Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 2, Jun. – Jul. 2013, Pages: 98-105

Effect of Aerobic Exercise on Circadian Rhythm of MDA and PC in Healthy and Active Male Students

Javad Vakili[1], Abbas Ali Gaeini[2], Mehdi Hedayati[3], Saeid Nikookheslat[1], Maryam Akbari[4], [5]Vahid Tarmahi

[1] Department of Sport Physiology, School of Physical Education, Tabriz University, Tabriz, Iran
[2] Department of Sport Physiology, School of Physical Education, Tehran University, Tehran, Iran
[3] Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Physical Education, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5] Imam Reza Medical Research and Training Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 2 Sep, 2012 Accepted: 18 Nov, 2012

Abstract

Backgrounds and Objectives: A few researches have performed about the circadian rhythm of oxidants. The aim of this study was to investigate effect of aerobic exhaustive exercise on Circadian rhythm of MDA and PC in a group of healthy active collegiate men with normal night sleep.

Materials and Methods: In this study. For this reason, 10 active students with mean of age: 23/2±2/57 year's old, height: 174/5±6/35 cm and weight: 65/9±4/5 kg, voluntarily participated in this study. All participants followed recommended sleep- wake programs and diet regime during two weeks for synchronization. Their wake-sleep and diet programs were under supervision from the night of beginning of sampling up to 48 hours. Control and experimental, with one week interval between them. In control group, six blood samples were collected at 4 hourly intervals started 12:00 (mid-day) until the upcoming morning samples were collected from antecubital vein. In experimental group, similar protocol was implemented. Colorimetric chemical method was used for measuring MDA and PC factors. Repeated Measures ANOVA was used for statistical study.

Results: The results showed that the plasma MDA levels exhibited a highly significant circadian rhythm in control (P = 0/014) and experimental (p=0/008) groups. But, There weren't a significant circadian rhythm for PC factor (P<0/05).

Conclusion: The result of this study showed that there is a high risk of oxidative stress injuries in the morning and exercise can vary affect rhythm of oxidative stress.

Keywords: Malondialdehyde, Protein Carbonyl, Circadian rhythm, Aerobic Exercise

Corresponding author:
E-mail: vakili.tu@gmail.com

مقاله پژوهشی

تأثیر فعالیت ورزشی هوازی بر تغییرات شبانه روزی مالون دی آلدئید و پروتئین کربونیل مردان سالم فعال دانشگاهی

جواد وکیلی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تبریز، ایران، نویسنده رابط
E-mail: vakili.tu@gmail.com
عباسعلی گائینی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی ، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مهدی هدایتی: مؤسسه پژوهشی علوم غدد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
سعید نیکوخصلت: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تبریز، ایران
مریم اکبری: دیارتمان تربیت بدنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
وحید طرماحی: مرکز آموزشی درمانی و تحقیقاتی امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۶/۱۲ پذیرش: ۹۱/۸/۲۸

چکیده

زمینه و اهداف: تغییرات شبانه‌روزی اکسیدان‌ها موضوعی است که تحقیقات زیادی درباره آنها انجام نشده است و نتایج تحقیقات موجود نیز درباره آنها متناقض می باشد. لذا هدف از این تحقیق بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز بر تغییرات شبانه روزی مالون دی آلدئید (MDA) و پروتئین کربونیل (PC) مردان سالم و فعال با خواب شبانه طبیعی می‌باشد.

مواد و روش ها: روش تحقیق در این پژوهش از نوع نیمه تجربی بود. به همین منظور ۱۰ دانشجوی فعال با میانگین و انحراف استاندارد سن: ۲/۵۷± ۲۳/۲ سال، قد: ۶/۳۵±۱۷۴/۵، وزن: ۴/۵±۶۵/۹ کیلوگرم به صورت داوطلبانه انتخاب شدند و برای یکسان سازی به مدت دو هفته برنامه خواب- بیدار و برنامه غذایی ارائه شده توسط محقق را دنبال کردند. از شب قبل شروع نمونه گیری به مدت ۴۸ ساعت آزمودنی‌ها در شرایط تحت کنترل محقق قرار گرفتند و خواب – بیداری و برنامه غذایی آنها بدقت کنترل شد. نمونه‌گیری از آزمودنی ها در دو شرایط کنترل و بعد از فعالیت ورزشی (تجربی) به فاصله یک هفته از یکدیگر انجام شد. خون‌گیری به میزان ۴ میلی لیتر از هر دو گروه در ۶ وهله و در فواصل زمانی ۴ ساعته به مدت ۲۴ ساعت از ورید بازویی انجام شد. اولین مرحله خون‌گیری در گروه کنترل از ساعت ۱۲ و برای گروه تجربی بعد از فعالیت ورزشی و از ساعت ۲۰ آغاز شد. برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید و پروتئین کربونیل از روش رنگ سنجی شیمیایی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر استفاده شد. سطح معنی‌داری فرضیات (α=۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج تحلیل آماری با تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر، تغییرات شبانه روزی معنی‌داری را در عامل MDA در گروه کنترل (P=۰/۰۱۴) و تجربی (P=۰/۰۰۸) نشان داد. اما در عامل PC در دو گروه تغییرات معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد ارگانیسم در اوایل صبح بیشتر در معرض استرس اکسایشی قرار می‌گیرد و فعالیت ورزشی می‌تواند ریتم شبانه روزی اکسیدان ها را تغییر دهد.

کلید واژه ها: مالون دی آلدئید، پروتئین کربونیل، ریتم شبانه‌روزی، فعالیت ورزشی هوازی

مقدمه

اغلب فعل و انفعالات زندگی جانداران و از جمله انسان از ریتم-های شبانه‌روزی مثل چرخه‌های استراحتی و فعالیت تبعیت می-کنند. این ریتم‌ها همچنین در شرایط ثابت مثل تاریکی/تاریکی، دوره های ۲۴ ساعته دارند که توسط مکانیسم های ژنتیکی مولکولی تحت عنوان ساعات شبانه‌روزی که در هسته چلیپایی یا سوپرا کیاسماتیک هیپوتالاموس قرار گرفته‌اند، تولید می‌شود (۱). هماهنگی شبانه‌روزی فعل و انفعالات فیزیولوژیکی و سلولی در سلامتی ارگانیسم تاثیر گذار است و ضمناً در مهار بیماری‌هایی نظیر سرطان و پیری زودرس اثر می‌گذارد (۲).

