگاه عصبی مرکزی عمدتا در هیپوکمپ، نئوکورتکس، مخچه و سلول های گلیا بیان می شود (۳، ۴). LDHA که تبدیل پیروات به لاکتات را انجام می دهد، عمدتاً در شبکیه لایه quadrigemina قدامی، N.opticus، chiasma، tracts opticus (۱)، سلول های آستروسیت بافت هیپوکمپ و قشر بینایی وجود دارد (۳).

این توزیع گسترده ایزوفرم ها و ایزوآنزیم های لاکتات، پیش نیازهای لازم برای متابولیسم هر چه بیشتر لاکتات در مغز را فراهم می آورد. در واقع طبق فرضیه شاتل لاکتات نورون - آستروسیت (Astocyte-Neuron Lactate Shuttle, ANLS)، آستروسیت های موجود در مغز، تولید کننده لاکتات و دارای ایزوفرم LDHA می باشند، در حالی که نورون ها لاکتات را به عنوان سوخت مصرف می‌کنند و بیان بالایی از ایزوفرم LDHB را دارا می باشند (۵). در این هم‌زیستی متابولیکی، آستروسیت ها غالبا تبدیل پیروات به لاکتات را بر عهده دارند و سلول های عصبی تبدیل لاکتات به پیروات را انجام می دهند(۵، ۶). مطالعات قبلی نشان داده اند که جهت انجام این هم زیستی در مغز موش LDH1 تبدیل لاکتات به پیروات موجود در سلول های عصبی را انجام می دهد، در حالی که ایزوفرم LDH4 و LDH5 تبدیل پیروات به لاکتات واقع در آستروسیت را بر عهده دارند (۶). ماحصل نهایی این امر حمایت متابولیکی هرچه بیشتر لاکتات در مغز است که می تواند در شرایط خاص و کمبود سوبستراهای دیگر از متابولیسم مغزی حمایت و از آسیب مغزی جلوگیری کند (۷).

علیرغم این فواید متابولیکی لاکتات برای مغز، تغییرات خاص و نامتناسب در بیان ایزوفرم ها و ایزوآنزیم های LDH منجر به برخی از مشکلات مغزی می شود. به عنوان مثال، به تازگی افزایش نسبت LDHA به LDHB در مایع مغزی نخاعی به عنوان مارکر پیری در نظر گرفته شده است (۸). این تغییر در نتیجه افزایش طولانی مدت لاکتات در مایع مغزی نخاعی می باشد(۹) که به دلیل کاهش متابولیسم میتوکندری نورون ها و تغییر متابولیسم میتوکندری گلیا رخ می دهد (۱۰). هم چنین در مننژیت ویروسی غلظت بالای LDH1 و LDH2 ، در مننژیت سلی افزایش LDH3 (۱۱) و در مننژیت باکتریایی سطوح بالای LDH4 و LDH5 (۱۱، ۱۲). به عنوان عوامل درگیر گزارش شده است. علاوه براین، افزایش ایزوآنزیم های LDH4 و LDH5 در مغز به افزایش غلظت های استراحتی لاکتات در مغز منجر شده که با حمایت از وقوع اسیدوز مغزی باعث آسیب های برگشت ناپذیری به بافت مغز خواهند شد. در غیر این صورت، چنان‌چه تغییر فاحشی در بیان و تعادل ایزوآنزیم های لاکتات اتفاق بیفتد، به طور بالقوه سلول های مغزی خاصیت تجدید پذیری خود را حفظ می کنند (۱۳).

از دیرباز انجام تمرین استقامتی به بواسطه سوق متابولیسم سلولی به سمت فسفریلاسیون اکسیداتیو در بافت های فعال و غیر فعال مورد توجه پژوهشگران بوده است.

