



## اثر تمرین هوازی و مکمل ویتامین D بر آپوپتوز بافت کبد موش‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه

حمیدرضا اعتمادی: دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تهران، ایران

سجاد ارشادی: استادیار فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

Arshadi.sajad@yahoo.com

عبدالعلی بنایی فر: دانشیار فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تهران، ایران

محمد علی آذربایجانی: استاد فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

آپوپتوز،

کاسپاز-۸،

کبد،

تمرین هوازی،

ویتامین D

**زمینه و هدف:** به نظر می‌رسد متابولیت‌های فعال ویتامین D و فعالیت ورزشی نقش مهمی در کاهش آسیب‌های اکسایشی ایفا می‌کنند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی و مکمل ویتامین D بر آپوپتوز بافت کبد موش‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه ( $H_2O_2$ ) بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ سرموش نر نژاد ویستار با میانگین وزن  $220 \pm 20$  گرم به طور تصادفی به ۱۰ گروه تقسیم شدند. حیوانات به مدت ۸ هفته تحت مداخلات القا استرس اکسیداتیو (تزریق درون صفاقی  $H_2O_2$  به صورت ۳ بار در هفته)، مصرف ویتامین D (به صورت تزریق روزانه درون صفاقی) و ورزش بر روی تردمیل (۳۰ الی ۶۰ دقیقه، با سرعت ۸ الی ۲۰ متر/دقیقه) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌ها قربانی شده و بافت کبد استخراج گردید. میزان پروتئین کاسپاز-۸ با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. جهت مقایسه بین گروهی از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میزان پروتئین کاسپاز-۸ در گروه‌های H، 2H، HD و 2HD در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود ( $p < 0.05$ ). همچنین، گروه‌های HE و HDE در مقایسه با گروه H و گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان کمتری از پروتئین کاسپاز-۸ را در بافت کبد نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که قرار دادن موش‌ها در معرض آب اکسیژنه موجب القای آپوپتوز در بافت کبد می‌شود. ورزش منظم توانست تا حدود زیادی این اثر را تعدیل نماید اما مصرف مکمل ویتامین D3 چنین اثری به دنبال نداشت.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** حامی مالی نداشته است.

### شیوه استناد به این مقاله:

Etemadi HR, Arshadi S, Banaeifar A, Azarbayjani M. The effect of aerobic exercise and vitamin D supplementation on hepatic Apoptosis levels in rats exposed to oxygenated water. Razi J Med Sci. 2021;28(2):23-32.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

## The effect of aerobic exercise and vitamin D supplementation on hepatic Apoptosis levels in rats exposed to oxygenated water

**Hamid Reza Etemadi:** PhD Student Department of Exercise physiology, Faculty of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran

**Sajad Arshadi:** Assistant Professor, Department of Exercise physiology, Faculty of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran (\* Corresponding author) Arshadi.sajad@yahoo.com

**Abdolali Banaeifar:** Associate Professor, Department of Exercise physiology, Faculty of Human Sciences, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran

**Mohammadali Azarbayjani:** Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and Aims:** Most chronic diseases are associated with an imbalance between the formation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes, which leads to deviation from the steady state. This process is called oxidative stress. One of the complications of oxidative stress is liver dysfunction. In this case, programmed cell death (apoptosis) appears to increase in liver cells and damage the tissue. Increased production of ROS without adequate antioxidant defense leads to oxidative stress and cell death and apoptosis, which is associated with various diseases and abnormalities. However, some studies have shown that exercise is associated with reduction in apoptosis. In this regard, Fernandez et al. (2012) showed that 10 weeks of regular swimming training in male rats increased anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-x) and decreased apoptotic proteins (BAD). also, Chen et al showed that 11 weeks of treadmill running increased Bcl-2 in rats with doxorubicin-induced chronic kidney disease, while caspase-8 levels decreased. On the other hand, studies have shown the benefits of vitamin D on liver health. Recent studies have reported an association between vitamin D3 deficiency and the incidence of liver disease. According to the research's mentioned and in response to the ambiguities caused by the apoptotic or protective effects of exercise in various physiological situations, including exposure to oxidative stress, which has an undeniable effect on the body and vital organs, including the liver. Therefore, the present study intends to investigate the question of whether regular aerobic exercise and vitamin D supplementation effect on hepatic Apoptosis levels in rats exposed to oxygenated water?