ساختار شبانه‌روزی چرخه‌های فعالیتی/استراحتی به تغییرات گونه-های اکسیژن واکنشی (ROS) اشاره دارد که به عنوان فرآورده‌های جانبی تغییر در فعالیت بدنی و سرعت فرایندهای سوخت‌وسازی تولید می‌شوند (۳). ROS به لحاظ شیمیایی اکسیژن فعالی هستند که بنیان‌های آزاد و مشتقات آنها را دارند. این گونه‌ها نقش کلیدی

را در فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تنظیم تون عروقی، کنترل تنفسی، پاسخ‌های التهابی و غیره ایفا می‌کنند و همزمان، غلظت های زیاد آنها برای ارگانیسم‌های زنده به شدت زیان‌بارند؛ زیرا اثرات مخربی بر همه ماکرومولکول های بیولوژیکی اصلی بدن دارند (۴). برای جلوگیری از افزایش ROS، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی درون و برون سلولی، یک سری آنزیم های ضد اکسایشی را بیان می‌کنند. وقتی دفاع آنتی اکسیدانی برای حفظ تعادل ردوکس ناتوان شود، مقادیر مازاد ROS باعث ایجاد استرس اکسایشی می‌شود (۴). مطالعات ریزمولکولی، ریتم‌های شبانه روزی را در بیان برخی اکسیدان‌ها و آنزیم‌های ضداکسایشی گزارش کرده اند (۲). این ریتم‌ها می‌توانند از ارگانیسم در برابر مقادیر مازاد ROS و پیامد آن آسیب به ماکرومولکول‌های بیولوژیکی محافظت کنند؛ ولی شواهد تجربی اندکی وجود دارد که از این فرضیه حمایت کند (۴ و ۵). اکسیدان‌ها می‌توانند به صورت دوره ای تحت تاثیر عوامل درونی و بیرونی تولید شوند. در حیوانات مقدار قابل ملاحظه ای (۲ تا ۵ درصد) اکسیژن تنفسی در میتوکندری به طور موقتی به بنیان های آزاد تبدیل می‌شود که این بنیان ها در بیشتر گونه ها و بافت ها تا فراتر از ۹۰ درصد گونه های اکسیژنی واکنشی را تشکیل می‌دهند (۵).

در سال‌های گذشته و به ویژه در یک دهه گذشته پژوهش‌های گوناگونی درباره ROS و تأثیر برنامه های تمرینی مختلف همراه با مصرف مکمل‌ها درباره آنها انجام شده است. باوجود این، پژوهش‌های کمی درباره ریتم شبانه روزی ROS در نمونه‌های حیوانی و انسانی انجام شده است. یافته‌های این پژوهش‌ها نشان می‌دهد فعالیت ROS در لکوسیت‌های ماهی‌ها (۶) و مقادیر آنیون SOX کبوترها (۷) تغییرات شبانه‌روزی داشته و میزان آنها در تاریکی کمترین مقدار و در دوره روشنایی بیشترین مقدار بود. در یکی از اندک پژوهش‌های انسانی نیز تغییرات شبانه‌روزی بنیان-های آزاد در ۱۰ مرد سالم بررسی و نوسانات شبانه‌روزی در مقادیر TBARS، تیول های پلاسمایی (گلوتاتیون) و SOD گزارش شدند که مقادیر اوج TBARS و تیول های پلاسمایی – هر دو– در ساعت ۱۶ و کمترین مقادیر آنها در ساعت ۴ بودند (۸). در سال ۲۰۰۲ نیز در پژوهشی، تغییرات شبانه روزی اکسیدان ها در مردان سالم و بیماران دیابتی نوع ۲ مطالعه شد و در تناوب‌های ۳ ساعته، ظرف ۲۷ ساعت سرم خون و ادرار آزمودنی‌ها جمع آوری شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد در افراد سالم تغییرات شبانه‌روزی معنی‌داری در ۸ هیدروکسی دی اکسی گوانوزین (OHDG۸)، اسید اوریک و اکسید نیتریک مشاهده شد ولی در عوامل مالون دی آلدئید (MDA) و ISA این تغییرات به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. اوج غلظت سه شاخص اکسایشی در ادرار همانند اسید نیتریک سرمی در ساعات اولیه عصر در هر دو گروه رخ داد (۹).

پژوهش‌ها درباره تأثیر استرس و از جمله استرس ورزشی بر تغییرات شبانه‌روزی ROS بسیار اندکند. در تنها مطالعه انجام شده، ریتم شبانه‌روزی اکسیدان ها در پاسخ به استرس اکسایشی در مگس ها بررسی شد. در این پژوهش، مگس‌های پنج روزه در شش گروه و در ساعات ۱، ۵، ۹، ۱۳، ۱۷ و ۲۱ به مدت چهار ساعت در معرض استرس اکسایشی (H_2O_2) قرار گرفتند تا میزان مرگ و میر ناشی از استرس اکسایشی مشخص شود. نتایج نشان داد میزان مرگ و میر دو روز بعد از آزمایش در مگس‌هایی که در ساعت پنج عصر و پنج صبح در معرض H_2O_2 بودند، به‌ترتیب بیشترین و کمترین بود. مقادیر PC تام در سر مگس هایی که در ساعت ۱۷ در معرض H_2O_2 قرار داشتند در مقایسه با گروه ساعت پنج به صورت معنی داری (۲/۶ برابر) بیشتر بود (۲).

