

## اثر عصاره چای سبز بر بیان ژن TNF- $\alpha$ پس از فعالیت مقاومتی در مردان چاق: مطالعه متقاطع، تصادفی، دوسوکور، کنترل شده با دارونما

رحمان رحیمی

استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. پست الکترونیکی: r.rahimi@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: 95/11/25

تاریخ پذیرش: 96/2/20

### چکیده

**سابقه و هدف:** چای سبز حاوی مقدار زیادی آنتی اکسیدان‌های پلی فنولی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، مهار آدیپوژنز و آپوپتوز آدیپوسیت را دارند. بنابراین، در این پژوهش، تأثیر دو هفته مصرف عصاره چای سبز بر بیان ژن TNF- $\alpha$  و سطح این عامل پیش التهابی پس از فعالیت مقاومتی در افراد چاق مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در یک مطالعه تصادفی، دوسوکور، کنترل شده با دارونما و متقاطع، 8 مرد چاق (BMI بالاتر از  $30 \text{ kg.m}^2$ ) به مدت 2 هفته عصاره چای سبز (دو کیسول 500 میلی گرمی در روز) و دارونما (دو کیسول 500 میلی گرمی مالتودکستریز در روز) مصرف کردند؛ سپس در یک جلسه فعالیت مقاومتی با شدت 75% IRM شرکت کردند. نمونه‌های خون جهت اندازه‌گیری بیان ژن و سطح سرمی TNF- $\alpha$  قبل (پیش-آزمون) و بلافاصله بعد (پس‌آزمون) از فعالیت مقاومتی گرفته شدند.

**یافته‌ها:** بیان TNF- $\alpha$  mRNA در شرایط مصرف عصاره چای سبز در پیش‌آزمون 44% و پس‌آزمون 11% پایین‌تر از شرایط مصرف دارونما بود، تفاوت درصدی در بیان ژن مشاهده شد اما این نتایج از نظر آماری معنی‌دار نبودند ( $P>0/05$ ). همچنین، غلظت TNF- $\alpha$  در شرایط مصرف چای سبز در پیش‌آزمون 16/86 درصد ( $P=0/83$ ) و در پس‌آزمون 24/78 درصد ( $P=0/05$ ) نسبت به دارونما پایین‌تر بود.

**نتیجه‌گیری:** مصرف عصاره چای سبز می‌تواند از افزایش شاخص پیش التهابی TNF- $\alpha$  پس از فعالیت مقاومتی در مردان چاق جلوگیری کند.

**واژگان کلیدی:** عصاره چای سبز، شاخص پیش التهابی، فعالیت مقاومتی

### • مقدمه

چای سبز یکی از منابع عالی آنتی اکسیدان‌های پلی فنولی می‌باشد که تحت عنوان کاتچین‌ها (Catechins) نامیده شده و شامل اپی کاتچین (EC)، اپی گالوکاتچین (EGC)، اپی کاتچین گالات (ECG) و اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) می‌باشند (3). مصرف چای سبز به عنوان یک روش درمانی برای چاقی مطرح شده است که ممکن است به دلیل نقش آن در کاهش توده چربی بدن، آپوپتوز آدیپوسیت و مهار آدیپوژنز باشد (4). همچنین، دیگر فواید بیولوژیکی و فارماکولوژیکی چای سبز

شامل آلرژنیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد (5، 6) که منجر به کاهش بیان ژن و عوامل التهابی از قبیل

چاقی به عنوان یک بیماری همه‌گیر قرن 21 مطرح است که یک مشکل عمده بهداشت عمومی در جهان است و شیوع آن به طور چشمگیری هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است. شیوع چاقی در کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نیست و در مطالعات ملی ایران به نظر می‌رسد که شیوع اضافه وزن و چاقی به ترتیب حدود 27-38 و 6/12-9/25 درصد می‌باشد (1). چاقی یک مشکل تغذیه‌ای وخیم است که خطر ابتلا به بیماری‌های مانند فشار خون بالا، چربی خون، دیابت نوع 2، بیماری عروق کرونر قلب، سکتته مغزی، بیماری کبد چرب غیر الکلی، آرتروز، آپنه خواب، و سرطان‌های آندومتریوز، پستان، پروستات، و روده بزرگ را به همراه دارد (2).