**Methods:** This is an experimental study. This research was conducted in 2019 on Wistar rats in Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 60 male Wistar rats weighed  $220 \pm 20$  g was randomly divided into ten groups. Then, The animals were exposed to oxidative stress (intraperitoneal injection of  $H_2O_2$  3 times a week), vitamin D3 (intraperitoneal injection daily) and exercise on treadmill for 8 weeks (30 to 60 min, at speeds of 8 to 20 m/min) after the last training session liver tissue was extracted and Caspase-8 protein concentration measured by ELISA method.

**Results:** The results showed that Caspase-8 protein levels were higher in the H, 2H,

### Keywords

Apoptosis,  
Caspase-8,  
Liver,  
Vitamin D,  
Aerobic exercise

Received: 02/01/2021

Published: 26/04/2021

HD and 2HD groups compared to the control group ( $p < 0.01$ ). Also, HE and HDE groups as well as 2HE and 2HDE groups showed lower levels of Caspase-8 protein in liver tissue compared to H and 2H groups, respectively ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Vitamin D can enhance the production of anti-inflammatory mediators and appears to regulate immune function. Zheng et al. (2017) reported that vitamin D receptor deficiency in human breast and prostate cancers significantly induces cell apoptosis by regulating the Wnt /  $\beta$ -catenin signaling pathway. The reasons for this discrepancy in the results can be traced to the dose of vitamin D consumed, which was higher in the studies than in the present study.

The findings of this study were consistent with the results of Fernandes et al. (2012) and Chen et al. Increased potential activity of antioxidant enzymes (not measured in the present study) may be practiced as one of the mechanisms for controlling apoptosis in animals. It is recommended that regular aerobic exercise be considered to reduce hepatic apoptosis. In the present study, there were limitations in the present study, including the study of animal specimens. Other limitations of this study include lack of measurement of other apoptosis-related factors.

the results showed that exposure of rats to  $H_2O_2$  induces apoptosis in liver tissue. regular treadmill exercise was able to attenuate this effect to a large extent, but vitamin D3 supplementation did not.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

**Cite this article as:**

Etemadi HR, Arshadi S, Banaeifar A, Azarbayjani M. The effect of aerobic exercise and vitamin D supplementation on hepatic Apoptosis levels in rats exposed to oxygenated water. Razi J Med Sci. 2021;28(2):23-32.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

اکثر بیماری‌های مزمن با عدم تعادل بین تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (*Reactive Oxygen Species* - ROS) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه هستند که منجر به انحراف از حالت پایدار می‌شوند. این روند استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود (۱). ROS به طور طبیعی در بدن تولید می‌شود و نمی‌توان از تشکیل ROS درون‌زاد و برون‌زاد اجتناب کرد. ROS در خلال استخراج انرژی از ترکیب مواد غذایی و اکسیژن و یا قرارگیری در معرض عفونت‌های میکروبی، فعالیت بدنی شدید، آلاینده‌ها و سموم مانند دود سیگار، الکل، اشعه UV، آفت‌کش‌ها و آزن تولید می‌شوند (۲). تحت شرایط فیزیولوژیکی، تعادل بین پیش‌سازهای اکسیدانی و ذرات آنتی‌اکسیدانی اندکی به نفع تولید پیش‌سازهای اکسیدانی حفظ می‌شود. در نتیجه از استرس اکسیداتیو خفیف حمایت می‌شود (۳). آب اکسیژنه ( $H_2O_2$ ) یک اکسیدان ملایم و نسبتاً پایدار است که به طور گسترده-ای به عنوان نشانگر ROS برای ارزیابی پاسخ سلول‌ها به استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود (۴). قرارگیری در معرض سطوح پایین  $H_2O_2$  (آب اکسیژنه) حفاظت در برابر مواجهه‌ی بعدی با سطوح بالاتر  $H_2O_2$  را افزایش می‌دهد (۵). نشان داده شده است که القای سطوح پایین  $H_2O_2$  باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو در موش‌ها می‌شود (۶). میزان استرس اکسیداتیو تجربه شده توسط سلول، تابعی از فعالیت واکنش‌های تولیدکننده ROS و فعالیت سیستم مهار ROS خواهد بود (۳).

