

MỨC ĐỘ PEROXY HÓA LIPID TRÊN MỘT SỐ NHÓM NGƯỜI CÓ MỨC ĐỘ VẬN ĐỘNG KHÁC NHAU

Lê Thị Mai^{1,3}, Hoàng Trung Đạt¹, Nguyễn Thị Thu Hà¹, Bùi Đình Đại¹,
Vũ Thị Đào^{1,4}, Phạm Mạnh Cường^{1,2}, Trịnh Hồng Thái¹, Đỗ Minh Hà^{1*}

TÓM TẮT:

Đặt vấn đề: Stress oxy hóa là một đặc điểm nổi bật của nhiều bệnh lý cấp và mãn tính, cũng như các bệnh gây ra do lão hóa ở người. Bên cạnh đó, quá trình hoạt động với cường độ cao kéo dài làm gia tăng tình trạng hypoxia, cũng là một điều kiện để xuất hiện stress oxy hóa. Trạng thái stress oxy hóa của cơ thể có thể được đánh giá thông qua việc định lượng các chỉ thị sinh học chính của quá trình peroxy hóa lipid, biến đổi DNA như: malonyldialdehyde (MDA), 4-hydroxynoneal (HNE), 8-OH-dG,... Trong đó MDA là một trong số các chỉ thị sinh học được nghiên cứu nhiều nhất và được xem như một chỉ số chính để đánh giá mức độ peroxy hóa lipid. **Mục tiêu:** Tiến hành định lượng MDA trong máu ở các nhóm đối tượng có mức độ vận động khác nhau: sinh viên điển kinh, quân nhân và nhân viên văn phòng để tìm hiểu mối liên quan giữa stress oxy hóa với mức độ vận động ở người. **Đối tượng và phương pháp:** Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định lượng MDA trên màng hồng cầu bằng phương pháp TBARS test, dựa trên phản ứng hóa học của phân tử MDA với 2 phân tử axit thiobarbituric (TBA) tạo ra dẫn xuất màu hấp thụ cực đại ở vùng ánh sáng khả kiến (530-535 nm). **Kết quả:** Kết quả định lượng MDA ở các nhóm đối tượng khác nhau lần lượt là: nhân viên văn phòng là $0,1037 \pm 0,0140$; sinh viên Đại học SPTDTT ngành điển kinh trước khi vận động là $0,0576 \pm 0,0096$; sau khi vận động mạnh $0,0831 \pm 0,0082$; quân nhân là $0,0758 \pm 0,007$ (khoảng tin cậy 95%). Hàm lượng MDA giữa các nhóm đối tượng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$); hàm lượng MDA của nhóm thường xuyên vận động là sinh viên điển kinh ($0,0576 \pm 0,0096$) và quân nhân ($0,0758 \pm 0,0071$) thấp hơn so với nhóm nhân viên văn phòng ($0,1037 \pm 0,0140$) ($p < 0,001$); hàm lượng MDA của nhóm sinh viên điển kinh sau khi vận động với cường độ mạnh ($0,0831 \pm 0,0108$) cao hơn so với nhóm sinh viên điển kinh trước khi vận động ($0,0576 \pm 0,0096$) ($p < 0,001$). **Kết luận:** Như vậy, kết quả trên cho thấy những người ít vận động chịu tác động mạnh mẽ bởi stress oxy hóa và peroxy hóa lipid hơn những người thường xuyên tập luyện; nhóm đối tượng có mức độ vận động với cường độ mạnh có tình trạng stress oxy hóa và peroxy hóa lipid cao hơn so với nhóm có mức độ vận động với cường độ vừa phải.

Từ khóa: stress oxy hóa, peroxy hóa lipid, ROS, MDA, mức vận động.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

ROS (reactive oxygen species) bao gồm các gốc tự do và một số phân tử đặc biệt khác mà trong cấu trúc chứa nguyên tử oxy có khả năng phản ứng mạnh.. Lượng

ROS trong cơ thể có thể tăng lên khi chịu tác động của các yếu tố gây stress nội sinh hay ngoại sinh [4].

“Stress oxy hóa” là trạng thái của tế bào mà ở đó lượng gốc tự do chứa oxy vượt xa khả năng trung hòa, hay các cơ chế bảo vệ của tế bào [6].

