

# Yoğun Sportif Egzersiz ile İndüklenen Nükleer Protein İçeriğinin Akım Sitometrisi ile Ölçümü

## Flow Cytometric Measurement of Nuclear Protein Content induced by Intensive Sporting Exercise

### Zuhal Hamurcu

PhD.  
Assist. Professor of Medical Biology  
Erciyes University  
zhamurcu@erciyes.edu.tr

### Nazmi Sarıtaş

PhD.  
Assist. Prof. of College of Physical Education and Sports  
Erciyes University  
nsaritas@erciyes.edu.tr

### Halil Demirtaş

Assist. Professor of Medical Biology  
Erciyes University  
demtas@erciyes.edu.tr

*The present study was presented at the Xth National Medical Biology and Genetics Congress, 6-9, September, 2007, Antalya.*

Submitted : March 25, 2010  
Revised : June 15, 2010  
Accepted : July 06, 2010

#### Corresponding Author:

Yard. Doç. Dr. Zuhal Hamurcu  
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
38039 Kayseri – Turkey.

Phone : +90- 352 437 49 01 / 23334  
e-mail : zhamurcu@erciyes.edu.tr

#### Özet

**Amaç:** Yoğun sportif egzersiz, bedendeki oksidatif stres oluşumunu tetiklemektedir. Genelde hücre çekirdeğindeki oksidatif baskı, DNA hasarına ve nükleer proteinlerin değişimine neden olmaktadır. Organizmayı mütasyonlardan korumak için, DNA hasarı mümkün olduğu kadar kısa sürede onarılmak zorundadır. Bunun için onarım proteinleri gereklidir. Bu yüzden, çalışmamızın amacı, yoğun egzersizden dolayı nükleer protein içeriğinde bir değişikliğin olup olmadığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Yaş ortalaması 21,92±3,34 olan elit düzeyde 12 erkek atlet öğrenciyi koşu bandında Brouce protokolüne göre egzersiz yaptırıldı. Sporculardan egzersiz öncesi, egzersizden hemen ve 24 saat sonra periferik kan örnekleri alındı. Periferik kan mononükleer hücrelerden çekirdek izole edildi ve DNA/protein ölçümü için, sırasıyla propidium iyodid /floresan izotiyosiyanat ile boyandı; akım sitometride ölçüldü.

**Bulgular:** On sporcunun nükleer protein içeriğinde, egzersiz öncesine göre, egzersizden hemen sonra artış bulunurken (p=0,001), egzersiz öncesi ile 24 saat sonrası arasında fark bulunamadı.

**Sonuç:** Bulgularımıza göre, yoğun egzersiz sonucunda hücre çekirdeğindeki oksitlenmeyi/hasarı önlemek için protein içeriğinde bir artış olmakta ve bu proteinler görevlerini yaptıktan kısa bir süre sonra yeniden sitoplazmaya geçmektedirler.

Anahtar kelimeler: **Akım Sitometri; Egzersiz; Nükleer Proteinler.**

#### Abstract

**Purpose:** Intensive exercise induces oxidative stress. Oxidative stress may cause DNA damage and protein modifications. DNA damage should be repaired as soon as possible to avoid mutation to the organism. For this purpose, repair proteins are required. The aim of this study is to test whether or not intensive exercise results in an alteration in nuclear protein content.

**Material and Methods:** Twelve athletes were exposed to exercise on a treadmill. Burcu protocol was used for exercise. Peripheral bloods with heparin samples were obtained from athletes before, immediately after, and 24 hours after the exercise. Nuclei from peripheral blood mononuclear cell were isolated and stained with propidium iodide, and fluorescein isothiocyanate for DNA and proteins measurement respectively, and was measured.

**Results:** While an increase in the nuclear protein content of 10 athletes were increased immediately after exercise compared with that before exercise (p=0.001), no difference was found between the pre- and post-exercise.

**Conclusion:** Our findings suggest that intensive exercise induces an increase in the protein content to prevent the oxidation/damage in cell nucleus and these proteins return to cytoplasm after fulfilling their duty.