همان طور که از یافته های فوق استنباط می‌شود در اغلب پژوهش‌ها تولید بنیان‌های آزاد ریتم شبانه‌روزی دارد، اما در نتایج این پژوهش‌ها همخوانی وجود ندشته است (۲،۶،۷،۸،۹). به علاوه، بیشتر مطالعات درباره فعالیت ورزشی و تأثیر آن بر تولید بنیان‌های آزاد نشان می‌دهند فعالیت ورزشی حاد (کوتاه مدت) در تولید ROS به‌ویژه فعالیت‌های با شدت‌های بالا (۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و بیشتر) سهیم‌اند (۹). در تحقیقی نیز گزارش شد که اجرای فعالیت هوازی با ۷۰ درصد توان هوازی بیشینه اما در مدت زمان طولانی (یک ساعت) می‌تواند به افزایش تولید بنیان‌های آزاد منجر شود (۹). باوجود این، در جستجوهای به عمل آمده، پژوهشی درباره تأثیر فعالیت ورزشی (به عنوان محرکی مؤثر بر ریتم شبانه‌روزی) بر مقادیر اکسیدان‌ها و آنتی-اکسیدان ها مشاهده نشد و اغلب پژوهش‌ها درباره زمان فعالیت در روز بر عملکرد بدن، توان هوازی، فشار خون و سیستم انعقادی و پلا کت‌ها، مقادیر هورمون‌های رشد، تستوسترون و کورتیزول و پاسخ سیستم ایمنی بوده است. لذا، با توجه به نقش ساعات شبانه-روزی در دفاع ارگانیسمی کارآمد در برابر ROS خارجی و حفظ تعادل بین تولید و دفع ROS خارجی و هم‌چنین شناخت تغییرات شبانه‌روزی در شروع و بعد از فعالیت‌های اکسایشی، محقق تلاش می‌کند در وهله اول تغییرات شبانه‌روزی برخی از اکسیدان‌ها (MDA و PC) و در گام بعدی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز بر تغییرات شبانه روزی آنها را در مردان فعال بررسی کند.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی بود. جامعه آماری تحقیق حاضر دانشجویان پسر غیرسیگاری ۲۰ تا ۳۰ سال بودند که از هیچ نوع مکمل، الکل یا درمان دارویی استفاده نمی‌کردند. آزمودنی‌هایی مجاز به شرکت در این پژوهش بودند که در شش ماه گذشته در هیچ فعالیت ورزشی مستمر و منظم شرکت نداشتند، در هشت هفته قبل از شرکت در پژوهش مسافرت در عرض جغرافیایی نداشتند، ریتم خواب و بیداری تقریبا منظمی داشتند، روزانه سه وعده غذایی اصلی مصرف می‌کردند و بین ساعات ۲۳ تا ۱ صبح خوابیده و بین ساعات ۷:۰۰ تا ۹:۰۰ صبح بیدار می‌شدند. از میان جامعه آماری فوق ۱۲ نفر به صورت داوطلبانه به عنوان نمونه آماری تحقیق انتخاب شدند. بدین صورت که ابتدا آگهی شرکت در تحقیق در محوطه دانشگاه و تابلوی اعلانات نصب گردید و همچنین از طریق همکاران و آشنایان از نفرات واجد شرایط دعوت به همکاری شد، در ضمن به اطلاع آزمودنی‌ها رسانده شد

که از بابت شرکت در این طرح پاداش مادی نیز دریافت می‌کنند. سپس از بین داوطلبان شرکت در تحقیق بعد از تکمیل پرسشنامه سلامتی، ۱۲ نفر به صورت تصادفی انتخاب و فرم رضایت نامه را تکمیل کردند. در ادامه فرایند کار، ۲ آزمودنی از حضور در طرح انصراف دادند لذا تحقیق با ۱۰ نفر با میانگین و انحراف استاندارد سن: ۲/۵۷± ۲۳/۲ سال، قد: ۶/۳۵± ۱۷۴/۵ سانتی متر، وزن: ۴/۵± ۶۵/۹ کیلوگرم و درصد چربی: ۳/۸± ۹/۷ اجرا شد. یک هفته قبل از شروع خون گیری آزمودنی ها در ساعات بین ۹ تا ۱۱ در محل آزمایشگاه دانشگاه حضور یافتند. قد، وزن و درصد چربی بدنی آنها با استفاده از آزمون سه نقطه‌ای پولاک و جکسون از نواحی سینه، شکم و ران اندازه‌گیری شد (جدول ۱). سپس آزمودنی‌ها، آزمون ۷ مرحله‌ای آزمایشگاهی بروس (که توسط رابرت بروس در سال ۱۹۶۳ معرفی شد) را برای تعیین VO_2max و ضربان قلب بیشینه روی نوارگردان (Technogym ساخت کشور آلمان) اجرا کردند. قبل از شروع آزمون بروس، آزمودنی ها به مدت ۱۰ دقیقه حرکات کششی انجام دادند. مدت زمان، VO_2max و ضربان قلب بیشینه آزمودنی ها در لحظه درماندگی ارادی ثبت شد. سپس با استفاده از فرمول $MHR\% = 0/64 \times VO_2max\% + 37$ ضربان قلب معادل ۷۰ درصد VO_2max محاسبه شد. به دلیل تاثیر عوامل مختلف نظیر الگوهای غذایی و محدودیت‌های غذایی، تغییرات هورمونی ناشی از وعده غذایی، نور، گرما، یونیزاسیون هوا و فعالیت های اجتماعی بر ریتم‌های شبانه‌روزی بدن (۱۱) از یک گروه و به صورت متقاطع (cross over) در دو جلسه متفاوت و با فاصله یک هفته‌ای در این تحقیق استفاده شد. انتخاب دو گروه متفاوت برای گروه کنترل و تجربی می‌توانست محدودیت های غیرقابل کنترلی مثل الگوهای شبانه‌روزی متفاوت در دو گروه ایجاد کند و کنترل تغذیه و چرخه خواب- بیداری، برنامه فعالیت روزانه آنها خیلی دشوار باشد. آزمودنی‌ها برای اجرای فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز به‌مدت سه دقیقه خود را گرم کردند و بعد روی دستگاه نوارگردان شروع به دویدن کردند. سرعت آغازین نوارگردان شش کیلومتر بر ساعت بود که در ادامه در هر دو دقیقه دو کیلومتر بر ساعت بر سرعت آن افزوده شد تا جایی که ضربان قلب آزمودنی ها به ۷۰ درصد VO_2max یا ۸۱/۸ درصد ضربان قلب بیشینه برسد. بعد از آن سرعت نوارگردان ثابت ماند و آزمودنی ها به دویدن خود ادامه دادند تا زمانی که داوطلبانه و به صورت اختیاری درماندگی خود را اعلام کردند. در لحظات انتهایی دوی هوازی برای رسیدن به درماندگی فیزیولوژیکی آزمودنی‌ها، پژوهشگر به‌طور مداوم آزمودنی‌ها را تشویق به دویدن بیشتر کرد تا به درماندگی واقعی برسند. هنگام دویدن آزمودنی‌ها می‌توانستند، آزادانه آب بنوشند.

جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد متغیر های سن، قد، وزن و در صد چربی (n=۱۰)

سن (سال)	قد (سانتی متر)	وزن (کیلوگرم)	چربی بدن (درصد)
۲۳/۲ ±۲/۵۷	۱۷۴/۵ ±۶/۳۵	۶۵/۹ ±۴/۵	۹/۷ ±۳/۸

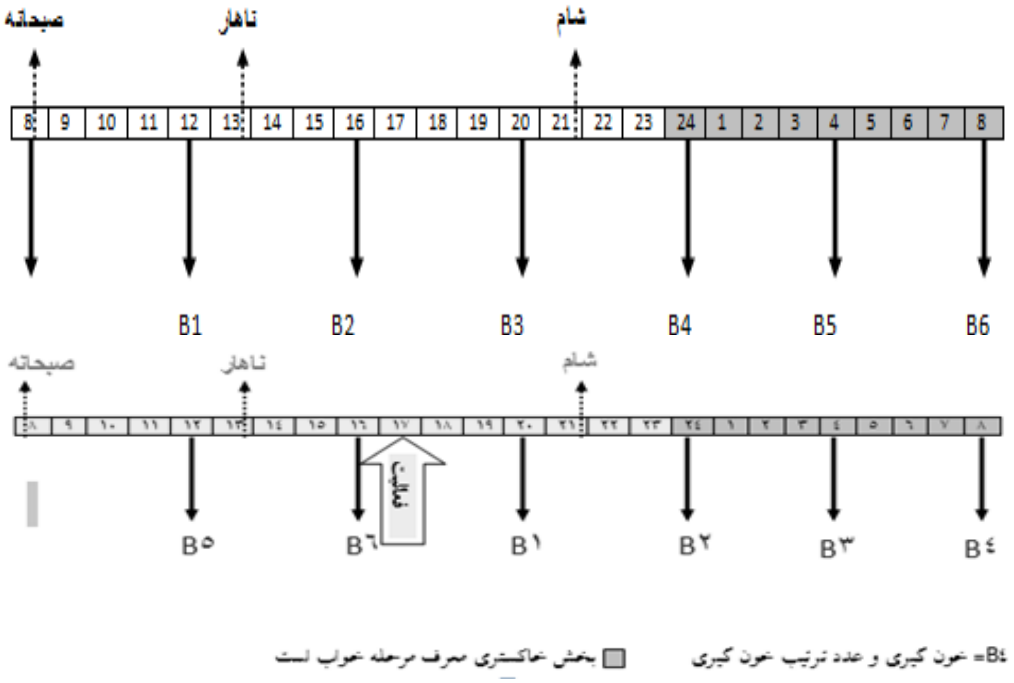
در این تحقیق بعد از انتخاب آزمودنی‌ها از جامعه آماری واجد شرایط، از آنها خواسته شد به مدت دو هفته برنامه ارائه شده توسط محقق را دنبال کنند. آزمودنی ها موظف بودند روزانه سه وعده غذایی معمولی را در ساعات ۷:۳۰ تا ۸:۳۰ صبح، ۱۳ تا ۱۴ و ۲۱ تا ۲۲ مصرف کنند. به آزمودنی ها توصیه شد که برنامه غذایی عادی و متعارف را مصرف کنند و از مصرف هرگونه مکمل، دارو یا ماده غذایی با ترکیبات ناشناخته خودداری کنند (۱۲). برای همسان‌سازی زمان خواب و بیداری در این دو هفته نیز از آزمودنی‌ها خواسته شد که برنامه خواب و بیداری خود را با محقق هماهنگ کنند و بین ساعت ۷:۳۰ تا ۸ بیدار شوند و بین ۱۱:۳۰ تا ۱۲ چرخه خاموشی را آغاز کنند (با توجه به اینکه این تحقیق در وسط تابستان انجام شد ساعات خواب- بیداری و غذا خوردن نسبت به پژوهش‌ها قبلی کمی تفاوت داشت). از روز قبل از شروع نمونه گیری نیز آزمودنی ها کاملاً در اختیار محقق بودند و در مهمان سرایی که توسط محقق برای آنها درنظر گرفته شده بود اسکان یافتند و به‌مدت ۴۸ ساعت تغذیه و چرخه خواب- بیداری آنها به دقت کنترل شد. ارائه این برنامه برای رعایت و یکسان سازی الگوی غذایی آزمودنی‌ها انجام شد که مشابه با برنامه غذایی سایر روزهای آزمودنی‌ها بود. آزمودنی‌ها برنامه فعالیت‌های روزمره خود را در این ۴۸ ساعت انجام دادند و از آنها خواسته شد که از اجرای فعالیت‌های سنگین و استرس‌زا خودداری کنند. گروه کنترل در ساعت ۱۱:۵۰ دقیقه در محل آزمایشگاه حاضر شد و نمونه های خونی توسط متخصص خون‌گیری از ورید بازویی به میزان ۴ میلی لیتر گرفته شد. خون‌گیری از آزمودنی‌ها در فواصل زمانی ۴ ساعته و از ساعت ۱۲ ظهر در شش وهله به مدت ۲۴ ساعت گرفته شد. زمان‌های خون گیری عبارت بودند از ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۴ و ۸ . گروه تجربی نیز در ساعت ۱۷:۰۰ فعالیت ورزشی هوازی را تا رسیدن به درماندگی اجرا کرد. خون‌گیری از گروه تجربی نیز از ساعت ۲۰:۰۰ آغاز شد و در فواصل زمانی چهار ساعته تا ساعت ۱۶:۰۰ روز بعد ادامه یافت. زمان‌های خون‌گیری در این گروه نیز ۲۰، ۲۴، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ بود. آزمودنی‌ها بعد از نمونه-گیری در ساعت ۲۴ وارد چرخه خاموشی شده و در ساعت ۴:۰۰ برای خون گیری لحظه‌ای از خواب بیدار شدند و بلافاصله بعد از خون‌گیری دوباره خوابیدند. آنها در فاصله زمانی بین ۸:۰۰ تا ۲۴:۰۰ برنامه معمول خود را انجام دادند (شکل ۱). خون اخذ شده در لوله های حاوی ضد انعقاد (EDTA 3mg/ml) ریخته شد و سپس به آرامی با ضد انعقاد مخلوط شده و بلافاصله با سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پلاسمای حاصل که حدود ۲ میلی لیتر بود در ۲ میکروتیوب ۱میلی لیتر الیکوت و تا زمان جمع آوری کل نمونه ها در فریزر منفی ۸۰ درجه نگه‌داری شد. در این تحقیق برای سنجش شاخص اکسیداسیونی از دو شاخص MDA و PC استفاده شد. اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید با روش رنگ سنجی شیمیایی با استفاده از کیت کمپانی Cayman آمریکا بود. حساسیت کیت مذکور ۰.۰۸μM و ضریب تغییرات درون آزمونی آن ۵/۸٪ می باشد. اندازه‌گیری میزان پروتئین کربونیل در نمونه‌های مورد بررسی