Trong các nghiên cứu hiện nay về stress oxy hóa thì các sản phẩm thứ cấp của quá trình peroxy hóa lipid đang rất được quan tâm nghiên cứu để đánh giá mức độ stress oxy hóa trong cơ thể. Trong đó, Malondialdehyde (MDA) là một trong những sản phẩm thứ cấp được nghiên cứu nhiều nhất.

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Bệnh viện Quân đội 103

³Trường Cao đẳng Y dược Thanh Hóa

⁴Trường Đại học Thể dục Thể thao Hà Nội

*Tác giả chịu trách nhiệm chính

Đỗ Minh Hà

Email: hadm@hus.edu.vn

Ngày nhận bài: 4/10/2016

Ngày nhận bài phản biện: 16/10/2016

Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2016

Để định lượng MDA thì phương pháp TBARS test (Kohn và Liversedge, 1944) được sử dụng rất phổ biến [4]. Phương pháp dựa trên phản ứng của TBA với MDA tạo thành dẫn xuất MDA-(TBA)₂ có màu hồng [2].

Quá trình vận động thể chất có thể làm tăng sự hình thành gốc tự do [1]. Khi lượng gốc tự do sinh ra vượt quá khả năng kiểm soát của hệ thống chống oxy hóa sẽ dẫn đến tình trạng stress oxy hóa [8], kết quả là làm tăng hàm lượng MDA trong máu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành định lượng MDA trong máu ở các nhóm đối tượng có mức độ vận động khác nhau: sinh viên điền kinh, quân nhân và nhân viên văn phòng để tìm hiểu mối liên quan giữa stress oxy hóa với mức độ vận động ở người.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGUYÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu phục vụ cho nghiên cứu này được lấy từ: 25 sinh viên trường Đại học Sư phạm Thể dục Thể thao Hà Nội; 31 quân nhân có trên 8h tập luyện/tuần được cung cấp bởi bệnh viện 103; 36 nhân viên văn phòng có dưới 2h/tuần hoạt động thể lực, mẫu được cung cấp bởi bệnh viện Bưu điện Hà Nội. Các mẫu có độ tuổi từ 18-35, khỏe mạnh, không mắc các bệnh hô hấp, tim mạch hay viêm nhiễm. Chúng tôi cung cấp đầy đủ thông tin về dự định nghiên cứu với các đối tượng và nhận được sự chấp thuận tham gia nghiên cứu như một hình thức tự nguyện.

Mẫu máu được vận chuyển bằng hộp giữ lạnh và bảo quản ở 4°C. Tiến hành định lượng MDA ngay trong 12h sau lấy mẫu.

2.2. Hóa chất

Các hóa chất chính phục vụ cho nghiên cứu này đều đạt chuẩn và được cung cấp bởi các hãng uy tín trên thế giới (Merk, Sigma...)

2.3. Phương pháp

+)*Tách chiết màng hồng cầu từ máu:* ly tâm tách lấy tế bào hồng cầu từ máu tổng số. Hồng cầu sau khi thu được sẽ được rửa bằng đệm PBS (Phosphate buffer Saline), sau đó được phá vỡ bằng dung dịch nhũ tương kết hợp với phương pháp sốc nhiệt và voltex mạnh. Bằng ly tâm tốc độ cao, màng tế bào hồng cầu được thu tách riêng để phục vụ nghiên cứu.

+)*Xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Bradford:* dựng đường chuẩn bằng Protein được thực hiện với dung dịch huyết thanh bò (BSA) và xác định hàm lượng protein tổng số trong dung dịch màng hồng cầu bằng cách đo độ hấp thụ tại bước sóng 595 nm bằng máy đo quang phổ.

+)*Xác định hàm lượng Malondialdehyde (MDA) bằng phương pháp TBA test [6]:* dựa trên cơ sở là phản ứng hóa học của phân tử MDA với phân tử TBA, tạo ra dẫn xuất màu hồng hấp thụ cực đại ở vùng ánh sáng khả kiến (530-535 nm). Từ giá trị độ hấp thụ tại bước sóng 535 nm sẽ xác định được lượng MDA tương ứng có trong dịch phản ứng, từ đó định lượng được lượng MDA trong 1mg protein tổng số (µg/mg).