سیستمی و مقاومت انسولین می‌توان از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی استفاده کرد (5). فعالیت مقاومتی شامل انقباض اکسنتریک و کانسنتریک است که فاز اکسنتریک آن سبب ایجاد آسیب عضلانی بیشتری نسبت به فاز کانسنتریک می‌گردد. پاسخ فیزیولوژیکی به آسیب بافتی شامل التهاب است که در برگیرنده تولید سایتوکاین‌های مختلف است (23). این سایتوکاین‌ها انتقال نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها به بافت عضلانی آسیب دیده را تسهیل می‌کنند. ROS تولید شده توسط نوتروفیل‌ها جهت حمله به سلول‌های آسیب دیده ممکن است سلول‌های اطراف را نیز تحت تأثیر قرار دهند و سبب آسیب و التهاب بیشتری گردند (24). افزایش تولید ROS سبب فعال‌سازی و انتقال فاکتور رونویسی NF- $\kappa$ B به هسته سلول می‌گردد که در آنجا منجر به تنظیم افزایش سنتز سایتوکاین‌های بیشتری می‌گردد (25). از سوی دیگر افراد چاق به دلیل داشتن درصد بالاتر تار عضلانی نوع II نسبت به تار نوع I، ROS بیشتری نسبت به افراد دارای وزن نرمال تولید می‌کنند (8، 2) و همچنین سطح TNF- $\alpha$  بالاتری نیز دارند (9). اثر مصرف عصاره چای سبز بر بیان ژن TNF- $\alpha$  ناشی از فعالیت مقاومتی در افراد چاق مشخص نیست و در هیچ پژوهشی مورد بررسی قرار نگرفته است. به دلیل پتانسیل چای سبز در مهار فعالیت NF- $\kappa$ B و کاهش رونویسی از عوامل پیش‌التهابی از قبیل پروستاگلاندین‌ها، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، فرض بر این است که مصرف عصاره چای سبز در مقایسه با دارونما منجر به کاهش بیان ژن TNF- $\alpha$  در لکوسیت‌ها و سطح TNF- $\alpha$  گردش خون در افراد چاق در پاسخ به فعالیت مقاومتی می‌گردد. از این‌رو، در پژوهش حاضر، اثر دو هفته مصرف عصاره چای سبز بر بیان ژن TNF- $\alpha$  و سطح غلظت این عامل پیش‌التهابی پس از فعالیت مقاومتی در افراد چاق تمرین‌نکرده مورد بررسی قرار گرفت.

#### • مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی است که به روش پیش‌آزمون-پس‌آزمون به صورت مطالعه تصادفی، دوسوکور، کنترل شده با دارونما و متقاطع انجام شد. جامعه آماری مردان چاق با دامنه سنی 40-30 بودند که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی منظمی نداشتند و از بین داوطلبان 10 مرد به صورت تصادفی انتخاب شدند که در مراحل مختلف پژوهش 2 نفر از آزمودنی‌ها انصراف دادند و نهایتاً نمونه آماری را 8 نفر تشکیل دادند. در ابتدا، از آزمودنی‌ها دعوت به عمل آمد تا در جلسه‌ی هماهنگی و توجیهی با حضور محقق در سالن ورزشی شرکت کنند. پس از شرح کامل اهداف و روش‌های اندازه‌گیری، فرم

لیپواکسیژناز، سیکلواکسیژناز، نیتریک اکساید سنتتاز و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) می‌گردد (6).

TNF- $\alpha$  یک سایتوکاین پیش‌التهابی مهم است که از سلول‌های فاگوسیت تک هسته‌ای، لنفوسیت‌های T، سلول‌های کوپفر (Kupffer) و سلول‌های اندوتلیال ترشح می‌گردد. این سایتوکاین در تنظیم التهاب و آسیب بافتی نقش دارد و همچنین، منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و مقاومت انسولین در ادیپوسیت‌ها می‌گردد که توسعه دیابت نوع 2 را در پی دارد (7). افراد چاق نسبت به افراد سالم کاهش قدرت و عملکرد عضله اسکلتی، اختلال در عملکرد تنفس میتوکندریایی عضله اسکلتی را نشان می‌دهند که با افزایش‌های در تولید گونه فعال اکسیژن (ROS) میتوکندریایی همراه است (2). همچنین، افراد چاق دارای درصد بالاتری از تارهای نوع II نسبت به تارهای نوع I عضله اسکلتی هستند که این نوع تارها دو تا سه برابر ROS بیشتری نسبت به تارهای نوع I تولید می‌کنند (8، 2). علاوه بر این نشان داده شده که TNF- $\alpha$  تنها توسط تارهای نوع II عضله بیان می‌گردد (9) و به عنوان یک کاتالیزور (catalyst) در استرس اکسیداتیو مشتق از عضله عمل می‌کند (10). تزریق TNF- $\alpha$  منجر به کاهش تولید نیروی عضله اسکلتی در مدل‌های حیوانی شده است (11) و مستقیماً منجر به از دست رفتن پروتئین عضله (11) از طریق فعال‌سازی اکسیداتیو سیگنال TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B می‌گردد (12). در ارتباط با اثر فعالیت ورزشی بر بیان ژن TNF- $\alpha$  نتایج متناقضی گزارش شده است به طوری که مطالعات افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA (14، 13)، کاهش (15) و عدم تغییر این ژن (16) را گزارش کرده‌اند. همچنین، در ارتباط با اثرات چای سبز بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA در سطوح استراحتی نیز نتایج ناهمسوی گزارش شده است (21-17). در پژوهشی Crouvezier و همکاران (20) لکوسیت‌های انسانی را در معرض EGC (epigallocatechin)، ECG (epigallocatechin-3-gallate) و EGCG (epigallocatechin-3-gallate) قرار دادند و مشاهده کردند که کاتچین‌های مذکور تأثیری بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA ندارد، در حالی که مهار بیان ژن TNF- $\alpha$  mRNA با EGCG گزارش شده است (20، 19). همچنین، Fujiki و همکاران (22) نشان دادند که EGCG منجر به مهار بیان ژن TNF- $\alpha$  و ترشح TNF- $\alpha$  در سلول‌های مختلفی شده است.