توسط با رنگ‌سنجی شیمیایی به کمک کیت کمپانی کایمن آمریکا انجام شد. با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن توزیع ثابت شد. برای بررسی اختلاف معنی‌دار در زمان‌های مختلف شبانه‌روز از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر(repeated measure analyze of variance) با عامل بین گروهی استفاده شد و از آزمون تعقیبی LSD برای مقایسه زوج‌ها (مراحل اندازه‌گیری) استفاده شد. سطح معنی داری (آلفا) ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج تحلیل آماری برای عامل MDA در گروه کنترل نشان داد تفاوت مقادیر MDA در زمان های مختلف شبانه روز معنی‌دار بود (P=۰/۰۱۴ و F۴۵,۵=۹/۳۱۷). در مقایسه زوج‌ها با آزمون تعقیبی LSD، افزایش MDA در ساعت ۸ نسبت به ساعات ۱۲ (P=۰/۰۰۳)، ۱۶ (P=۰/۰۲۶)، ۲۰ (P=۰/۰۳۲)، ۲۴ (P=۰/۰۰۰)، ۴ (P=۰/۰۰۰) و همچنین ساعت ۲۰ نسبت به ساعات ۲۴ (P=۰/۰۱۴) و ۴ صبح (P=۰/۰۳۰) معنی‌دار بود. اما در عامل PC تغییرات آن در زمان‌های مختلف شبانه‌روز معنی‌دار نبود (P=۰/۸۱ و F۴۵,۵=۰/۴۳۷) (جدول ۲).

نتایج تحلیل واریانس با اندازه گیری‌های مکرر برای گروه تجربی بعد از حذف اثر ریتم استراحتی MDA نشان داد تغییرات MDA در زمان‌های مختلف شبانه‌روز معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۸ و F۴۵,۵=۱۲/۳۰۱) و مقادیر آن در ساعت ۸ صبح نسبت به ساعت ۱۲ (P=۰/۰۰۳)، ساعت ۲۰ (P=۰/۰۰۰)، ساعت ۲۴ (P=۰/۰۰۰) و ۴ (P=۰/۰۲) معنی‌دار بود (شکل۲). نتایج تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر برای عامل PC در گروه تجربی نشان داد تغییرات PC بعد از فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز در ساعت ۱۷:۰۰ (P=۰/۹۵ و F۴۵,۵=۰/۳۸) در زمان‌های مختلف شبانه‌روز معنی‌دار نبود (شکل ۲).

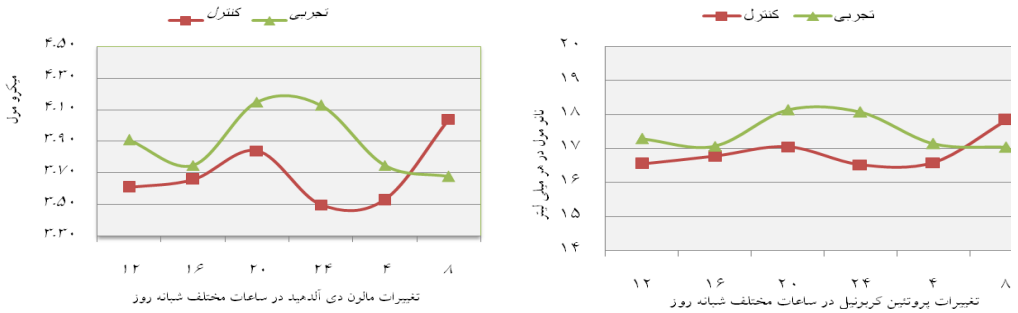


شکل ۱: طرح شماتیک پروتکل چرخه شبانه روزی در گروه کنترل و تجربی **اندازه گیری شاخص اکسیداسیون و آنتی اکسیداسیون**

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد مالون دی آلدئید و پروتئین کربونیل در ساعات مختلف شبانه روز

ساعات شبانه روز	MDA (میکرو مول)		PC (نانو مول در هر میلی لیتر)	
	گروه کنترل	گروه تجربی	گروه کنترل	گروه تجربی
ساعت ۱۲	۳/۶۰±۰/۳۱ *	۳/۹۱±۰/۶۵ **	۱۶/۵۵±۲/۲۹	۱۷/۲۹±۲/۳۰
ساعت ۱۶	۳/۶۶±۰/۳۴ *	۳/۷۵±۰/۶۵	۱۶/۷۷±۲/۰۲	۱۷/۰۷±۲/۷۳
ساعت ۲۰	۳/۸۴±۰/۳۹ *	۴/۱۵±۰/۳۵ **	۱۷/۰۵±۲/۱۱	۱۸/۱۴±۳/۰۶
ساعت ۲۴	۳/۵۰±۰/۳۱ *†	۴/۱۳±۰/۵۹ **	۱۶/۵۲±۲/۰۶	۱۸/۰۷±۲/۷۸
ساعت ۴	۳/۵۳±۰/۱۷ *†	۳/۷۵±۰/۶۱ **	۱۶/۵۹±۲/۱۲	۱۷/۱۴±۲/۳۲
ساعت ۸	۴/۰۴±۰/۳۲	۳/۶۸±۰/۳۹	۱۷/۸۴±۲/۴۱	۱۷/۰۴±۲/۷۸

* معنی دار نسبت به ساعت ۸ در عامل MDA،
† معنی دار نسبت به ساعت ۲۰ در عامل MDA،
** معنی دار نسبت به ساعت ۸ در عامل MDA (α=۰/۰۵)



شکل ۲. تغییرات شبانه روزی مقادیر *MDA* و *PC* در گروه کنترل و تجربی.