قسمت عمده ای از این اثرات تمرینی بر متابولیسم هوازی سلول ماحصل تغییراتی است که تمرین بر بیان ایزوفرم ها و ایزوآنزیم های لاکتات در بافت هدف ایجاد می کند. به عنوان مثال، با افزایش سطوح لاکتات خون به واسطه فعالیت بدنی، غلظت LDHB در عضله قلبی در جهت مصرف لاکتات به عنوان سوخت مصرفی افزایش می یابد (۱۴) یا این‌که تمرین استقامتی در عضله اسکلتی، دو قلو و پهن خارجی انسان باعث افزایش فعالیت ایزوآنزیم‌های LDH1 و LDH2 و کاهش فعالیت ایزوآنزیم‌های LDH4 و LDH5 در عضله دوقلو و پهن خارجی موش و انسان موجبات متابولیسم هوازی را فراهم می آورد (۱۵). هم چنین، افزایش غلظت LDH3 سرم از ریه‌ها و LDH4 و LDH5 سرم از عضله اسکلتی، کبد و پلاکت ها بعد از انجام دوی ماراتن در انسان نیز گزارش شده است (۱۶). اثرات مثبت تمرینی بر ایزوآنزیم های لاکتات دهیدروژناز تنها منحصر به عضله اسکلتی نبوده و این اثرات در بافت های غیرتمرینی نیز مشاهده می شود. به عنوان مثال، انجام تمرین استقامتی منجر به سوق ایزوآنزیم های LDH1 و LDH2 به ایزوآنزیم های LDH4 و LDH5 در تومور موش های بالب سی مبتلا به سرطان سینه گردیده و با کاهش مقادیر استراحتی لاکتات میزان رشد تومور را کاهش می دهد (۱۷). علیرغم مشخص بودن تأثیر تمرین استقامتی بر غلظت ایزوفرم های LDH در پلاسما، سرم و دیگر بافت ها، اثرات احتمالی تمرین استقامتی بر بیان ایزوفرم و ایزوآنزیم های لاکتات دهیدروژناز در مغز ناشناخته است. هم‌چنین، در حال حاضر، اطلاعاتی مبنی بر مقادیر ایزوفرم‌ها و ایزوآنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز در مایع مغزی نخاعی رت موجود نمی باشد. از این رو، هدف اول مطالعه حاضر ارائه مقادیر پایه ایزوفرم های لاکتات دهیدروژناز (LDHA و LDHB)، نسبت LDHA به LDHB و غلظت ایزوآنزیم های آن (LDH1، LDH2، LDH3، LDH4، LDH5) در مایع مغزی نخاعی در رت‌های نر نژاد ویستار بود. هدف دوم بررسی تأثیر احتمالی تمرین استقامتی بر غلظت این ایزوفرم ها و ایزوآنزیم‌ها در مایع مغزی به عنوان جزئی موثر در بهبود متابولیسم مغزی ناشی از تمرین استقامتی نخاعی در رت های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها

حیوان: مطالعه حاضر از نوع تجربی بود که با روش پس آزمون با گروه کنترل انجام گردید. ۱۷ سر رت نژاد ویستار در سن هشت هفتگی از مرکز تحقیقات علوم و اعصاب کرمان خریداری و در شرایط دمایی ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی _ روشنایی نگهداری شدند. رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت یک هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه) حیوانات به طور تصادفی به دو گروه کنترل (n =۹) وتمرینی(n = ۸) تقسیم و گروه‌ها براساس وزن همسان سازی شدند. مجوز انجام تحقیق از کمیته اخلاق مرکز تحقیقات علوم و اعصاب کرمان به شماره ۹۳/۳۳ دریافت گردید.

پروتکل تمرینی: گروه تمرینی ابتدا دوره آشناسازی که شامل دویدن روی تردمیل به مدت پنج روز و هر روز به مدت زمان ۲۰ دقیقه بود را انجام دادند. رت‌ها ابتدا با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه دویدند و سرعت در انتهای دوره‌ی آشناسازی به ۲۰ متر بر دقیقه رسید. گروه تمرینی پس از دوره ی آشناسازی، تمرین اصلی را طبق دستورالعمل جدول ۱ به مدت ۱۲ هفته انجام داد. در چند هفته آخر تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه‌داشته شد تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود رسید.