یکی از عوارض ناشی از شرایط استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد بافت کبد است. به نظر می‌رسد در این حالت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) در سلول‌های کبدی افزایش یافته و بافت را دچار آسیب می‌کند (۷). آپوپتوز یک فرایند طبیعی در سلول‌ها می‌باشد که در هموستاز بافتی و حذف سلول‌های مضر، آسیب‌دیده یا پیر نقش حیاتی دارد. هرگونه اختلال در این مسیر موجب بیماری خواهد شد. کاهش فعالیت آپوپتوز ممکن است سبب رشد سلول‌های غیرعادی مانند سلول‌های سرطانی شود و افزایش غیرطبیعی فعالیت آن سبب از بین رفتن سلول‌های سالم و طبیعی خواهد شد (۸). آپوپتوز از دو مسیر بیرونی و درونی رخ

می‌دهد. مسیر خارجی با تحریک گیرنده‌های مرگ که در غشای خارجی اغلب سلول‌ها وجود دارند، آغاز می‌شود و منجر به فعالسازی کاسپازها و القای مرگ سلولی می‌گردد. مسیر داخلی که با عنوان مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می‌شود، از طریق سیگنال‌هایی مانند رادیکال‌های آزاد در درون سلول آغاز می‌شود و به واسطه پروتئین‌های خانواده Bcl-2 موجود در غشای خارجی میتوکندری، با آسیب به غشای میتوکندری و رهایی سیتوکروم C موجب فعال شدن کاسپازها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۹).

فعالیت ورزشی پیامدهای سودمندی به دنبال دارد که از آن جمله می‌توان به اثر آن بر کبد و متقابلاً نقش جدایی‌ناپذیر کبد در فیزیولوژی ورزش اشاره کرد. کبد سوبستراهای انرژی را از طریق چرخه کوری و کاتابولیسم گلیکوژن برای بافت‌های محیطی فراهم می‌سازد و علاوه بر آن، مولکول‌های فعال بیولوژیکی مانند فاکتورهای رشدی را به درون گردش خون رها می‌کند (۱۰). اما شواهد نشان می‌دهند تمرین‌های استقامتی با ایجاد استرس اکسایشی و میتوکندریایی باعث ایجاد آسیب کبدی می‌شوند (۱۱) و عوامل آغازکننده آپوپتوز را رها می‌سازند (۱۲). در خلال فعالیت‌های ورزشی جریان خون به سمت اندام‌های داخلی مانند روده و کبد محدود می‌شود و بعد از اتمام فعالیت به سطوح استراحتی باز می‌گردد. این وضعیت شبیه ایسکمی-توزیع مجدد عمل کرده و ممکن است به افزایش تشکیل ROS منجر شود (۱۳). تولید فزاینده ROS بدون دفاع آنتی‌اکسیدانی کافی به استرس اکسایشی و مرگ سلولی و آپوپتوز منجر می‌شود که متضمن ایجاد انواع بیماری‌ها و ناهنجاری‌های مختلف است (۱۴). با این حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی با کاهش میزان آپوپتوز همراه است. در همین راستا، فرناندز و همکاران نشان دادند که ۱۰ هفته تمرین منظم شنا در موش‌های نر باعث افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوز (*Bcl-2* و *Bcl-x*) و کاهش پروتئین‌های آپوپتوز (*BAD*) می‌شود (۱۵). چن و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند که ۱۱ هفته دویدن روی نوارگردان در موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری مزمن کلیوی تحت القای دوکسوروبیسین باعث افزایش *Bcl-2* شد، در حالی که سطوح کاسپاز-۸

کاهش یافت (۱۶).