بحث

نتایج پژوهش‌هایی که درباره ریتم شبانه‌روزی انجام شده نشان می‌دهند تولید پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی اکسیدان ها ریتم‌های شبانه‌روزی را به نمایش می‌گذارند (۵). ولی درباره بیشترین و کمترین مقادیر اکسیدان‌ها در زمان‌های مختلف شبانه‌روز نتایج این پژوهش‌ها همخوانی نداشته است. لذا هدف از طرح حاضر بررسی وجود تغییرات شبانه‌روزی در دو عامل MDA و PC و همچنین تأثیر فعالیت هوازی وامانده ساز بر تغییرات ۲۴ ساعته این فاکتورها بود. در تحقیق حاضر تغییرات شبانه‌روزی معنی‌داری در عامل MDA مشاهده شد اما این تغییرات در عامل PC معنی‌دار نبود. باوجود این، الگوی تغییرات شبانه‌روزی PC و MDA مشابه می‌باشد؛ یعنی بیشترین مقادیر اکسیدانی در هر دو عامل در ساعت ۸ و ۲۰ می‌باشد. نتایج یافته‌های Rodriguez با نتایج تحقیق حاضر همسو بوده است. در این تحقیق مقادیر آنیون سوپراکساید در ۲۴ ساعت در اینتروال های دو ساعته در هتروفیل های کبوترها بررسی شد و نتایج آن نشان داد مقادیر یون آنیون سوپراکساید در دوره تاریکی کم بوده و کمترین میزان آن در ساعت ۴ صبح بوده است. در دوره روشنایی مقادیر آن افزایش یافته و در ساعت ۱۴ به نقطه اوج رسید. در تحقیق دیگری که روی ۹ آزمودنی سالم (۵ زن و ۴) مرد با میانگین سنی ۳۰ سال انجام شده، نتایج نشان می‌دهد MDA دارای تغییرات شبانه‌روزی بوده و اوج آن در ساعت ۱۵:۱۵ می‌باشد. علت وجود تناقض در نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر می‌تواند در ویژگی‌های آزمودنی‌های تحقیق باشد چرا که پاسخ-های اکسیدانی و ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها در زنان و مردان تا حدودی متفاوت می‌باشد اولاً، زنان نسبت به مردان غلظت ملاتونین بیشتری دارند، ثانیاً، استرادیول که یک هورمون زنانه می-باشد اثر آنتی اکسیدانی دارد که می‌تواند بر ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها تاثیرگذار باشد (۱۳). در تحقیق دیگری که روی ریتم روزانه (۸ صبح تا ۲۲ شب) PC در افراد سالم، افراد مبتلا به آلزایمر و همچنین افراد مبتلا به اختلال شناختی انجام شده نتایج نشان داد مقادیر حداکثر PC در گروه سالم در ساعت ۱۴ بود (۱۴). علت متفاوت بودن نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر را می-توان در زمان‌های خون گیری متفاوت عنوان کرد. نوع بافت نیز در متفاوت بودن نتایج این تحقیقات مؤثر است. برای مثال، Sani الگوی تغییرات متفاوتی را در مقادیر MDA بافت‌های مختلف موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی نشان داد. او علت این تفاوت را در میزان استفاده بافت از اکسیژن، ترکیب بافت لیپیدی و ظرفیت سم زدایی متفاوت بافت ها عنوان کرد (۱۵).

یکی از مکانیسم‌های کاهش مقادیر MDA و PC در اوقات شبانه، ترشح هورمون ملاتونین در این زمان می‌باشد. ملاتونین هورمون عصبی غده صنوبری است. ترشح این هورمون ریتم دارد و مقادیر اوج آن در شب رخ می دهد (۱۶). ترشح این هورمون با آغاز تاریکی و از ساعت ۱۰ شب شروع و در ساعت ۲ نصف شب به مقادیر اوج خود می‌رسد و سپس به تدریج کاهش یافته و در ساعت ۶ صبح به حداقل مقدار خود می‌رسد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد این هورمون در روند پیری و مهار استرس اکسایشی تاثیرگذار است و می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را به صورت افزایشی تنظیم کند (۱۶). در برخی از پژوهش‌ها بر قدرت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در تجزیه مستقیم بنیان‌های آزاد و گونه‌های واکنشی اشاره شده است (۱۷). همچنین، ملاتونین انواع آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکساید دسموتاز و کاتالاز را فعال می‌کند که می‌تواند بر مقادیر اکسیدان‌ها تاثیر گذار بوده و آنها را کاهش دهد (۱۸). به علاوه، تستوسترون نیز به عنوان هورمونی با ویژگی‌های پیش آنتی اکسیدانی در مردان شناخته شده است (۱۹) و بیشترین غلظت این هورمون نیز در ساعات آغازین صبح و در دوره شبانه می باشد و در زمان عصر مقدار آن کاهش یافته و به حداقل میزان می‌رسد (۲۰). لذا کاهش مقادیر MDA و PC در اوقاتی که مقادیر ملاتونین در اوج خود می‌باشد محتمل به نظر می‌رسد.

از دیگر عوامل تاثیرگذار بر تغییرات شبانه‌روزی اکسیدان‌ها می‌توان به تغییرات دمای بدن در اوقات مختلف شبانه‌روز اشاره کرد. دمای بدن حدود ۱ تا ۳ ساعت قبل از بیدارشدن در کمترین حد خود خواهد بود. برعکس، دمای بدن در زمان عصر به اوج خود می-رسد. افزایش دمای بدن و محیط (۲۱) می‌تواند به افزایش مقادیر گلوکوکورتیکوئیدها منجرشود. افزایش مقادیر گلوکوکورتیکوئید (که مهم‌ترین آن‌ها کورتیزول است) ریتم شبانه‌روزی دارد و اوج آن در صبح و در زمان‌های نزدیک به بیدارشدن می‌باشد (۲۱). گزارش شده است افزایش گلوکوکورتیکوئید، گلوتاتیون خون و فعالیت سوپراکساید دسموتاز اریتروسیتی را در رت‌ها کاهش می-دهد (۲۲). لذا افزایش دمای محیط می‌تواند استرس اکسایشی را از طریق افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در پلاسما و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی افزایش دهد و این مسئله می‌تواند افزایش مقادیر اکسیدانی MDA و PC را در اوقات عصر که در تحقیق حاضر نیز مشاهده شده است و کاهش مقادیر اکسیدانی را در ساعت نصف شب (۴ صبح) که دمای بدن در حداقل مقدار خود می‌باشد توجیه کند. فعالیت ورزشی درمانده ساز به ایجاد استرس اکسایشی منجر