جدول ۱. مشخصات پروتکل تمرینی

هفته	۵ روز آشناسازی	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان (دقیقه)	۲۰-۱۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۵۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت (متر بردقیقه)	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۲	۲۲	۲۲	۲۴	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶

روش جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی

۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها به‌وسیله‌ی تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی رت، موهای سر و جمجمه به دقت تراشیده شد. سپس، رت به دستگاه استریوتاکس انتقال داده شد و سر حیوان با زاویه تقریباً ۴۵ درجه در دستگاه ثابت و بی حرکت گردید. درادامه، بلافاصله برش طولی در وسط ایجاد شد و محل دقیق سیسترنا مگنا با استفاده از راهنمای اطلس مغز رت (پاکسینوس) بین اولین مهره‌ی گردنی و جمجمه و یا حدوداً ۱/۵ سانتی‌متر پایین تر از لامبدا مشخص گردید. (سیسترنا مگنا نقطه ای با مساحت تقریباً یک میلی متر مربع و کاملاً شفاف است که از بقیه ی مکان‌ها قابل تشخیص می‌باشد). پس از ایجاد برش طولی در وسط و برداشتن بافت‌های زائد و مشخص شدن سیسترنا مگنا جمع آوری مایع مغزی نخاعی با استفاده از سرنگ پروانه ای G ۲۳ متصل به سرنگ انسولینی جمع آوری گردیده و جهت جلوگیری از ورود خون به مایع مغزی نخاعی، نوک سرنگ به‌اندازه‌ی سه تا چهار میلی متر وارد سیسترنا مگنا گردید و عملیات کشیدن مایع توسط شخص دوم به آهستگی و حدوداً در مدت زمان ۱۵ تا ۳۰ ثانیه تکمیل شد. هم‌چنین رنگ مایع به دقت کنترل گردید تا آلوده به خون نباشد. مایع مغزی نخاعی پس از جمع آوری در دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۲۰۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ سوپرناتانت را برداشته و در تیوپ‌های ۰/۲ میلی لیتر تخلیه و در دمای ۸۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد برای اندازه گیری بعدی نگهداری شد (۱۸، ۱۹).

نحوه اندازه گیری متغیرهای تحقیق

مقادیر ایزوفرم LDHA به وسیله کیت الایزای مربوطه (Cat Number: MBS2533570, Mybiosource, USA) و ایزوفرم LDHB به وسیله کیت الایزای مربوطه (Cat Number: MBS096641, Mybiosource, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. مقادیر ایزوآنزیم‌های LDH1، LDH2، LDH3، LDH4 و LDH5 با استفاده از کیت الکتروفورز با (Cat Number: SRE612K, Interlab, Italy) طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه گیری شد.

به طور خلاصه، ایزوآنزیم های موجود در ۱۵ میکروگرم پروتئین کل به همراه مارکر LDH (LDH marker, K770049,LDH isotrol and sigma) با استفاده از الکتروفوز در ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شدند. ایزوآنزیم ها به وسیله کیت مربوطه، طبق دستورالعمل شرکت سازنده رنگ آمیزی شدند. ژل در اسید استیک ۵ درصد فیکس شد. باندها اسکن شده و توسط نرم افزار Imagej کمی سازی شدند. برای هر ایزوآنزیم مقادیر مساحت × چگالی محاسبه و بر مقادیر کل مساحت × چگالی هر پنج ایزوآنزیم تقسیم و نتایج به صورت درصد برای هر ایزوآنزیم گزارش گردید.

تحلیل آماری

جهت توصیف کمی داده‌ها از شاخص پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف معیار انجام شد. برای تعیین نرمال بودن توزیع نمونه‌ها از آزمون کلموگروف –اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov K-S) و برای تعیین تجانس واریانس‌ها از آزمون F هارتلی استفاده شد. انجام مقایسات بین گروهی با استفاده از آزمون تی مستقل انجام گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آمار توصیفی و استنباطی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. سطح معنی داری در تمامی‌مقایسات برابر با $\alpha = ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقادیر مربوط به سطوح ایزوفرم های LDHA وLDHB و نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ در مایع مغزی نخاعی در گروه های تحقیق در جدول ۲ گزارش شده است. بعد از اعمال دوازده هفته تمرین غلظت LDHB [$p < ۰/۰۵$، ۲/۱۹ =

(۱۵) t] و نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ [t (۱۵) = ۶/۱ ،p< ۰/۰۱] در گروه تمرینی به طور معنی‌دار بالاتر از مقادیر آن در گروه کنترل بود. از طرف دیگر، غلظت LDHA در مایع مغزی نخاعی تحت تأثیر تمرین واقع نشد، به این معنی که اختلاف معنی داری برای این فاکتور بین دو گروه تحقیق یافت نشد. ضریب خطای تغییرات درون فردی (Intra-assay) برای LDHA و LDHB به ترتیب ۴/۱۸ و ۲/۶۳ درصد بود.