از طرف دیگر، مطالعات سودمندی ویتامین D بر سلامت کبد را نشان داده‌اند. مطالعات اخیر، ارتباط بین کمبود ویتامین D<sub>3</sub> و میزان وقوع بیماری های کبدی را گزارش نموده‌اند (۱۷ و ۱۸). ویتامین D به طور عمده در پوست از طریق تبدیل فتوشیمیایی ۷-دهیدروکلسترول به ویتامین D<sub>3</sub> (کوله کلسیفرول) تولید می شود و با هیدروکسیلاسیون متوالی در کبد و کلیه‌ها به فرم فعال خود یعنی D<sub>3</sub> dihydroxyvitamin-1,25 یا کلسیتریول تبدیل می‌گردد و سرانجام با اتصال به گیرنده‌های خود اثرات فیزیولوژیک گسترده‌ای را در سلول‌ها اعمال می کند. ویتامین D به عنوان یک تعدیل کننده سیستم ایمنی عمل می‌کند؛ جلوگیری از بیان بیش از حد سایتوکاین‌های التهابی و افزایش پتانسیل پراکندگی اکسیداتیو ماکروفاژها از عملکردهای ویتامین D است. تحقیقات نشان داده‌اند که موش‌های فاقد گیرنده ویتامین D و یا آنزیم سنتزکننده این ویتامین، دچار اختلالات ساختاری و عملکردی هستند و درمان با ویتامین D و آنالوگ‌های آن از اختلالات مذکور پیشگیری می کند (۱۹). اما نقش دقیق این ویتامین در کاهش آسیب‌های کبدی و به ویژه سازوکارهای مولکولی مسئول، همچنان باناشناخته‌های فراوانی روبرو است. بنابراین، با توجه به مبانی پژوهشی که ذکر شد و در پاسخ به ابهامات ناشی از اثرات آپوپتوزی یا حفاظتی فعالیت‌های ورزشی در موقعیت‌های فیزیولوژیک مختلف از جمله قرار گرفتن در معرض استرس اکسایشی که تأثیر انکارناپذیری بر بدن و اندام‌های حیاتی از جمله کبد دارد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین هوازی منظم و مکمل‌گیری ویتامین D بر میزان پروتئین کاسپاز-۸ در بافت کبد موش های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه انجام می شود.

## روش کار

در یک مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ سر موش نر بالغ از نژاد ویستار با وزن  $220 \pm 20$  گرم و ۱۰-۸ هفته‌ای از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز خریداری و به مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال یافت و برای مطالعه حاضر استفاده شد. موش‌ها به طور تصادفی در قفس‌های ساخته شده از پلی پروپیلن، با

اندازه  $42 \times 30 \times 16$  سانتی متر مکعب نگهداری شدند، بدین صورت که در هر قفس ۵ موش نگهداری می‌شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد و کنترل دمایی ( $2 \pm$  ۲۲ سانتی گراد) و چرخه متناوب روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح و تاریکی از ساعت ۷ شب) نگهداری شدند. موش‌ها به طور آزادانه به آب و غذای ویژه موش‌ها (شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) دسترسی داشتند. همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان با شماره IR.KMU.REC.1396.1562 انجام شد.

موش‌ها به مدت دو هفته قبل از شروع پروتکل با محیط و نوارگردان سازگار شدند. سپس، به طور تصادفی به ده گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه‌بندی شامل: گروه شاهد (C)، آب اکسیژنه (H)، آب اکسیژنه دو برابر (2H)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D (HD)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> (2HD)D<sub>3</sub>، آب اکسیژنه + تمرین ورزشی (HE)، آب اکسیژنه دو برابر + تمرین ورزشی (2HE)، آب اکسیژنه + مکمل‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> + تمرین ورزشی (HDE)، آب اکسیژنه دو برابر + مکمل‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> + تمرین ورزشی (2HDE) و دی متیل سولفوآکساید+سالین (DMSO) بود. پس از آن، حیوانات به مدت ۸ هفته تحت مداخلات القا استرس اکسیداتیو، مصرف ویتامین D<sub>3</sub> و ورزش نوارگردان قرار گرفتند. حیوانات گروه‌های H، HE، HD و HDE تزریق درون صفاقی آب اکسیژنه را با دوز ۱ میلی‌مول به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن‌شان (۲۰) و موش‌ها گروه‌های 2H، 2HE، 2HD و 2HDE تزریق درون صفاقی آب اکسیژنه را با دوز ۲ میلی‌مول به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (۲۱) به صورت ۳ بار در هفته در روزهای زوج دریافت کردند (۵). تزریق درون صفاقی ویتامین D<sub>3</sub> در گروه‌های HD، 2HD، HDE و 2HDE به این صورت بود که موش‌ها ۰/۵ میکروگرم ویتامین D<sub>3</sub> (آمپول ویتامین D<sub>3</sub>) با نام تجاری DITHRECOL شرکت کاسپین ویتامین؛ تهران، ایران) را به صورت تزریق روزانه درون صفاقی طی ۸ هفته دریافت کردند (۲۲). جهت رسیدن به دوز مناسب تزریقی از نورمال سالین برای رقیق کردن و از دی متیل سولفوآکساید (DMSO) جهت حل