Key words: **Exercise; Flow Cytometry; Nuclear Proteins.**

## Giriş

Düzenli egzersizin, birçok patolojik hastalıkların oluşma riskini azalttığı, yaşam ömrünü uzattığı için sağlık açısından yararlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, uzun süreli/yoğun egzersiz sırasında alınan oksijen miktarının artmasıyla birlikte, reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretilmesi, oksidatif stresi artırarak sağlığa zarar verebilmektedir (1- 4). Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Oksijen, hücre içinde dört elektron gerektiren bir dizi reaksiyon sonucunda indirgenir ( $H_2O$ 'ya dönüşür) ve bu sırada hücre kendisi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Bu süreçte oksijenin az bir kısmı (%1- 3) tam olarak suya dönüşmez ve bu reaksiyonlarda ara ürün olarak serbest radikaller olan süperoksit anyonu ( $-O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $-OH$ ) oluşur. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaktanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi sonucu açığa çıkan serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır (5).

Oksidatif stresin, çekirdek içerisinde; DNA ve protein gibi nükleer yapılarda amino-asit oksidasyonu, protein-protein çapraz bağlarının, DNA-protein çapraz bağlarının oluşması, DNA da zincir kırıkları ve baz oksidasyonu (8-hiroksideoksiguanozin) gibi birtakım lezyonlar oluşturarak hasarlanmalara yol açtığı belirtilmiştir.(6). Çekirdek içerisinde oksidatif stresin; iyonize (iyonlaştırıcı) radyasyon, UV radyasyonu, kemoterapi, yoğun egzersiz ve çeşitli kimyasallar olmak üzere farklı kaynaklardan oluştuğu rapor edilmiştir (7). Hatta yapılan yoğun egzersizin DNA'da oksidatif hasarlanmalara yol açtığı birçok çalışmalarla gösterilmiştir (3, 8, 9). Ancak, literatürde yoğun egzersizin nükleer protein içeriğine etkisinin olup olmadığına dair bir veriye rastlanılmamıştır. Bu yüzden, çalışmamızın amacı, yoğun egzersizden dolayı nükleer protein içeriğinde bir değişikliğin olup olmadığını araştırmaktır.

## Gereç ve Yöntem

**Bireyler ve Egzersiz Protokolü.** Tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirildi. Çalışma protokolü yerel etik kurul tarafından onaylandı ve çalışma Helsinki Bildirgesine göre yürütüldü. Katılımcılardan, yazılı onam formu alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksek Okulu'nda okuyan yaş ortalaması  $21,92 \pm 3,34$  olan, sigara kullanmayan 12 atlet erkek öğrencide yapıldı. Fiziksel

egzersiz, koşu bandının hız ve eğimi üçer dakikalık aralıklarla artırılarak yapıldı (Bruce protokolü, 10)

**Periferel Kan Mononükleer Hücrelerin (PKMH) Çekirdeklerinin İzolasyonu.** Bireylerden egzersizden önce (E.Ö.), egzersizden hemen sonra (E.S.) ve 24 saat sonra (24 S.S.) 2 ml heparinli kan örneği alındı. Çekirdekler izole edildi (12, 13), 2 ml heparinli kan örneği 3 ml fikol-histopak üzerine yayıldı ve oda ısında 1300 rpm de 25 dakika santrifüj edildi. İzole olan PKMH'ler pastör pipeti ile başka bir tüpe alındı ve PBS soluyonu (5g FA- Bacto Buffer Difco kat no: 223142, 500 ml distile suda çözüldü) ile oda ısısında 900 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı ve hücrelerin üzerine 500 ml Nükleer İzolasyon Solusyonu (NİS: 0,661 g Tris-HCl Sigma kat no: T-3253; 0.097; Tris-base Sigma kat no: T-1503; 0.29 g NaCl Merck kat no: 6400; 0.04 g EDTA- tetra Na Sigma kat no: ED455; 0.50 ml NP-40 Sigma kat no: 127087-87-0 100 ml distile suda çözüldü, pH = 7.53) ilave edildi. Süspansiyonun ml'sinde  $1 \times 10^6$  çekirdek olacak şekilde NİS ile sulandırıldı.