جدول۲. غلظت LDHA و LDHB و نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ در مایع مغزی نخاعی گروه های تحقیق

متغیر	گروه	انحراف معیار± میانگین	p
LDHA (نانو گرم/ میلی لیتر)	کنترل	۰/۶۳۷ ± ۰/۱۷۲	۰/۷۹۹
	تمرین	۰/۶۱۵ ± ۰/۱۴۶	
LDHB (نانو گرم/ میلی لیتر)	کنترل	۲/۵۵ ± ۰/۵۶	۰/۰۴۷
	تمرین	۳/۲۹ ± ۰/۷۳	
نسبتLDHA/LDHB	کنترل	۰/۴۴۹ ± ۰/۰۲۴	۰/۰۱
	تمرین	۰/۱۸۷ ± ۰/۰۰۵	

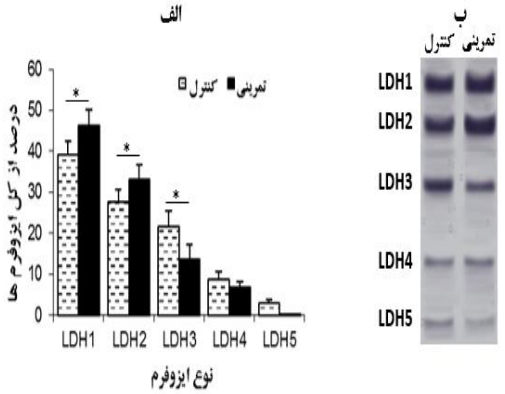
هر مقدار میانگین ۹ راس حیوان برای گروه کنترل و ۸ راس حیوان برای گروه تمرینی است.

نمودار ۱ مقادیر مربوط به ایزوآنزیم های LDH در مایع مغزی نخاعی گروه های تحقیق را نشان می دهد.

نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان غلظت در مایع مغزی نخاعی در گروه کنترل به ترتیب مربوط به LDH1 و LDH5 بود. متعاقب اعمال پروتکل تمرینی، غلظت ایزوآنزیم های LDH1 [t (۱۵) = ۳/۷۹ ،p < ۰/۰۵] و LDH2 [t (۱۵) = ۲/۸۹ ،p < ۰/۰۵] در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل به طور معنی دار بالاتر بود.

دوازده هفته تمرین استقامتی سطوح ایزوآنزیم های LDH3 مایع مغزی نخاعی در گروه تمرینی را نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داد [t (۱۵) = ۳/۶۱ ،p < ۰/۰۵] و بر سطوح LDH4 اثر معنی دار نداشت. سطوح LDH5 در گروه تمرینی قابل اندازه گیری نبود؛

از این رو، مقایسه ای برای این فاکتور بین دو گروه انجام نشد.



شکل۱. الف) میزان ایزو آنزیم های LDH1، LDH2، LDH3، LDH4 و LDH5 در مایع مغزی نخاعی در گروه‌های تحقیق (n=۹) و تمرین (n=۸). ب) پروفایل ایزوآنزیم‌های LDH در مایع مغزی نخاعی روی ژل در یک حیوان از گروه کنترل و تمرین

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر غلظت ایزوفرم‌های LDHA و LDHB، نسبت LDHA به LDHB و محتوای ایزوآنزیم‌های LDH1، LDH2، LDH3، LDH4 و LDH5 در مایع مغزی نخاعی در رت های نر نژاد ویستار به انجام رسید. مهم‌ترین یافته مطالعه حاضر این بود که ایزوآنزیم‌های LDH1 و LDH2 به طور چشمگیر بیشترین میزان را در مایع مغزی

نخاعی رت به خود اختصاص می دهند. هم‌چنین تمرین استقامتی باعث شیفت اکسیداتیو ایزوآنزیم های لاکتات دهیدروژناز به سمت LDH1 و LDH2 گردیده و موجبات افزایش LDHB در مایع مغزی نخاعی را فراهم می آورد که ماحصل این تغییرات کاهش نسبت$\frac{LDHA}{LDHB}$، علیرغم نداشتن اثر معنی دار به سطوح LDHA، در مایع مغزی نخاعی است.