با توجه به این که برخی از پژوهش‌های انجام شده افزایش بیان ژن TNF- $\alpha$  و غلظت آن را در گردش خون سیستمی بر اثر فعالیت ورزشی حاد نشان داده‌اند (14، 13)، بنابراین جهت کاهش اثرات مخرب TNF- $\alpha$  بر عملکرد عضلانی، التهاب

قبل از انجام فعالیت ورزشی نیز یک کپسول دیگر مصرف می-کردند. کپسول‌های عصاره چای سبز و دارونما از نظر شکل ظاهری، رنگ و طعم همسان بودند. مکمل عصاره چای سبز (Green Tea extract) از شرکت Olimp لهستان خریداری گردید که هر کپسول حاوی 250 میلی‌گرم EGCG می‌باشد. قبل و بلافاصله بعد از انجام فعالیت مقاومتی نمونه خون از ورید بازویی آزمودنی‌ها جهت تعیین غلظت سرمی TNF- $\alpha$  و بیان ژن TNF- $\alpha$  گرفته شد. فعالیت مقاومتی شامل 3 ست (حرکات پرس سینه، پرس پا، زیر بغل سیم‌کش، جلو پا با دستگاه، جلو بازو ایستاده و پشت پا با دستگاه خوابیده) با 1RM 75% و 2 دقیقه استراحت بین ست‌ها و ایستگاه‌ها بود که قبل از انجام آن آزمودنی‌ها برنامه گرم کردن عمومی و اختصاصی را که 10 دقیقه طول می‌کشید، انجام می‌دادند. بعد از اتمام دوره اول (2 هفته مصرف عصاره چای سبز یا دارونما)، آزمودنی‌ها به مدت 2 هفته جهت پاکسازی (Wash Out) استراحت کردند (27)، سپس با تغییر مکمل و دارونمای آنها به مدت 2 هفته دیگر با همان شرایط قبلی به مصرف مکمل و دارونما پرداختند و دوباره در فعالیت مقاومتی با همان شرایط قبلی شرکت کردند. نمونه‌های خون در لوله‌های مخصوص جهت جداسازی سرم و استخراج mRNA به آزمایشگاه منتقل شدند در آزمایشگاه پس از جداسازی سرم، نمونه‌های سرم در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت سرمی TNF- $\alpha$  به روش الیزا و با کیت شرکت EASTBIOPHARM با شماره کاتالوگ CK-E10110 اندازه‌گیری گردید.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** استخراج RNA توسط کیت شرکت یکتا تجهیز (YT9063) و طبق پروتکل کیت انجام گردید. برای جداسازی RNA از کلروفورم و ایزوپروپانول و شستشوی آن از اتانول 75% استفاده گردید. جهت از بین بردن آلودگی‌های DNA از RNase-free برای از بین بردن DNase استفاده گردید. کل نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ جهت اندازه-گیری RNA و سنجش غلظت در طول موج‌های 260/280 و 230/280 مورد سنجش قرار گرفتند (28). سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز (YT4502) و بر اساس پروتکل سنتز cDNA شرکت سازنده و با اضافه کردن Rnase inhibitor جهت از بین بردن آلودگی سنتز cDNA انجام گردید.

**بیان ژن TNF- $\alpha$ :** به منظور اندازه‌گیری سطح بیان ژن TNF- $\alpha$  از روش Real time-PCR با استفاده از کیت Syber green شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده گردید. هر واکنش شامل 2  $\mu$ L cDNA، 2  $\mu$ L الگو، 10  $\mu$ L مسترمیکس، 10X PCR Buffer

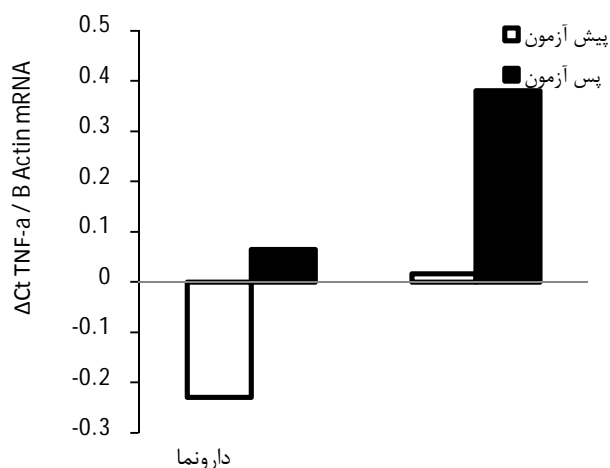
رضایت‌نامه شرکت در پژوهش تکمیل شده و پرسشنامه‌های سلامتی و یادآمد 24 ساعته‌ی رژیم غذایی در اختیار آزمودنی‌ها قرار گرفت. در هفته اول مشخصات عمومی و آنتروپومتریکی (جدول 1) اندازه‌گیری گردید و در همین هفته آزمودنی‌ها با دستگاه‌ها و حرکات فعالیت مقاومتی آشنا شدند.

#### جدول 1. ویژگی‌های جسمانی افراد چاق در شرایط مصرف چای سبز و دارونما

متغییر	گروه	میانگین $\pm$ انحراف استاندارد
سن (سال)	عصاره چای سبز	37/12 $\pm$ 5/66
	دارونما	37/12 $\pm$ 5/66
قد (متر)	عصاره چای سبز	1/77 $\pm$ 0/07
	دارونما	1/77 $\pm$ 0/07
وزن (کیلوگرم)	عصاره چای سبز	102/66 $\pm$ 14/43
	دارونما	102/42 $\pm$ 13/56
شاخص توده بدن ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ )	عصاره چای سبز	32/53 $\pm$ 2/52
	دارونما	32/48 $\pm$ 2/39
WHR	عصاره چای سبز	0/99 $\pm$ 0/03
	دارونما	1 $\pm$ 0/03