**Çekirdeklerin Boyanması.** Hücre süspansiyonun 1 ml'si akım sitometresinde ölçüm için kullanılan tüpe transfer edildi. Üzerine 1 ml 900 µl NaCl-bikarbonat solusyonu (10,18 g NaCl + 0,25 g  $NaHCO_3$  100 ml distile suda çözüldü), 100 µl flöresan izotiyosiyanat (FITC) solusyonu (6 mg flöresan izotiyosiyanat Sigma F-7250, 2 ml bikarbonat solusyonunda çözüldü ve NaCl-bikarbonat solusyonu ile 1:1000 oranında sulandırıldı.) ve 1 ml propidiyum iyodid (PI) solusyonu (6 mg propidiyum iyodid 6 ml NaCl-bikarbonat solusyonunda çözüldü. NaCl-bikarbonat solusyonu 1:14.3 oranında sulandırıldı.) ilave edildi. Bu karışım akım sitometrisinde ölçülmeden önce 30 dakika 4 °C'de inkübe edildi (11, 12).

**Akım Sitometri.** PKMH çekirdeklerinin DNA ve protein içeriklerinin analizi için Becman Coulter Epics XL-MCL flow cytometer kullanıldı ve her bir örnek için 10.000 çekirdek ölçüldü. PI ve FITC'nin uyarılması için tek lazerli 488 nm dalga boyunda argon iyon lambası kullanıldı. Uyarılma sonucunda kırmızı flöresan emisyonu (PI) (F=620, FL3, F: Flüoresan, FL3: Kırmızı Flüoresan) DNA içeriğini ve yeşil flüoresan emisyonu (FITC) (F=525, FL1: Yeşil Flüoresan) protein içeriğini göstermektedir. Değerlendirme için akım sitometride ölçüm sonucunda elde edilen sonuçlardan FL1 (protein) ve FL3 (DNA)'ün *mean X* verileri kullanıldı.

**İstatistiksel Analiz.** Verilerin normal dağılıma uygunluğunu test edildikten sonra, istatistiksel değerlendirme *Genel Linear Model (GLM)* içerisinde yer alan tekrarlanan ölçümlerde varyans analiz kullanılarak yapıldı. Farklılıkları belirlemek için *Scheffe* testi uygulandı. Anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alındı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

### Bulgular

Çalışmaya katılan öğrencilerin özellikleri ve maksimum oksijen alma kapasiteleri (VO<sub>2</sub> max) Tablo I’de verildi. Öğrencilerin egzersiz öncesi, egzersiz sonrası, 24 saat

sonrası periferik kan mononükleer hücreler’in çekirdek protein içerikleri ise tablo II’de sunuldu. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre verilerin normal dağılım gösterdikleri bulundu ( $p=0,152$ ).

Çalışmaya katılan atlet öğrencilerin nükleer protein içerikleri egzersiz öncesine göre, egzersizden hemen sonra artmış bulunurken (sırasıyla  $168,49 \pm 5,08$  ve  $180,11 \pm 7,58$ ;  $p=0,001$ , egzersiz öncesi ile 24 saat sonrası arasında fark bulunamadı (sırasıyla  $168,49 \pm 5,08$  ve  $169,12 \pm 5,45$ ;  $p=1.000$  Tablo 2). Bir gönüllünün (A.D) örnek ölçüm sonuçları ise Şekil 1’de verildi.