+)*Phân tích thống kê:* sử dụng công cụ Excel 2013 và Minitab v16 để xử lý số liệu và phân tích thống kê, so sánh. Giá trị MDA trong nghiên cứu này được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± 1.96 .độ sai lệch chuẩn (mean $\pm 1,96SE$) - khoảng tin cậy 95% (CI 95%).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xác định hàm lượng MDA trên mẫu máu của các nhân viên văn phòng:

Hàm lượng MDA thu được với khoảng tin cậy 95% là $0,1037 \pm 0,0140$ µg/mg. Dựa vào quy trình [4] và kết quả từ nhiều nghiên cứu trước đó, chúng tôi khẳng định quy trình của mình xây dựng là đúng và có thể được sử dụng để đánh giá được hàm lượng MDA trong máu và mức độ peroxy hóa lipid trong cơ thể.

3.2. Hàm lượng MDA trên nhóm sinh viên điền kinh trước và sau khi vận động mạnh:

Hàm lượng MDA trên đối tượng là sinh viên thuộc bộ môn điền kinh, trường ĐHSP TDTT Hà Nội trước khi vận động (nhóm thường xuyên vận động và tập luyện) là $0,0576 \pm 0,0096 \mu\text{g}/\text{mg}$ (CI 95%). Cũng trên nhóm đối tượng này sau khi khởi động và chạy 10 km (nhóm sau vận động mạnh) được lấy máu và xét nghiệm. Kết quả hàm lượng MDA thu được là $0,0831 \pm 0,0082 \mu\text{g}/\text{mg}$ (CI 95%).

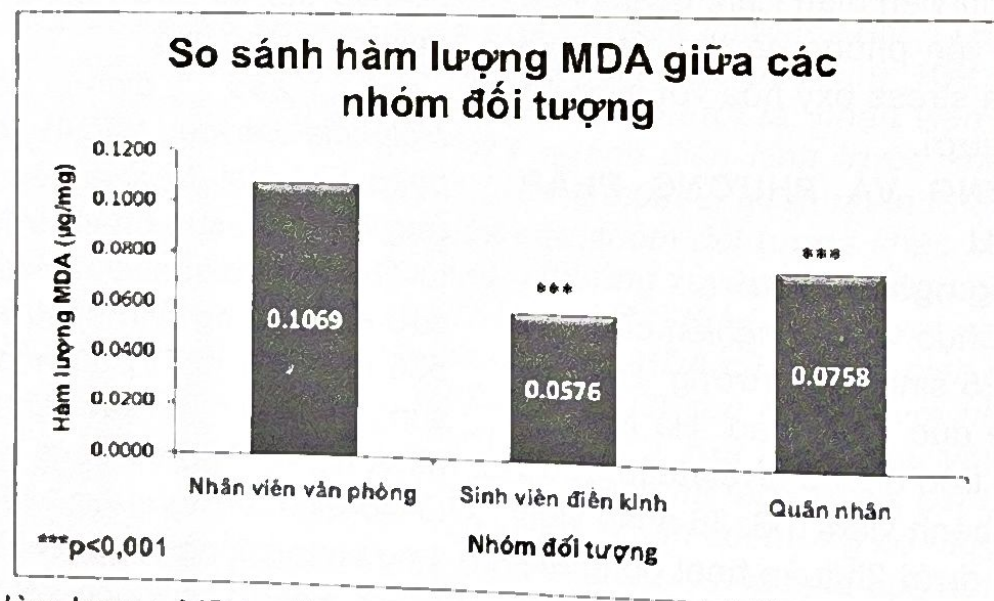
3.3. Hàm lượng MDA trên nhóm đối tượng là quân nhân:

Hàm lượng MDA trên 31 mẫu máu của nhóm đối tượng này là $0,0758 \pm 0,0071 \mu\text{g}/\text{mg}$ (CI 95%), tương tự với kết quả trong báo cáo của Sies từ năm 1991 [7].