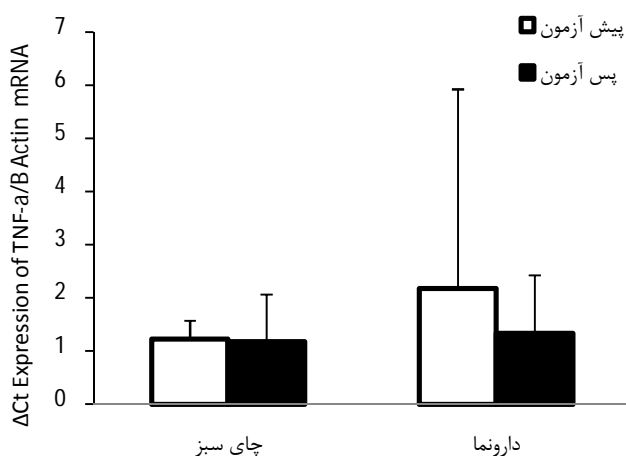
در هفته دوم یک تکرار بیشینه (1RM)، برای اندازه‌گیری حداکثر قدرت آزمودنی‌ها در هر ایستگاه، آن‌ها در حرکات پرس سینه، پرس پا، زیر بغل سیم‌کش، جلو پا با دستگاه، جلو بازو ایستاده و پشت پا در باشگاه بدنسازی اندازه‌گیری گردید (26). از آزمودنی‌ها خواسته شد که از 24 ساعت قبل از شروع دوره از مصرف مواد حاوی کافئین (چای، قهوه، نسکافه، شکلات کاکائو، و هر ماده غذایی دارای کافئین) و فعالیت‌های ورزشی خودداری کنند. لازم به یادآوری است که افراد مذکور غیر از فعالیت عادی روزانه در این مدت هیچ گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند و در طی دوره مذکور از مصرف هر گونه مکمل، دارو، سیگار و غیره به دور بودند. در هفته دوم پس از اندازه‌گیری 1RM، آزمودنی‌ها در یک مطالعه تصادفی، دوسوکور، کنترل شده با دارونما، متقاطع به دو گروه تقسیم شده و قوطی‌های حاوی کپسول‌های عصاره چای سبز (30 کپسول 500 میلی‌گرمی) و دارونما (30 کپسول 500 میلی‌گرمی مالتودکسترین) را دریافت کردند. آزمودنی‌ها روزانه دو کپسول مکمل یا دارونما را در وعده‌های پس از ناهار و شام به مدت 14 روز با آب کافی مصرف کردند (27) و در روز پانزدهم جهت انجام فعالیت مقاومتی در سالن ورزشی حاضر شدند، صبح روز پانزدهم یک کپسول مکمل یا دارونما و یک ساعت

نتایج تحلیل واریانس مربوط به  $\Delta Ct$  ژن TNF- $\alpha$  در شکل 1 ارائه شده است که حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین شرایط مصرف عصاره چای سبز و دارونما در پیش آزمون و پس آزمون می‌باشد ( $F_{(3, 39)}=0/46$  و  $P=0/71$ ).



شکل 1. تغییرات  $\Delta Ct$  مربوط به ژن TNF- $\alpha$  پیش و بلافاصله پس از فعالیت مقاومتی در دو شرایط مصرف عصاره چای سبز و دارونما به مدت دو هفته در افراد چاق

نتایج تحلیل واریانس مربوط به  $\Delta Ct$  Expression ژن TNF- $\alpha$  در شکل 2 ارائه شده است که حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین شرایط مصرف عصاره چای سبز و دارونما در پیش آزمون و پس آزمون می‌باشد ( $F_{(3, 39)}=0/49$  و  $P=0/80$ ).



شکل 2. تغییرات  $\Delta Ct$  Expression مربوط به ژن TNF- $\alpha$  پیش و بلافاصله پس از فعالیت مقاومتی در دو شرایط مصرف عصاره چای سبز و دارونما به مدت دو هفته در افراد چاق

6/8  $\mu L$  (آب)، 1  $\mu L$  از هر یک دو پرایمر جلویی و عقبی،  $\mu L$  0/4 از Tag DNA Polymerase بود، حجم نهایی واکنش  $\mu$  25 تهیه شد. پروتکل دمایی به صورت دانتوراسیون اولیه در دمای  $95C^\circ$  به مدت 10 دقیقه، به دنبال آن 40 سیکل به صورت دانتوراسیون در دمای  $95C^\circ$  به مدت 15 ثانیه، چسپیدن در دمای  $60C^\circ$  به مدت 60 ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای  $50C^\circ$  تا دمای  $90C^\circ$  به مدت 60 ثانیه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول 2 ارائه شده است و از ژن  $\beta$  Actin به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش  $\Delta Ct$  و  $\Delta\Delta Ct$  ارائه شده است.

$$\Delta Ct_{[(Supplement)pre]} = CT_{(TNF-\alpha)} - CT_{(B ACTIN)}$$

$$\Delta Ct_{[(Expression)pre]} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct_{[(Supplement)post]} = CT_{(TNF-\alpha)} - CT_{(B ACTIN)}$$

$$\Delta Ct_{[(Expression)post]} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct_{[(placebo)pre]} = CT_{(TNF-\alpha)} - CT_{(B ACTIN)}$$

$$\Delta Ct_{[(placebo)post]} = CT_{(TNF-\alpha)} - CT_{(B ACTIN)}$$

$$\Delta\Delta Ct_{[(TNF-\alpha)pre]} = \Delta Ct_{(supplement)} - \Delta Ct_{(placebo)}$$

$$\Delta\Delta Ct_{[(TNF-\alpha)post]} = \Delta Ct_{(supplement)} - \Delta Ct_{(placebo)}$$

$$Fold\ Change_{pre} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$Fold\ Change_{post} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## جدول 2. توالی پرایمرهای TNF- $\alpha$ و $\beta$ Actin