می‌شود، شرایطی که در آن تولید بنیان آزاد فراتر از ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن است (۹). افزایش بنیان های آزاد به آسیب اکسایشی و اختلالات سلولی نظیر پراکسیداسیون لیپیدی و عدم جفت شدن میتوکندریایی و در نتیجه افزایش بیومارکرهای اکسایشی نظیر *MDA, PC* و *OX-LDL* منجر می‌شود. فعالیت ورزشی هوازی درمانده‌ساز با افزایش سرعت تشکیل بنیان‌های آزاد و استرس اکسایشی همراه است و می‌تواند سلامتی و زندگی ورزشکار را به خطر اندازد (۲۳). از آنجائی که در پژوهش حاضر *MDA* در گروه کنترل ریتم شبانه‌روزی داشت، لذا برای بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز بر ریتم شبانه‌روزی اکسیدان‌ها ابتدا اثر ریتم شرایط کنترلی حذف شده و سپس تأثیر فعالیت ورزشی بر ریتم شبانه‌روزی *MDA* بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد اجرای فعالیت ورزشی هوازی درمانده ساز تغییرات معنی داری در مقادیر *MDA* ایجاد کرد. در نمونه‌های خونی که بعد از اجرای فعالیت ورزشی از آزمودنی‌ها گرفته شد مقادیر *MDA* افزایش یافته و در ادامه و بعد از ۲۴ ساعت به مقادیر طبیعی بازگشت. تغییرات شبانه‌روزی *PC* بعد از فعالیت ورزشی، باوجود افزایش اندک، غیرمعنی‌دار بود. در مقایسه نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های دیگر، هیچ پژوهشی درباره تأثیر فعالیت ورزشی (به عنوان عامل استرس زا) بر تغییرات شبانه روزی اکسیدان ها یافت نشد، تنها در یک پژوهش، تأثیر H_2O_2 (به عنوان یک عامل استرس زا) بر میزان *PC* تام و مرگ‌ومیر مگس ها مطالعه شد. نتایج نشان داد *PC* تام در سر مگس‌هایی که در ساعت ۱۷:۰۰ در معرض استرس اکسایشی قرار داشتند، در مقایسه با گروه ۵:۰۰ افزایش معنی‌داری (۲/۶ برابر) داشت (۲). این نتایج نشان داد سیستم آنتی اکسیدانی در دوره شبانه (ساعت ۵:۰۰) کارکرد بهتری داشته و بر استرس ناشی از قرارگرفتن در معرض H_2O_2 واکنش بهتری نشان می‌دهد. برعکس، در ساعت ۱۷ سیستم آنتی اکسیدانی کارکرد مطلوبی را برای غلبه بر استرس اکسایشی خارجی ندارد. در پژوهش‌های انجام شده درباره تاثیر دوره زمانی (*time course*) بر مقادیر اکسیدان ها، *tian* نیز به نتایج مشابه با نتایج پژوهش حاضر دست یافتند. در این پژوهش بعد از فعالیت ورزشی، افزایش مقادیر اکسیدانی مشاهده شد (۲۴). *allesio* نیز گزارش کرد مقدار *MDA* هنگام فعالیت ورزشی در بافت‌های مختلف افزایش یافت. وی به این نتیجه رسید که مقدار پراکسیداسیون لیپیدی احتمالاً به شدت فعالیت بستگی دارد (۱). در پژوهش حاضر نیز افزایش مقادیر *MDA* نشان می‌دهد که چنین شدت فعالیت ورزشی به ایجاد استرس اکسایشی منجر شده است. در شرایط فیزیولوژیکی، *ROS* که به طور طبیعی در ارگانیسم های هوازی تولید می‌شوند توسط سیستم آنتی اکسیدانی سلولی خنثی می‌شوند. از آنجاکه ظرفیت ذخیره سازی آنتی اکسیدانی در بیشتر بافت‌ها نسبتاً اندک است، لذا فعالیت بدنی شدید که افزایش مصرف اکسیژن و متعاقباً افزایش *ROS* از مشخصه‌های آن است، چالشی را با سیستم آنتی اکسیدانی درپی خواهد داشت. فعالیت ورزشی حاد با شدت مناسب می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را تحریک کند. این واکنش، سازوکار دفاعی سلول در مواجهه با استرس اکسایشی است. باوجود این، فعالیت ورزشی سنگین و طولانی مدت می‌تواند به کاهش موقت محتوی ویتامین *E* بافت و تغییر وضعیت ردوکس گلوتاتیون در بافت‌های مختلف بدن منجر شود که نتیجه آن افزایش مقادیر اکسیدانی در بافت‌های مختلف می‌باشد (۱). همین مکانیسم نیز می‌تواند در توجیه افزایش مقدار *MDA* بعد از فعالیت ورزشی درمانده ساز به کار رود. مقدار *PC* در شبانه‌روز و همچنین در پاسخ به فعالیت ورزشی درمانده‌ساز تغییر معنی‌داری نداشته است. نتایج این پژوهش با نتایج Bejma و Miyazaki همخوانی داشت (۸ و ۲۵). در پژوهش‌های آنها نیز مقدار *PC* عضله اسکلتی بعد از فعالیت استقامتی درمانده‌ساز نیز افزایش معنی‌داری نداشت. در بررسی علل عدم تغییر *PC* در مقایسه با اکسیداسیون لیپیدها گزارش شد که پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین مکانیسم‌های متفاوتی در ارگانیسم دارند (۲۶). از سوی دیگر، عدم افزایش یا تغییر اکسیدان در بافت بدین معناست که فعالیت ورزشی، استرس اکسایشی معنی‌داری در آن بافت ایجاد نکرده است یا فعالیت سیستم بازسازی و پیشگیری از آسیب ناشی از استرس اکسایشی کارکرد بهتری داشته است (۱۴). برای مثال، در پژوهش Cheeseman به نظر می‌رسد پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (*DNA*) نسبت به لیپیدها، کمتر در معرض بنیان‌های آزاد قرار دارند، زیرا احتمال پیشرفت سریع شروع واکنش‌های زنجیره‌ای در این مولکول‌ها کمتر است (۲۷). در پژوهش *bloomer* نیز گزارش شد افزایش *PC* به مدت زمان فعالیت ورزش بستگی دارد و در فعالیت‌های ورزشی مثل دوی ماراتن یا ورزش سه گانه افزایش می‌یابد و تا چند ساعت بعد از فعالیت ورزشی در مقادیر بالا باقی می‌ماند (۹). لذا در پژوهش حاضر علت عدم تغییرات معنی‌دار در مقادیر پروتئینی در شرایط فعالیت ورزشی ممکن است با مدت زمان کوتاه فعالیت ورزشی (کمتر از ۲ ساعت) ارتباط داشته باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بدون توجه به ریتم شبانه‌روزی اکسیدانی در شرایط کنترلی، فعالیت ورزشی به تنهایی می‌تواند ریتم شبانه‌ورزی را در مقادیر اکسیدانی تولید کند. این ریتم درباره مقدار *MDA* معنی‌دار بوده اما در مورد مقدار *PC* غیرمعنی‌دار بود. در حقیقت، مقادیر اکسیدانی ناشی از فعالیت ورزشی در نمونه‌گیری‌های بعد از فعالیت ورزشی افزایش یافته و در ساعت ۸:۰۰ به حداقل مقدار می‌رسد. این ریتم با ریتم شبانه‌روزی اکسیدانی که در شرایط بدون فعالیت ورزشی مشاهده شد، کاملاً تفاوت داشت. در توجیه این تغییرات احتمال دارد در دوره شبانه و با افزایش مقادیر ملاتونین، سیستم آنتی اکسیدانی توانایی لازم را برای غلبه بر استرس اکسایشی ناشی از فعالیت ورزشی بدست آورد و در دوره شبانه تا ساعت ۸:۰۰ به تدریج از مقادیر اکسیدانی کاسته شود. لذا می‌توان ادعا کرد فعالیت ورزشی به تنهایی می‌تواند ریتم شبانه روزی اکسیدانی در شبانه روز تولید کند. بیشتر اجزای عملکردی دقیقاً با منحنی دمای بدن ارتباط دارد. اوج آن در ساعت ۱۸ بوده و افت ۵ تا ۱۰ درصدی عملکرد در زمان‌های شبانه نسبت به اوقات روزانه مشاهده شده است (۲). لذا باتوجه به نتایج تحقیق حاضر که بیشترین مقادیر اکسایشی MDA و PC را در ساعت ۸ صبح گزارش کردند می‌توان پیشنهاد کرد اجرای فعالیت ورزشی در ساعات آغازین روز از لحاظ سیستم اکسایشی می‌تواند برای انسان مضر باشد. به‌علاوه، فعالیت ورزشی می‌تواند جدا از اثر ریتم شبانه‌روزی تغییرات شبانه روزی معنی‌داری در ROS تولید کند. لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی تاثیر اجرای فعالیت ورزشی در زمان‌های مختلف روز بر ریتم شبانه روزی اکسیدان ها بررسی شود.