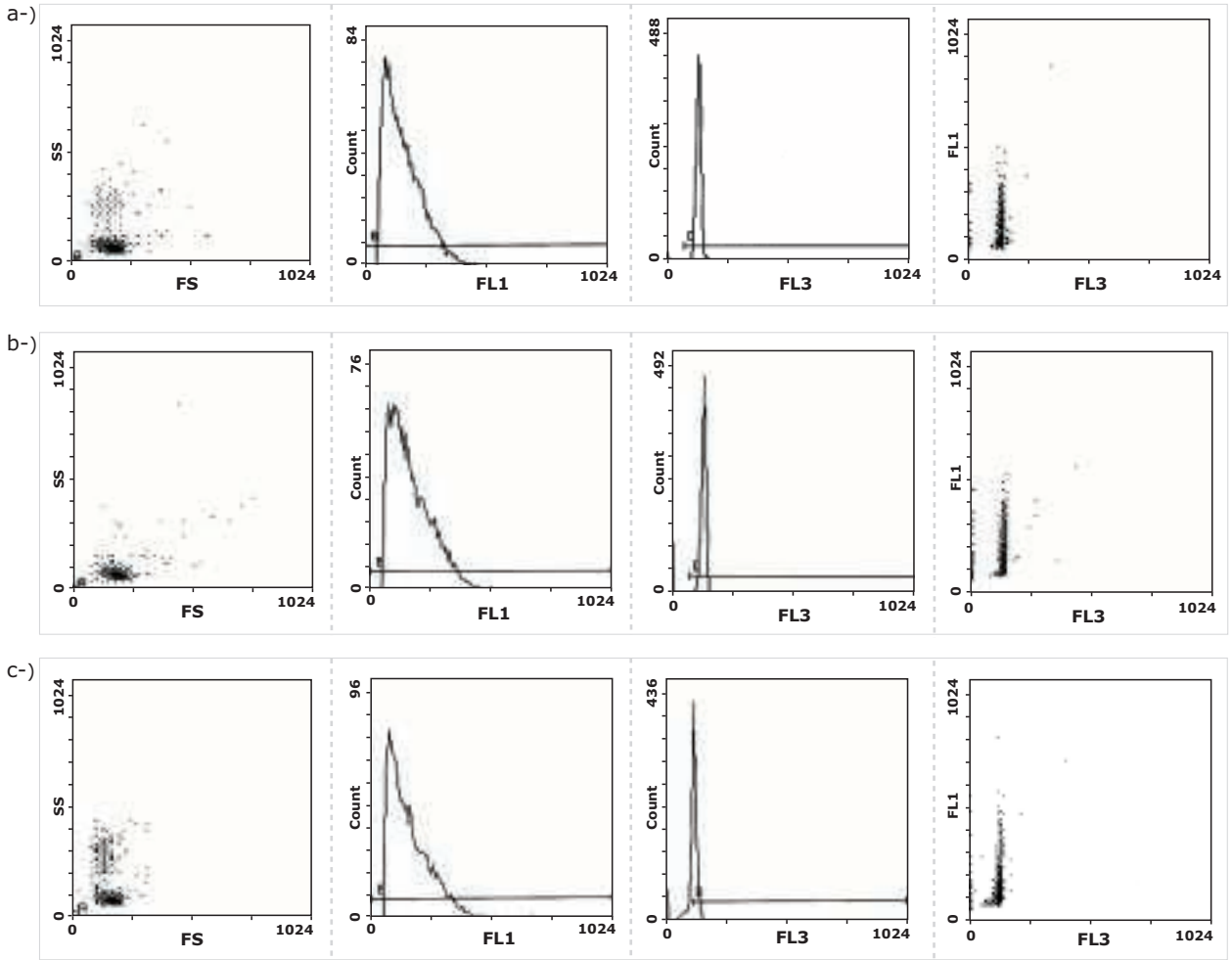
**Tablo I.** Öğrencilerin Özellikleri ve Maksimum Oksijen Alma Kapasiteleri