برای اولین بار در مطالعه حاضر پروفایل ایزوآنزیم و ایزوفرم های LDH در مایع مغزی نخاعی رت های سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود هر دو ایزوفرم LDHA و LDHB در مایع مغزی نخاعی بود. از آن جایی که LDHA عمدتاً در تبدیل پیروات به لاکتات و LDHB عمدتاً در فرآیند معکوس تبدیل لاکتات به پیروات نقش دارند (۳)، وجود هر دو ایزوفرم ها حاکی از توانایی مغز در انجام تولید بی هوازی لاکتات و مصرف اکسیداتیو آن می باشد(۳، ۴). با این وجود، بیان LDHB در مقایسه با LDHA سه تا چهار برابر بیشتر و نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ نیز به طور فاحشی کمتر از یک بود. این نتایج براین امر دلالت دارد که آن‌چه در شرایط معمول در مغز اتفاق می افتد، مصرف اکسیداتیو لاکتات است تا تولید بی هوازی آن. این نتیجه با خصوصیات متابولیک مغز قابل توجیه است. گلوکز به عنوان سوخت انحصاری مغز در این بافت، عمدتاً به طور هوازی اکسید می شود و لاکتات نیز در شرایط حمایت از متابولیسم مغزی روند سوختن اکسیداتیو را طی می نماید (۲۰). سوخت اکسیداتیو گلوکز در مغز نیاز تبدیل پیروات به لاکتات جهت تضمین روند گلیکولیز بی هوازی در این بافت را کاهش می دهد(۸). از این رو، سوخت این سوبسترا در مغز محرکی برای تبدیل پیروات به لاکتات و به تبع آن آنزیم درگیر در این واکنش که همان LDHA است را فراهم نمی کند(۴). دلیل احتمالی دیگر، بیان بسیار بالای LDHB در قسمت های مختلف مغز است که در مقایسه با LDHA بیان ۵ تا ۶ برابری در قسمت های مغز نظیر هیپوکمپ و کورتکس دارد (۸). بنابراین این احتمال وجود دارد که غلظت های بالای LDHB در مایع مغزی نخاعی بازتابی از بیان ژن این آنزیم در بافت مغز باشد. این احتمال زمانی قوت می گیرد که به دلیل نفوذ ناپذیر بودن سد خونی-مغزی، امکان این که LDHB خون اشتراکی در تعیین سطوح این آنزیم در مایع مغزی نخاعی داشته باشد، کاملا منتفی است.

نکته منحصر به فرد دیگر تحقیق حاضر این بود که این اولین مطالعه‌ای است که تأثیر تمرین استقامتی را بر غلظت ایزوفرم های LDHA و LDHB و غلظت ایزوآنزیم های آن در مایع مغزی نخاعی در رت های نر نژاد ویستار را مورد بررسی قرار داده است. با وجود این که بافت مغز در حین تمرین یک بافت غیر تمرینی تلقی می شود، لیکن شواهدی وجود دارد که اندام های غیر تمرینی (۱۷) از جمله مغز (۲۱) هم تحت تاثیر تمرین قرار می گیرند. با این وجود، به دلیل این‌که این بافت ها همانند عضله اسکلتی مستقیماً درگیر در تمرین فیزیکی نیستند، عمده سازگاری های تمرینی در این بافت ها از طریق تغییرات اندوکرین و خون حاصل می‌شود. به همین دلیل، بافت های این چنینی عمدتاً در پاسخ به پروتکل های تمرینی و جلسات تمرینی طولانی مدت از خود سازگاری نشان می دهند. از این رو، پروتکل تمرینی در تحقیق حاضر به گونه ای طراحی گردید که هم بلند مدت باشد (۱۲ هفته) و هم در چند هفته آخر شامل جلسات تمرینی طولانی مدت ۶۰ دقیقه ای که بتواند سبب ایجاد سازگاری در بافتی نظیر مغز شود (۲۲). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار غلظت LDHB در مایع مغزی نخاعی می شود و بر غلظت های LDHA بدون تأثیر است. LDHB در قسمت های مختلف نظیر هیپوکمپ، مخچه، سلول های گلیا و نورون ها بیان گسترده ای دارد(۳، ۲۳) به دلیل فعال شدن اکثر این قسمت ها در حین تمرین، نیازهای انرژی در این مناطق افزایش می یابد که می تواند منجر به سازگاری های متابولیک در این نواحی شود. بنابراین افزایش بیان LDHB در هر کدام از این قسمت ها در حین تمرین می تواند دلیل افزایش مشاهده شده در غلظت

LDHB مایع مغزی نخاعی در پژوهش حاضر باشد. هرچند اظهار نظر قطعی در این مورد نیاز به انجام تحقیق مستقل دیگری دارد.