پرایمر	توالی در جهت '5 به '3	
TNF- $\alpha$	CTGCACTTTGGAGTGATCGG	Forward
	AGCTTGAGGGTTTGCTACAAC	Reverse
$\beta$ Actin	CCTTCCTTCTGGGCATGC	Forward
	CGATCCACACGGAGTACTTG	Reverse

**آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 21 انجام گردید. جهت بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین، از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر و آزمون T مستقل (تفاوت بین گروهی) و آزمون T وابسته (تفاوت درون گروهی) استفاده گردید. سطح معنی‌داری آماری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

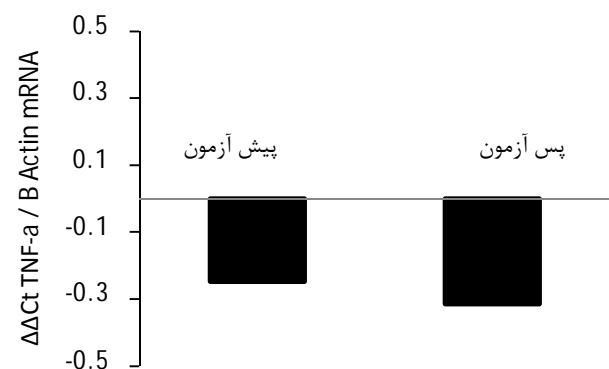
## • یافته‌ها

نتایج آزمون T مستقل در ارتباط با ویژگی جسمانی آزمودنی‌ها در جدول 1 ارائه شده است که حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار در سن، وزن، قد، BMI و WHR بین دو شرایط مصرف عصاره چای سبز و دارونما می‌باشد ( $P > 0/05$ ).

انجام شد و نتایج نشان داد که بیان TNF- $\alpha$  mRNA پس از دو هفته مصرف عصاره چای سبز 44% پایین تر از شرایط مصرف دارونما بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. که ممکن است به دلیل تفاوت های فردی یا حجم اندک نمونه باشد. این نتایج با یافته های Crouvezier و همکاران (20) همسو می باشد که نشان دادند کاتچین های ECG, EGC و EGCG اثر معنی داری بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA نداشتند. با این وجود، کاهش معنی دار بیان TNF- $\alpha$  mRNA بر اثر EGCG موجود در چای سبز در سلول های لکوسیت انسانی گزارش شده است (29). از سوی دیگر مهار بیان TNF- $\alpha$  mRNA در سلول های مختلف بر اثر EGCG یا کاتچین ها گزارش شده است (19, 21, 22).

یکی از مهم ترین پیشرفت های بشری در درک چاقی ظهور مفهوم التهاب مزمن درجه پایین (chronic low-grade inflammation) است که پایه و اساس مبنای این دیدگاه افزایش سطح سرمی چندین شاخص التهابی شامل سایتوکاین های پیش التهابی و پروتئین های فاز حاد می باشد که در چاقی سطح آنها افزایش می یابد و مهم ترین آنها IL-6, TNF- $\alpha$  و پروتئین واکنش دهنده با ماده c (CRP) می باشد (30). کاهش 44% بیان TNF- $\alpha$  mRNA بر اثر چای سبز نسبت به دارونما در مردان چاق ممکن است منجر به تنظیم کاهشی پاسخ های التهابی در این افراد گردد (31). Molina و همکاران نشان دادند که 8 هفته مصرف چای سبز سبب کاهش سایتوکاین های پیش التهابی IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  به همراه کاهش بیان ژن TLR4 در موش های چاق گردید (31). بنابراین ممکن است یکی از مکانیسم های مسئول کاهش (44 درصدی) بیان ژن TNF- $\alpha$  در پژوهش حاضر به دلیل مهار سیگنال TLR4 توسط چای سبز باشد که در پژوهش های قبلی این امر نشان داده شده که EGCG پاسخ های التهابی را مستقیماً از طریق سرکوب بیان TLR4 و سطح پروتئین آن تنظیم می کند (32). فعال سازی TLR4 منجر به تحریک مسیر سیگنالی MAPK و NF- $\kappa$ B می گردد که منجر به افزایش رونویسی عوامل پیش التهابی می گردند (31). از آنجایی که مسیر سیگنالی NF- $\kappa$ B منجر به رونویسی از عوامل پیش التهابی می گردد؛ بنابراین به نظر می رسد که یکی از مکانیسم های کاهش بیان TNF- $\alpha$  mRNA در پژوهش حاضر مهار سیگنال NF- $\kappa$ B باشد که در پژوهش های قبلی گزارش شده است (32-34). Byun و همکاران (32) و Joo و همکاران (33) نیز نشان دادند که کاهش مسیر سیگنالی