3.4. So sánh hàm lượng MDA trên các nhóm đối tượng có mức độ vận động khác nhau:

- So sánh nhóm đối tượng là nhân viên văn phòng, sinh viên điền kinh và quân nhân:

Chúng tôi tiến hành kiểm chuẩn và so sánh hàm lượng MDA của nhóm đối tượng là nhân viên văn phòng, sinh viên điền kinh và quân nhân:

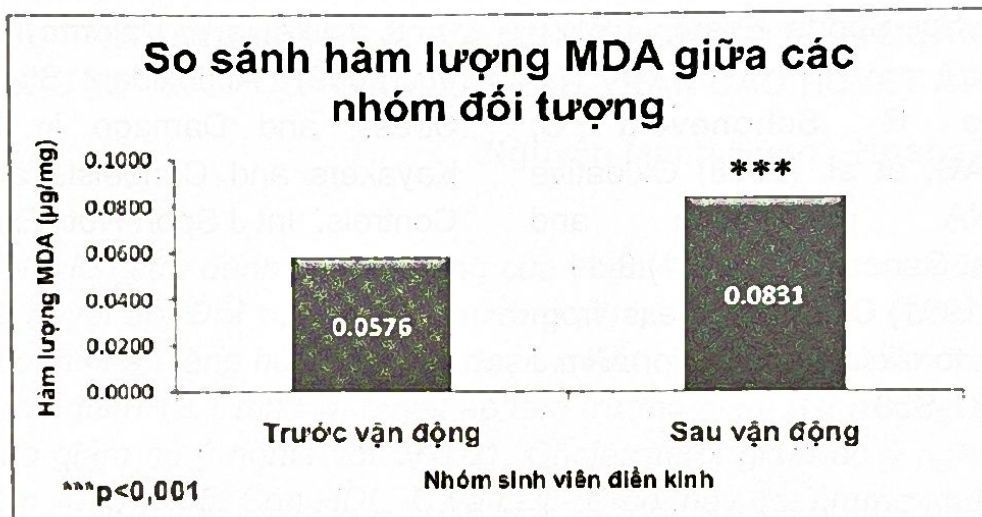


Biểu đồ 1. Hàm lượng MDA giữa các nhóm đối tượng có mức độ vận động khác nhau

Phép kiểm định cho thấy hàm lượng MDA giữa các nhóm đối tượng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,001$). Hàm lượng MDA của nhóm đối tượng thường xuyên vận động là sinh viên điền kinh và quân nhân thấp hơn so với nhóm đối tượng là nhân viên văn phòng ($p<0,001$) (biểu đồ 1). Từ kết quả này, chúng tôi thấy rằng, người có mức độ vận động thấp và không thường xuyên sẽ chịu tác động mạnh mẽ bởi stress oxy hóa và peroxy hóa lipid hơn những người thường xuyên vận động với cường độ mạnh.

- So sánh nhóm đối tượng là sinh viên điền kinh trước và sau khi vận động với cường độ mạnh:

Chúng tôi tiến hành so sánh hàm lượng MDA của nhóm đối tượng là sinh viên điền kinh trước và sau khi vận động với cường độ mạnh. Kết quả cho thấy hàm lượng MDA của nhóm đối tượng sau khi vận động với cường độ mạnh cao hơn so trước khi vận động ($p<0,001$) (biểu đồ 2). Điều này cho thấy, vận động với cường độ mạnh sẽ gây nên tình trạng stress oxy hóa cấp.



Biểu đồ 2: Hàm lượng MDA giữa nhóm sinh viên điền kinh trước và sau khi vận động

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Neubauer và cộng sự trên các nam vận động viên tham gia cuộc thi thể thao ba môn phối hợp cho thấy mức độ stress oxy hóa tăng cao và giảm dần xuống mức bình thường 5 ngày sau cuộc thi [5]. Như vậy, khi sự kích thích về sinh lý (sự hình thành ROS) vượt quá một ngưỡng nhất định thì cơ thể sẽ tăng cường hoạt động của một hệ thống chống oxy hóa nhằm chống lại sự kích thích đó. Nếu đạt được quá trình đáp ứng cảm ứng này, hoạt động sinh lý sẽ được cải thiện và từ đó giúp tình trạng sức khỏe được cải thiện [2].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy rằng, MDA là chất chỉ thị sinh học đáng tin cậy và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm để có thể đánh giá mức độ stress oxy hóa và trạng thái chống oxy hóa của cơ thể.