این‌که انجام تمرین چگونه می تواند غلظت LDHB را افزایش دهد، از دو دیدگاه قابل بررسی می باشد. دیدگاه اول مربوط به بیان ژن PGC-1α (Proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha) است. PGC-1α عضوی از خانواده گیرنده های هسته ای است که نقش یک هم فعال ساز رونویسی را در سلول ایفا می کند که مجموعه ای از پروتئین ها است که به وسیله اتصال به یک فعال کننده یا فاکتور رونویسی میزان بیان یک ژن را افزایش یا کاهش می دهد (۲۴). نشان داده شده است که PGC-1α در ساقه مغز، مخچه، لوب فرونتال، هیپوکمپ، هیپوتالاموس و مغز میانی بیان می شود و متعاقب تمرین استقامتی بلند مدت بیان آن در کورتکس، مغزمیانی و مخچه همراستا با افزایش چگالی میتوکندری افزایش می یابد (۲۲). PGC-1α با فعال کردن ERRα (Estrogen-related receptor alpha) به عنوان یک میانجی مستقیم، بیان LDHB را افزایش می دهد و بر بیان LDHA بدون تأثیر است(۲۵). در تحقیق حاضر تمرین بر LDHB اثرگذار و بر LDHA بدون تأثیر بود، از این رو به دلیل همراستایی این نتیجه با فعالیت تنظیمی PGC-1α بر ایزوفرم‌های LDHB و LDHA، این احتمال وجود دارد که تغییرات ناشی از تمرین بر ایزوآنزیم های LDH توسط PGC-1α واسطه گری شده باشد. با این وجود، اظهار نظر قطعی در این باره مستلزم انجام تحقیقات بعدی است. دیدگاه دوم، افزایش ورود لاکتات به مغز و تحریک اجزای درگیر در اکسیداسیون آن در طول تمرین می باشد. تحقیقات قبلی نشان داده اند که متابولیسم مغز فرآیندی پیچیده است که به طور پویا مطابق با تغییرات در غلظت های لاکتات و گلوکز خون تغییر می کند. به عنوان مثال مغز در شرایط استراحت ۸ درصد از انرژی خود را از طریق سوزاندن فقط ۱۰ درصد از لاکتات خون تأمین می کند(۲۶، ۲۷)، در حالی که در حین تمرین ۳۳ درصد از لاکتات افزایش یافته در سطح خون را اکسید و ۶۰ درصد انرژی خود را تأمین می نماید (۲۶، ۲۸). تمرین مورد استفاده در تحقیق حاضر، شدتی معادل با آستانه لاکتات (در هفته های آخر) داشت که انجام این تمرین سبب افزایش غلظت های لاکتات خون تا مقادیر ۴ تا ۵ میلی مول در لیتر می شود. چنین غلظتی از لاکتات خون منجر به افزایش معنی دار برداشت لاکتات مغزی می شود که این لاکتات برداشته شده در مغز عمدتاً به پیروات تبدیل و با سوخت اکسیداتیو خود متابولیسم مغزی در حین تمرین را تضمین می کند (۲۹). فرآیند تبدیل لاکتات به پیروات که توسط آنزیم LDHB انجام می‌شود می‌تواند محرکی در جهت افزایش بیان این آنزیم باشد.

با وجود این که این تغییرات ناشی از تمرین در بیان LDHB با عدم تغییر معنی داری بر بیان LDHA همراه بود، نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ را به طور فاحش در رت های تمرین کرده کاهش داد. کاهش این نسبت که به معنی تولید کمتر و مصرف بیشتر لاکتات است، نقش مهمی در کاهش سطوح استراحتی لاکتات مایع مغزی نخاعی ایفا می کند. با توجه با این که افزایش سطوح استراحتی لاکتات در مایع مغزی نخاعی می تواند فنوتیپ گلیکولیتیکی در مغز را تحریک و موجبات نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو را فراهم آورد(۸)، تأثیر تمرین بر نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ می تواند اهمیت پارامتریک هم داشته باشد. هم چنین افزایش سطوح استراحتی لاکتات در مغز به عنوان مارکر قوی برای پیری در مغز در نظر گرفته می شود (۸)، بنابراین از این حیث نیز نتیجه مشاهده شده حائز اهمیت است.