نتایج آزمون T وابسته حاکی از عدم تفاوت معنی دار بین  $\Delta\Delta$ CT و Fold change ژن TNF- $\alpha$  پس از دو هفته مصرف چای سبز و پس از فعالیت مقاومتی می باشد (شکل 2 و 3;  $P=0/09$ ,  $t=0/09$  و  $P=0/37$ ,  $t=-0/92$ ). نتایج تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر حاکی از وجود تفاوت معنی دار در غلظت TNF- $\alpha$  بین شرایط مصرف چای سبز و دارونما ( $F_{(1, 14)}=9/88$  و  $P=0/007$ ) می باشد که برای بررسی بیشتر از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده گردید و نتایج آزمون بونفرونی حاکی از عدم تفاوت معنی دار در پیش آزمون TNF- $\alpha$  بین دو شرایط ( $P=0/83$ ) و وجود تفاوت معنی دار در پس آزمون TNF- $\alpha$  بین دو شرایط ( $P=0/016$ ) می باشد. بر این اساس، نتایج حاکی از پایین بودن غلظت TNF- $\alpha$  به میزان 16/86 درصد قبل از فعالیت مقاومتی و 24/78 درصد بعد از انجام فعالیت مقاومتی در شرایط مصرف چای سبز نسبت به دارونما می باشد. همچنین، تفاوت معنی دار درون گروهی در شرایط مصرف دارونما مشاهده گردید ( $P=0/012$ ) یعنی غلظت TNF- $\alpha$  پس از انجام فعالیت مقاومتی نسبت به قبل از انجام فعالیت مقاومتی به طور معنی داری در شرایط مصرف دارونما افزایش (12/40 درصد) پیدا کرد.



شکل 3. تغییرات  $\Delta\Delta$ CT مربوط به ژن TNF- $\alpha$  پیش و بلافاصله پس از فعالیت مقاومتی پس از دو هفته مصرف عصاره چای سبز در افراد چاق در مقایسه با شرایط دارونما

## • بحث

در پژوهش حاضر، مردان چاق به مدت دو هفته اقدام به مصرف عصاره چای سبز و دارونما به صورت مطالعه تصادفی، دوسوکور، کنترل شده با دارونما، متقاطع کردند پس از پایان این مدت در یک جلسه فعالیت مقاومتی با شدت 1RM 75% شرکت کردند. جهت بررسی اثرات مصرف چای سبز بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA و سطح TNF- $\alpha$  گردش خون در قبل (پیش-آزمون) و بعد از (پس آزمون) فعالیت مقاومتی نمونه گیری خون

TLR4 ناشی از کاتچین EGCG چای سبز مسئول کاهش بیان پروتئین سایتوکاین‌های مانند IL-6 است که توسط مهار یا کاهش اتصال NF- $\kappa$ B به DNA صورت می‌گیرد. همچنین، در سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای و اندوتلیال میکرووسکولار مغزی انسان مشاهده شده که EGCG توانایی مهار NF- $\kappa$ B را دارد (35، 36).

بیان TNF- $\alpha$  mRNA پس از انجام فعالیت مقاومتی به میزان 11 درصد در شرایط مصرف چای سبز نسبت به دارونما پایین‌تر بود، اما از نظر آماری معنی‌دار نشد. نایمن و همکاران (13) نیز کاهش غیر معنی‌دار بیان TNF- $\alpha$  mRNA را پس از دوچرخه‌سواری با شدت 57% توان بیشینه در اثر مصرف 3 هفته کورستین (Quercetin) مشاهده کردند. در ارتباط با اثر فعالیت مقاومتی به تنهایی بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA نتایج متناقضی گزارش شده است (13، 15، 16) به طوری که در برخی از مطالعات افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA (13، 14)، کاهش (15) و عدم تغییر بیان این ژن (16) را گزارش کرده‌اند. در پژوهش حاضر کاهش 11 درصدی در بیان TNF- $\alpha$  mRNA در شرایط مصرف چای سبز پس از انجام فعالیت مقاومتی مشاهده شد که با نتایج پژوهش لوپس و همکاران (37) (که افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA را پس از فعالیت مقاومتی گزارش کردند) ناهمسو می‌باشد. راو و همکاران (38) نیز افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA را در نمونه‌های بیوپسی عضلات پس از انجام فعالیت مقاومتی مشاهده کردند اما در هیچ پژوهشی اثر مصرف چای سبز بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA در پاسخ به فعالیت مقاومتی مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مجموع، مصرف عصاره چای سبز (500 mg EGCG) توسط مردان چاق طی دو هفته منجر به کاهش 44% و 11% بیان TNF- $\alpha$  mRNA قبل و پس از فعالیت مقاومتی گردید که نشان دهنده اثر مثبت چای سبز در تنظیم کاهشی عامل پیش‌التهابی می‌باشد. همچنین، کاهش 16/86 و 24/8 درصدی در غلظت TNF- $\alpha$  بر اثر مصرف عصاره چای سبز (500 mg EGCG) قبل و بعد از انجام فعالیت مقاومتی در مردان چاق مشاهده گردید. با توجه به نتایج مذکور می‌توان پیشنهاد کرد که مردان چاق می‌توانند از عصاره چای سبز به عنوان یک روش تغذیه‌ای جهت تنظیم عملکرد سیستم ایمنی استفاده کنند تا از عوارض افزایش عوامل پیش‌التهابی ناشی از چاقی جلوگیری گردد.

#### سپاسگزاری

از شرکت کنندگان در پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد. هزینه‌های این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تامین اعتبار شده است (شماره 14/28278 تاریخ 1394/6/15)، بدین وسیله از همکاری و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می‌گردد.