Öğrenci (n=12)	Yaş (yıl)	Boy (cm)	Vücut Ağırlığı (kg)	Vücut Kitle indeksi (kg/cm <sup>2</sup> )	Sporcu yılı	VO <sub>2</sub> max (ml/kg/dk)
EM	18	161,00	52,00	20,10	6	64,90
TC	26	170,00	65,00	22,50	10	65,20
AÇ	26	175,00	62,00	20,20	12	65,00
EB	19	177,00	69,00	22,00	7	64,40
EI	18	165,00	55,00	20,20	6	62,10
İÖ	23	178,00	72,00	22,70	2	60,00
AD	21	183,00	76,00	22,70	7	63,70
AG	20	176,00	72,00	23,20	6	45,50
KY	19	170,00	54,00	18,70	7	62,00
UM	21	183,00	72,00	21,50	4	53,80
AY	25	176,00	77,00	24,90	18	54,80
AK	27	176,00	74,00	23,90	8	55,10
Ortalama	21,92	174,17	66,67	21,88	7,75	59,71
Standart sapma	3,34	6,62	8,92	1,80	4,11	6,15

VO<sub>2</sub> max: maksimum oksijen alma kapasitesi

**Tablo II.** Öğrencilerin Egzersiz Öncesi, Egzersiz Sonrası, 24 Saat Sonrası Periferik Kan Mononükleer Hücreler’in Çekirdek Protein İçerikleri (F<sub>525</sub> mean X).

Öğrenci (n=12)	Egzersiz Öncesi F <sub>525</sub> mean X	Egzersiz Sonrası F <sub>525</sub> mean X	24 Saat Sonrası F <sub>525</sub> mean X
EM	165,90	177,40	164,70
TC	161,60	174,10	169,60
AÇ	178,40	175,60	168,20
EB	164,90	185,60	166,80
EI	170,10	192,90	177,70
İÖ	175,40	185,90	176,40
AD	169,80	182,40	173,60
AG	166,60	180,30	161,10
KY	165,60	165,30	163,60
UM	166,60	181,60	169,50
AY	169,10	173,60	169,20
AK	165,40	177,40	162,60
Ortalama	168,28	179,34	168,58
Standart Sapma	4,69	7,14	5,28



Şekil 1. Bir gönüllünün (A.D) örnek sonuçları. a. Egzersiz öncesi ( $F_{525}$  mean X: 169,3); b. Egzersiz sonrası ( $F_{525}$  mean X: 182,4) ve c. Egzersizden 24 saat sonraki ( $F_{525}$  mean X: 173,6).

## Tartışma

Egzersiz sırasında enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır (1, 3). Enerji tüketiminin temel ilkesi oksidasyondur. Oksidasyon sırasında hidrojen peroksit gibi oksijen ve türevlerinin oldukça aktif şekilleri üretilmektedir. Radikaller membran peroksidasyonuna neden olmakta, membran geçirgenliğini bozmakta ve hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. Özellikle akut ve ağır egzersizin oksidatif hasarı tetiklediği ileri sürülmektedir (1, 2, 4). Bu nedenle, egzersiz sırasında yüksek oksijen alımının oksidatif strese neden olup olmadığı ve biyolojik sistemler (DNA, lipid, protein metabolizması) üzerinde risk oluşturup oluşturmadığına dair soruların cevaplanması için birçok araştırmalar yapılmıştır (1, 3, 13). Çünkü oksidatif stres sonucu oluşan

ROT çekirdek porlarından geçerek çekirdek içerisine yayılabilir ve DNA, protein gibi nükleer yapıları hasarlayabilirler. Oluşan DNA hasarı, olası mutasyonlardan sakınabilmek için hızlıca tamir edilmek zorundadır. Bunun için onarım proteinleri gereklidir (7). Proteozomal sistem (20S proteozomlardan oluşur.) oksitlenerek hasarlanmış proteinlerin indirgenmesinden sorumludur. Proteozomlar hem sitozolde hem de çekirdek içerisinde bulunmaktadır. Nükleer proteozomlar, oksidatif olarak hasarlanmış histon gibi DNA-protein kompleksinin, bağımsız olarak bulunan oksitlenmiş nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumludurlar ve proteozomlar onarım işlevlerini yaptıktan sonra hızlı bir şekilde çekirdekten uzaklaşırlar (6, 7).