به منظور تعیین پیامد تغییرات مشاهده در LDHB بر پروفایل ایزوآنزیم های LDH، سطوح پنج ایزوآنزیم مربوط به این آنزیم در مایع مغزی نخاعی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش معنی دار سطوح LDH1 و LDH2 و کاهش معنی‌دار ایزوفرم بینابینی LDH3 در رت

های تمرین کرده در مقایسه با رت های گروه کنترل بود. هرچند که از روش تحقیق حاضر استخراج چنین استدلالی میسر نیست، لیکن افزایش در سطوح LDH3 در گروه تمرینی می تواند افزایش مشاهده شده در سطوح LDH1 و LDH2 را تفسیر نماید. در واقع زیر واحدهای تشکیل دهنده LDH1 تماماً و LDH2 عمدتاً از LDHB تشکیل شده اند(۳). این که تمرین تنها بر سطوح ایزوآنزیم هایی اثرگذار بود که با تمرین بیان در مایع مغزی نخاعی را داشتند جای تأمل دارد. معمولاً اثر تمرین بر یک متغیر فیزیولوژیک وابسته به سطوح اولیه آن فاکتور است و با مقادیر ابتدایی متغیر رابطه معکوس دارد (۳۰)؛ از این رو تأثیر پذیری ایزوآنزیم های اکسیداتیو در تحقیق حاضر تأکید بر این نکته دارد که متابولیسم لاکتات در مغز در حین تمرین به شدت افزایش می یابد و سطوح پایه آنزیم های موجود جهت حمایت این نیاز متابولیک ناکافی است. هم چنین این تغییرات مشاهده شده، بار دیگر بر این موضوع تأکید دارد که تمرین استقامتی تنها به عنوان یک عامل در جهت تقویت متابولیسم اکسیداتیو در مغز عمل می‌نماید.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین استقامتی بلند مدت سبب افزایش غلظت ایزوفرم LDHB مایع مغزی نخاعی رت گردیده و علیرغم عدم اثرگذاری بر بیان ایزوفرم LDHA باعث کاهش نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ می شود. نتیجه این تغییرات شیفت اکسیداتیو ایزوآنزیم های LDH است که باعث افزایش LDH1 و LDH2 در مایع مغزی نخاعی می شود. این نتایج به طور غیر مستقیم دلالت بر توسعه متابولیسم اکسیداتیو مغز متعاقب تمرین استقامتی دارد. با این وجود در تحقیق حاضر امکان بررسی ماحصل نهایی و مستقیم تغییرات مشاهده شده بر متابولیسم مغزی لاکتات میسر نشد. انجام این مهم نیازمند استفاده از تزریق پیرامونی لاکتات نشاندار شده و ردیابی آن در مغز است که به دلیل مهیا نبودن تکنیک‌های اندازه گیری مورد نیاز در محل انجام تحقیق، این مهم میسر نشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید باهنر کرمان با عنوان «تأثیر تمرین استقامتی بر غلظت ایزوفرم های لاکتات دهیدروژناز و نسبت $\frac{LDHA}{LDHB}$ در مایع مغزی نخاعی رت های نر نژاد ویستار» می باشد. بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشکده مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان به جهت حمایت آزمایشگاهی از انجام تحقیق حاضر ابراز می دارند.

منابع

1. Pastoris O, Boschi F, Verri M, Baiardi P, Felzani G, Vecchiet J, et al. The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. Experimental gerontology. 2000; 35(1):95-104.
2. Gerhardt-Hansen W. Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in the Central Nervous System: Theoretical Aspects and Practical Application in Diagnosis of Brain Tumors: Costers Bogtrykkeri, Virumgardsvej 12; 1968.
3. Laughton J, Charnay Y, Belloir B, Pellerin L, Magistretti P, Bouras C. Differential messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat brain. Neuroscience. 2000;96(3):619-25.
4. Groskreutz JJ, Thompson LV. Enzymatic alterations in single type IIB skeletal muscle fibers with inactivity and exercise in 12-and 30-month-old rats. Aging clinical and experimental research. 2002;14(5):347-53.
5. Pellerin L, Magistretti PJ. Food for thought: challenging the dogmas. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2003;23(11):1282-6.
6. O'Brien J, Kla KM, Hopkins IB, Malecki EA, McKenna MC. Kinetic parameters and lactate

dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. Neurochemical research. 2007;32(4-5):597-607.
7. Fleisher M, Wasserstrom W, Schold S, Schwartz M, Posner J. Lactic dehydrogenase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with systemic cancer. Cancer. 1981;47(11):2654-9.
8. Ross JM, Öberg J, Brené S, Coppotelli G, Terzioglu M, Pernold K, et al. High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(46):20087-92.
9. Boumezbeur F, Mason GF, De Graaf RA, Behar KL, Cline GW, Shulman GI, et al. Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2010;30(1):211-21.
10. Zhang X, Liu H, Wu J, Zhang X, Liu M, Wang Y. Metabonomic alterations in hippocampus, temporal and prefrontal cortex with age in rats. Neurochemistry international. 2009;54(8):481-7.
11. Nussinovitch M, Finkelstein Y, Elishkevitz KP, Volovitz B, Harel D, Klinger G, et al. Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase isoenzymes in children with bacterial and aseptic meningitis. Translational Research. 2009;154(4):214-8.
12. Delank H, Engelmann G. Die Lactatdehydrogenase und deren Isoenzyme im Liquor cerebrospinalis. Journal of Neurology. 1965;187(3):256-64.
13. Glenn TC, Kelly DF, Boscardin WJ, McArthur DL, Vespa P, Oertel M, et al. Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2003;23(10):1239-50.
14. Brooks GA, Brown MA, Butz C, Sicurello JP, Dubouchaud H. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. Journal of Applied Physiology. 1999;87(5):1713-8.
15. Karlsson J, Sjödin B, Thorstensson A, Hulten B, Frith K. LDH isozymes in skeletal muscles of endurance and strength trained athletes. Acta Physiologica Scandinavica. 1975;93(2):150-6.
16. Rose LI, Bousser J, Cooper KH. Serum enzymes after marathon running. Journal of applied physiology. 1970;29(3):355-7.
17. Aveseh M, Nikooie R, Aminaie M. Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. The Journal of physiology. 2015;593(12):2635-48.
18. Pegg CC, He C, Stroink AR, Kattner KA, Wang CX. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. Journal of neuroscience methods. 2010;187(1):8-12.
19. Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2008(21):e960-e.
20. Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. European Journal of Neuroscience. 2006;24(6):1687-94.
21. Dalsgaard MK, Quistorff B, Danielsen ER, Selmer C, Vogelsang T, Secher NH. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. The Journal of physiology. 2004;554(2):571-8.
22. Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. Journal of applied physiology. 2011;111(4):1066-71.
23. Quentin C-D, Neuhoff V. Micro-isoelectric focussing for the detection of LDH isoenzymes in different brain regions of rabbit. International Journal of Neuroscience. 1972;4(1):17-24.

24. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC-1α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocrine reviews. 2003;24(1):78-90.
25. Summermatter S, Santos G, Pérez-Schindler J, Handschin C. Skeletal muscle PGC-1α controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor α-dependent activation of LDH B and repression of LDH A. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(21):8738-43.
26. Overgaard M, Rasmussen P, Bohm AM, Seifert T, Brassard P, Zaar M, et al. Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. The FASEB Journal. 2012;26(7):3012-20.
27. Van Hall G, Stømstad M, Rasmussen P, Jans Ø, Zaar M, Gam C, et al. Blood lactate is an important energy source for the human brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2009;29(6):1121-9.
28. Adeva-Andany M, Lopez-Ojen M, Funcasta-Calderon R, Ameneiros-Rodriguez E, Donapetry-Garcia C, Vila-Altesor M, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. Mitochondrion. 2014;17:76-100.
29. Aveseh M, Nikooie R, Sheibani V, Esmaeili-Mahani S. Endurance training increases brain lactate uptake during hypoglycemia by up regulation of brain lactate transporters. Molecular and cellular endocrinology. 2014;394(1):29-36.
30. Gladden L. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. The Journal of physiology. 2004;558(1):5-30.