4. KẾT LUẬN:

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thu được những kết quả như sau:

- Đã chuẩn hóa được quy trình xác định hàm lượng MDA phù hợp trên đối tượng người Việt Nam.
- Đã đánh giá được sự khác nhau về mức độ stress oxy hóa và peroxy hóa lipid của một số nhóm đối tượng có mức độ vận động khác nhau thông qua test TBARS:

+ Đối tượng ít vận động (nhân viên văn phòng) chịu tác động bởi stress oxy hóa và peroxy hóa lipid nặng nề hơn những nhóm đối tượng thường xuyên luyện tập thể dục thể thao (quân nhân, sinh viên điền kinh).

+ Trên cùng nhóm đối tượng, khi vận động với cường độ mạnh, mức độ peroxy hóa lipid tăng cao hơn so với bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Almira HD, Valjevac A, Lepara O, et al. (2014) Oxidative stress status in elite athletes engaged in different sport disciplines. Bosn J Basic Med Sci 14(2): 56-62.
2. Antonio A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 31 pages.
3. Burdon R, van Knippenberg PH (1991) Techniques in Free Radical Research, Vol 22, ELSEVIER.
4. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, et al. (2011) Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 254: 86-99
5. Neubauer O, König D, Kern N, et al. (2008) No indications of persistent oxidative stress in response to an ironman

triathlon. Med Sci Sports Exerc, 40(12): 2119-2128.

6. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, et al. (2008) Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer Lett 266(1):6-11

7. Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med, 91(3): S31-S38

8. Teixeira V, Valente H, Casal S, et al. (2009) Antioxidant Status, Oxidative Stress, and Damage in Elite Trained Kayakers and Canoeists and Sedentary Controls. Int J Sport Nutr Exerc Metab 19: 443-456.

SUMMARY

EVALUATION OF LIPID PEROXIDATION IN SOME PERSONAL GROUPS WITH DIFFERENT LEVELS OF INTENSE ACTIVITY

Le Thi Mai^{1,3}, Hoang Trung Dat¹, Nguyen Thi Thu Ha¹, Bui Dinh Dai¹, Vu Thi Dao^{1,4}, Pham Manh Cuong^{1,2}, Trinh Hong Thai¹, Do Minh Ha^{1*}

¹Hanoi University of Science - VNU

²Military Hospital 103

³College of Medicine - Pharmacy Thanh Hoa

⁴Hanoi University of Physical education and Sports

Background: Oxidative stress (OS) is one of the signs and causes of many acute and chronic diseases. Besides, the process of intense activity lasting increases hypoxia condition, as well as a condition of OS appears. State of OS can be assessed through the quantification of biomarkers of lipid peroxidation process, modified DNA such as MDA, HNE, 8-OH-G... MDA is one of the most widely studied biomarkers of lipid peroxidation. In this study, we conducted quantitative analysis of MDA by TBA method, based on chemical reactions of MDA with TBA will create a derivative adduct with maximum absorption in the visible light region (530 -535 nm). By spectroscopy, we have quantified MDA - secondary products of lipid peroxidation process in human red blood cell membrane. **Objectives:** We have determined the amount of MDA in blood of subject groups which have different levels of intense activity: student athletics, soldier, office staff group to search the relation between oxidative stress and levels of intense activity. **Results:** We quantified and compared the content MDA (MDA unit is micrograms / mg of protein) in some groups of people (ages 20-35), which have different levels of intense activity: Office staff - 0.1037 ± 0.0140 ; Student in department of athletics (Hanoi University of Physical education and Sports) before heavy training - 0.0576 ± 0.0096 ; after training - 0.0831 ± 0.0082 ; Soldiers - 0.0758 ± 0.007 (95% CI). MDA levels between different groups had statistically significant ($p < 0.001$); MDA levels of regular physical activity groups - student athletics (0.0576 ± 0.0096) and soldier (0.0758 ± 0.0071) are lower than office staff group (0.1037 ± 0.0140) ($p < 0.001$); MDA levels of student athletics after intense training (0.0831 ± 0.0108) higher than the group of students before performing athletics (0.0576 ± 0.0096) ($p < 0.001$). **Conclusion:** Sedentary people are affected by oxidative stress and lipid peroxidation more than other, who have active exercise and groups of people with high intense activity will increase in oxidative stress and level of lipid peroxidation compared to the control groups with moderate intensity. **Keywords:** oxidative stress, lipid peroxydation, ROS, MDA, intense activity.