چاقی موجب القای ماکروفاژهای M2 به M1 و از طریق کاهش تولید آرژیناز، IL-10 و افزایش تولید TNF- $\alpha$  سبب ایجاد التهاب می‌گردد (39) که در سلول‌های چربی و عضلات اسکلتی، TNF- $\alpha$  فسفوریلاسیون تیروزین IRS-1 را مهار کرده و سبب کاهش پیام‌رسانی انسولین می‌گردد که نتیجه آن ابتلا به دیابت نوع 2 می‌باشد (39). غلظت TNF- $\alpha$  در افراد چاق پس از مصرف دو هفته عصاره چای سبز (2 کپسول در روز که شامل 500 mg چای سبز) 16/86 درصد نسبت به دارونما پایین‌تر بود که با یافته‌های بوگدانسکی و همکاران (40) همخوانی دارد. همچنین، کاهش غلظت TNF- $\alpha$  پس از مصرف

میزان 11 درصد در شرایط مصرف چای سبز نسبت به دارونما پایین‌تر بود، اما از نظر آماری معنی‌دار نشد. نایمن و همکاران (13) نیز کاهش غیر معنی‌دار بیان TNF- $\alpha$  mRNA را پس از دوچرخه‌سواری با شدت 57% توان بیشینه در اثر مصرف 3 هفته کورستین (Quercetin) مشاهده کردند. در ارتباط با اثر فعالیت مقاومتی به تنهایی بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA نتایج متناقضی گزارش شده است (13، 15، 16) به طوری که در برخی از مطالعات افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA (13، 14)، کاهش (15) و عدم تغییر بیان این ژن (16) را گزارش کرده‌اند. در پژوهش حاضر کاهش 11 درصدی در بیان TNF- $\alpha$  mRNA در شرایط مصرف چای سبز پس از انجام فعالیت مقاومتی مشاهده شد که با نتایج پژوهش لوپس و همکاران (37) (که افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA را پس از فعالیت مقاومتی گزارش کردند) ناهمسو می‌باشد. راو و همکاران (38) نیز افزایش بیان TNF- $\alpha$  mRNA را در نمونه‌های بیوپسی عضلات پس از انجام فعالیت مقاومتی مشاهده کردند اما در هیچ پژوهشی اثر مصرف چای سبز بر بیان TNF- $\alpha$  mRNA در پاسخ به فعالیت مقاومتی مورد بررسی قرار نگرفته است.

چاقی موجب القای ماکروفاژهای M2 به M1 و از طریق کاهش تولید آرژیناز، IL-10 و افزایش تولید TNF- $\alpha$  سبب ایجاد التهاب می‌گردد (39) که در سلول‌های چربی و عضلات اسکلتی، TNF- $\alpha$  فسفوریلاسیون تیروزین IRS-1 را مهار کرده و سبب کاهش پیام‌رسانی انسولین می‌گردد که نتیجه آن ابتلا به دیابت نوع 2 می‌باشد (39). غلظت TNF- $\alpha$  در افراد چاق پس از مصرف دو هفته عصاره چای سبز (2 کپسول در روز که شامل 500 mg چای سبز) 16/86 درصد نسبت به دارونما پایین‌تر بود که با یافته‌های بوگدانسکی و همکاران (40) همخوانی دارد. همچنین، کاهش غلظت TNF- $\alpha$  پس از مصرف

## • References

- Jafari-Adli S, Jouyandeh Z, Qorbani M, Soroush A, Larijani B, Hasani-Ranjbar S. Prevalence of obesity and overweight in adults and children in Iran; a systematic review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2014;13(1):121.
- Hey-Mogensen M, Højlund K, Vind B, Wang L, Dela F, Beck-Nielsen H, et al. Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(9):1976-85.
- Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*. 1997;387(6633):561.
- Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity research*. 2005;13(6):982-90.
- Chatterjee P, Chandra S, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2012;3(2):136-138.
- Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Targeting of histamine producing cells by EGCG: a green dart against inflammation? *Journal of physiology and biochemistry*. 2010;66(3):265-70.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440(7086):944-8.
- Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(3):C844-C51.
- Plomgaard P, Penkowa M, Pedersen BK. Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11(4):53-63.
- Li Y-P, Reid MB. NF-κB mediates the protein loss induced by TNF-α in differentiated skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;279(4):R1165-R70.
- Wilcox P, Wakai Y, Walley K, Cooper D, Road J. Tumor necrosis factor alpha decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(5):1368-73.
- Reid M, Li YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta physiologica scandinavica*. 2001;171(3):225-232.
- Nieman DC, Henson DA, Davis JM, Murphy EA, Jenkins DP, Gross SJ, et al. Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(5):1728-35.
- Buford TW, Cooke MB, Willoughby DS. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. *European journal of applied physiology*. 2009;107(4):463.
- Natelson B, Zhou X, Ottenweller J, Bergen M, Sisto S, Drastal S, et al. Effect of acute exhausting exercise on cytokine gene expression in men. *International journal of sports medicine*. 1996;17(04):299-302.
- Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *Journal of Applied Physiology*. 1994;77(1):93-7.
- Sakagami H, Takeda M, Sugaya K, Omata T, Takahashi H, Yamamura M, et al. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Anticancer research*. 1994;15(3):971-4.
- Fujiki H, Sukanuma M, Okabe S, Sueoka E, Suga K, Imai K, et al. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor-alpha, and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea--a review. *Cancer detection and prevention*. 1999;24(1):91-9.
- Sukanuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, Fujiki H. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF-α expression. *Biofactors*. 2000;13(1-4):67-72.
- Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro-and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine*. 2001;13(5):280-6.
- Choi E-M, Hwang J-K. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;26(4):523-6.