نتیجه‌گیری

مقادیر اکسیدان‌ها با توجه به نوع اکسیدان انتخاب شده ریتم شبانه روزی را نشان می‌دهد. به‌علاوه اجرای فعالیت ورزشی می‌تواند سوای اثر ساعات مختلف شبانه‌روز، ریتم اکسیدان‌ها را به‌صورت مستقل تغییر دهد.

تقدیر و تشکر

در این بخش لازم می‌دانم از پژوهشکده متابولیسم غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تبریز، مدیریت تربیت بدنی دانشگاه تبریز و دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در اجرای این تحقیق با محقق نهایت همکاری را داشتند کمال تشکر و امتنان را داشته باشم.

References

1. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; **253**: 307-312.
2. Krishnan N, Davis AJ, Giebultowicz JM. Circadian regulation of response to oxidative stress in Drosophila melanogaster. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; **374**(2): 299-303.
3. Langmesser S, Albrecht U. Life time-circadian clocks, mitochondria and metabolism. *Chronobiol Int* 2006; **23**: 151-157.
4. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev* 2007; **6**: 12-27.
5. Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 2003; **20**: 921-962.
6. Kaplan JE, Chrenek RD, Morash JG, Ruksznis CM, Hannum LG. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species zebrafish leukocytes. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2008; **151**: 726-730.
7. Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Duran J, Barriga C. Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *Journal of Pineal Research* 1999; **26**(1): 35-42.
8. Bridges AB, Fisher TC, Scott N, McLaren M, Belch JF. Orcadian Rhythm of White Blood Cell Aggregation and Free Radical Status in Healthy Volunteers. *Free Radical Research* 1992; **16**(2): 89-97.
9. Bloomer RJ, Davis PG, Consitt LA, Wideman L. Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *International Journal of Sports Medicine* 2007; **28**(1): 21-25.
10. Allesio HM. Exercise- induced oxidative stress. *Journal of Medicine and Science in Sports and Exercise* 1993; **25**(2): 218-224.
11. Wu D, Arthur I. Cederbaum. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Journal of Alcohol, Research and Health* 2003; **27**(4): 277-284.
12. Valencia E, Marin A, Hardy G. Circadian rhythmicity of whole-blood glutathione in healthy subjects . *Journal of Nutrition* 2001; **17**(9):731-733.
13. Kappila A, Pakarinen A, Kirkinen P, Makila U. The effect of season on the circulating concentrations of anterior pituitary, ovarian and adrenal cortex hormones and hormone binding proteins in the sub-artic area: evidence of increased activity of the pituitary- ovarian axis in spring. *Gynecological Endocrinology* 1987; **1**: 137-150.
14. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger, SJ, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology* 2000; **89**(1): 21-28.
15. Sani M, Boughanmi NG, Gadacha W, Sebai H, Boughattas NA, Reinberg A, et al. Malondialdehyde content and circadian variations in brain, kidney, liver, and plasma of mice. *Journal of Chronobiology International* 2007; **24**(4): 671-685.
16. Karasek M. Does melatonin play a role in aging processes? *Journal of Physiology and Phamacology* 2007; **58**(6): 105-113.
17. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**: 151–180.
18. Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *Journal of Pineal Research* 1995; **19**: 111-115.
19. Svartberg J, Jorde R, Sundsfjord J, Bonaa KH, Barrett-Connor E. Seasonal variation of testosterone and waist to hip ratio in men: the Tromso study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; **88**: 3099-3104.
20. Kraemer WJ, Loebel CC, Volek JS, Ratamess NA, Newton RU, Wickham RB, et al. The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in men. *Eur Journal of Apply Physiology* 2001; **84**: 13-18.
21. Kudielka BM, Kirschbaum C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology* 2003; **28**: 35-47.
22. Orzechowski A, Ostaszewski P, Brodnicka A, Wilczak J, Jank M, Balasińska B, et al. Excess of glucocorticoids impairs whole-body antioxidant status in young rats- relation to the effect of dexamethasone in soleus muscle and spleen. *Horm Metab Research* 2000; **32**(5): 174-180.
23. Skenderi Kp, Tsironi M, Lazaropoulou C, Anastasiou CA, Matalas AL. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *European Journal of Clinical Investigation* 2008; **38**(3): 159-165.
24. Tian y, Nie J, Tong TK, Baker JS, Thomas NE, Shi Q. Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21- km run in trained adolescent runners. *European Journal of Apply Physiology* 2010; **110**: 971-976.
25. Reilly T. Human Circadian- Rhythms and Exercise. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 1990; **18**(3): 165-180.
26. Radak Z, Asano K, Lee KC, Ohno H, Nakamura A, et al. High altitude training increases reactive carbonyl derivatives but not lipid peroxidation in skeletal muscle of rat. *Journal of Free Radical Biological Medicine* 1997; **22**: 1109-1114.
27. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Journal of British Medical Bullein* 1993; **49**(3): 481- 493.