Yoğun egzersizin DNA üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda, bazılarında egzersizle oksidatif DNA hasarının arttığı (1, 3, 14, 15), bazılarında azaldığı (17), bazılarında ise herhangi bir değişikliğin olmadığı (18-21) gösterilmiştir. Bu çelişkili sonuçların bireylerin antrenman düzeylerine, uygulanan egzersizin tipine ve süresine bağlı olabilmektedir (3, 20).

Çalışmamızda yoğun egzersizin DNA, protein gibi nükleer yapılarda oksidatif hasara yol açıp açmadığını bilemiyoruz. Ancak, çalışmamızda, egzersizden hemen sonra nükleer protein içeriğinin arttığı, egzersizden 24 saat sonra ise tekrar eski düzeyine geldiği bulundu. Egzersizden hemen sonra nükleer protein içeriğindeki artışın, çekirdek içerisine giren proteozomlara bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bize göre, egzersiz sırasında oksijene duyulan talep artmakta ve buna bağlı olarak çekirdek içerisinde oksidasyon yükselmekte ve oksidasyondan dolayı da çekirdek içerisinde oluşabilecek olası oksidatif hasarı önlemek için proteozom girişi artmaktadır. Fakat sunulan çalışma egzersiz ile çekirdek proteinleri arasındaki ilişkiyi gösteren literatürdeki ilk veriler olup, bundan sonra yapılacak araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

#### **Teşekkür**

Yazarlar, Akım sitometri cihazının kullanılmasına izin veren Prof. Dr. Türkan Patıroğlu'na ve çalışmanın yapılmasına destek sağlayan Prof. Dr. Bekir Çoksevimi'e teşekkürlerini sunar.

## Kaynaklar

1. Rodak Z, Pucsek J, Boros S, Jofjai L, Taylor AW. Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci* 2000; 66:1763–1767.
2. Nakatani K, Komatsu M, Kato T, et al. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radical Res* 2005; 39:905–911.
3. Orhan H, Van Holland B, Krab B, et al. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: Increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radical Res* 2004; 38: 1269–1279.
4. Rodak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27:69-74.
5. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004, 15:91-96
6. Ullrich O, Sitte N, Sommerburg O, Sandig V, Davies KJ, Grune T. Influence of DNA binding on the degradation of oxidized histones by the 20S proteasome. *Arch Biochem Biophys* 1999; 362:211–216.
7. Voss P, Grune T. The nuclear proteasome and the degradation of oxidatively damaged proteins. *Amino Acid*, 2007; 32:527-534.
8. Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, et al. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1465-1472.
9. Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. Extreme exercise and oxidative DNA modification. *J Sports Sci* 1996; 14: 343-361.
10. Noonan V, Dean E. *Submaximal Exercise Testing: Clinical Application and Interpretation, Physical Therapy*, 2000; 80: 782–807.
11. Robinson JP, Editor. *Handbook of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Liss Inc: New York; 1993 p.109.
12. Hamurcu Z, Demirtaş H, Patiroğlu T, Kumandas S. Nuclear protein contents in peripheral blood mononuclear cells of trisomy 21 infants. *Cytometry B Clin Cytometry* 2008; 74:128-132.
13. Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. Extreme exercise and oxidative DNA modification. *J Sports Sci* 1996; 14: 343-346.
14. Almar M, Villa JG, Cuevas MJ, Rodríguez-Marroyo JA, Avila C, Gonzalez-Gallego J. Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. *Free Radic Res* 2002.36: 247-253.
15. Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, et al. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31: 1465-1472.
16. Hamurcu Z, Sarıtaş N, Başkol G, Akpınar N. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. *Pediatr Exerc Sci* 2010; 22: 60-68.
17. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 2005, 19:276-285.
18. Hartmann A, Pfuhrer S, Dennog C, Germadnik D, Pilger A, Speit G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic Biol Med* 24: 254-251, 1998.
19. Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 1993 ; 84: 720-725.
20. Nakatani K, Komatsu M, Kato T, et al. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res* 2005; 39:905-911.