22. Fujiki H, Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Imayoshi Y, Taniguchi S, et al. New TNF- $\alpha$  releasing inhibitors as cancer preventive agents from traditional herbal medicine and combination cancer prevention study with EGCG and sulindac or tamoxifen. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;523:119-25.
23. Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutrition research and practice*. 2010;4(4):259-69.
24. Armstrong R. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Medicine and science in sports and exercise*. 1990;22(4):429-35.
25. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1379-406.
26. Jówko E, Sacharuk J, Balasińska B, Ostaszewski P, Charnas M, Charnas R. Green tea extract supplementation gives protection against exercise-induced oxidative damage in healthy men. *Nutrition Research*. 2011;31(11):813-21.
27. Jówko E, Długołęcka B, Makaruk B, Cieśliński I. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *European journal of nutrition*. 2015;54(5):783-91.
28. Pirouzpanah M PS, Sabzichi M, Pashaei-Asl R, Pashaei-Asl M, Samadi N. The Effects of Silibinin on the Induction of Apoptosis and Inhibition of Cell Growth in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2015;9(4):1-10 [persian].
29. Sehm J, Polster J, Pfaffl MW. Effects of varied EGCG and (+)-catechin concentrations on proinflammatory cytokines mRNA expression in conA-stimulated primary white blood cell cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(17):6907-11.
30. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(5):3117-32.
31. Molina N, Bolin A, Otton R. Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. *International immunopharmacology*. 2015;28(2):985-96.
32. Byun EH, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *The Journal of immunology*. 2010;185(1):33-45.
33. Joo S-Y, Song Y-A, Park Y-L, Myung E, Chung C-Y, Park K-J, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits LPS-induced NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in bone marrow-derived macrophages. *Gut Liver*. 2012;6(2):188-96.
34. Albuquerque K, Marinovic M, Morandi A, Bolin A, Otton R. Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. *European journal of nutrition*. 2016;55(3):1261-74.
35. Yang F, Oz HS, Barve S, De Villiers WJ, McClain CJ, Varelek GW. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Molecular Pharmacology*. 2001;60(3):528-33.
36. Li J, Ye L, Wang X, Liu J, Wang Y, Zhou Y, et al. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits endotoxin-induced expression of inflammatory cytokines in human cerebral microvascular endothelial cells. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9(1):161.
37. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2007;103(5):1744-51.
38. Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, Trappe S. Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2007;62(12):1407-12.
39. Cheraghpour M, Ehrampoush E, Homayounfar R, Davoodi H, Zand H, Mimmiran P. The relationship between the immune system and the inflammatory mechanisms in obesity with insulin resistance. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013;7(5):723-35. [Persian].
40. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepien M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition research*. 2012;32(6):421-7.



41. Vincent H, Percival S, Creasy R, Alexis D, Seay A, Ann ZL, et al. Acute Effects of Enhanced Eccentric and Concentric Resistance Exercise on Metabolism and Inflammation. *Journal of novel physiotherapies*. 2014;4(2):1-10.
42. Yang S, Chen C, Liao Y, Lin F, Lee W, Cho Y, et al. Interactive effect of an acute bout of resistance exercise and dehydroepiandrosterone administration on glucose tolerance and serum lipids in middle-aged women. *Chinese Journal of Physiology*. 2005;48(1):23.
43. Fatouros I, Chatzinikolaou A, Paltoglou G, Petridou A, Avloniti A, Jamurtas A, et al. Acute resistance exercise results in catecholaminergic rather than hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation during exercise in young men. *Stress*. 2010;13(6):461-8.

## The Effect of Green Tea Extract on Expression of TNF- $\alpha$ After Resistance Exercise in Obese Men: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Study

Rahimi R

Department of Exercise Physiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email: r.rahimi@uok.ac.ir

Received 13 Feb, 2017

Accepted 10 May, 2017

**Background and Objectives:** Green tea contains large amounts of polyphenols antioxidants which has great impacts such as antioxidant activity, anti-inflammatory, inhibition adipogenesis and apoptosis of adipocytes. Therefore, in this study, effects of two weeks of green tea extract on the expression of TNF- $\alpha$  and the level of this pro-inflammatory factor after resistance exercise in obese individuals were study.

**Materials and Methods:** In a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study, eight obese men (BMI greater than  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$  30) were recruited. The subjects did not have any regular physical activity prior to the study subjects were allocated in the green tea extract (two capsules of 500 mg per day) group and placebo (two capsules of 500 mg maltodextrin days) for 2 weeks.; following the 2 weeks, participants were subjected to sessions of resistance exercise with 75% of 1RM intensity. Blood samples were taken before (pre test) and immediately after (post test) the resistance exercise to measure gene expression and serum levels of TNF- $\alpha$ .

**Results:** TNF- $\alpha$  mRNA expression was lowered a result of green tea extract consumption by 44% in pre test and 11% in post test compared with placebo, a percentage difference in gene expression were observed but these results were not statistically significant ( $p>0.05$ ). Also, the concentrations of TNF- $\alpha$  in green tea consumption was lower in pre-test 16.86% ( $P=0.83$ ) and the post-test 24.78% ( $P=0.05$ ) compared to placebo.

**Conclusion:** Green tea extract supplements can prevent the increases in the pro-inflammatory marker of TNF- $\alpha$  after resistance exercise in obese men.

**Keywords:** Green tea extract, Inflammatory marker, Resistance exercise