غلظت کاسپاز-۸ در مایع رویی با استفاده از کیت الایزای ساخت شرکت Bioassay Technology Laboratory با شماره کاتالوگ E137oRa طبق دستورالعمل کارخانه اندازه‌گیری شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لوین مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت مقایسه متغیرها بین گروه‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی داری برابر با  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

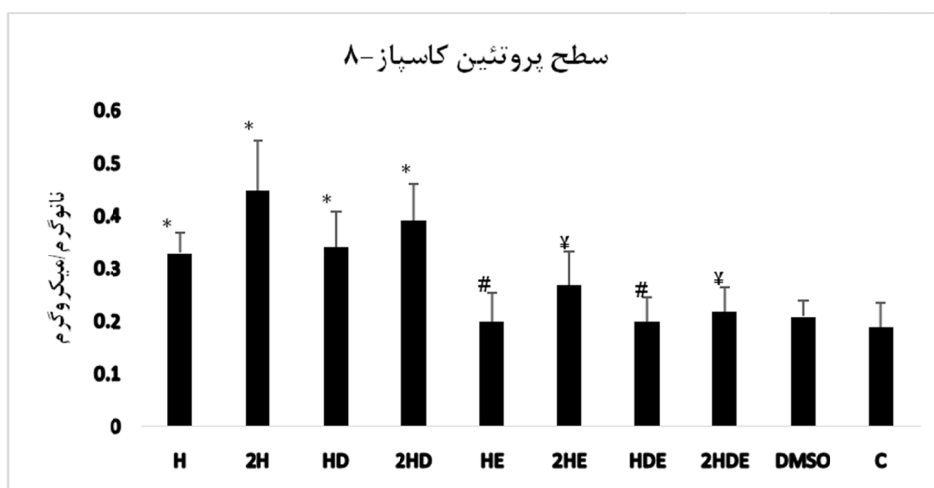
### یافته‌ها

در مطالعه حاضر، موش‌های ۸-۱۰ هفته‌ای با میانگین وزن  $20 \pm 220$  گرم تهیه و به طور تصادفی به گروه‌های ۱۰ گانه تقسیم‌بندی شدند. وزن حیوانات در پس‌آزمون در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در پس‌آزمون نشان داد که بین گروه‌های پژوهش در وزن موش‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $p < 0/001$ ). نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که بین میزان کاسپاز-۸ در بافت کبد گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0/001$ ). برای تعیین منبع تفاوت‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. میزان بالای پروتئین کاسپاز-۸ در گروه‌های H، 2H، HD، 2HD در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $p < 0/001$ ). همچنین، گروه‌های

کردن ویتامین D<sub>3</sub> در سالین استفاده شد. با توجه به لزوم بررسی تاثیر حلال مذکور یک گروه بنام DMSO تعریف شد که روزانه فقط حلال دریافت کردند. موش‌ها گروه‌های HE، 2HE، HDE و 2HDE به طور روزانه فعالیت تمرینی منظم بر روی نوارگردان را به مدت ۸ هفته انجام دادند. موش‌ها در هفته اول با سرعت ۸ متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی دویدند، در هفته دوم با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه با شیب و زمان مشابه، در هفته سوم با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه و در چهارمین هفته با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه تمرین کردند. طی هفته‌های پنجم تا هشتم موش‌ها در سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب ۱۰ درجه به مدت ۶۰ دقیقه در هر روز تمرین داده شدند (۲۳). ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه پروتکل تمرین، جهت اجتناب از سهم زیاد تولید ROS درونزا (۲۴) و بعد از ۱۲ ساعت گرسنگی، موش‌ها با استنشاق کلروفورم بیهوش شدند. بافت کبد به دقت جدا و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور و منجمد شد و برای آزمایش‌های بعدی در دمای -۷۵ سانتی‌گراد نگهداری شد. بافت کبد به وسیله اضافه کردن بافر حاوی NaCl، ۵۰ میلی‌مول Tris-HCl و ۱۲ میکرومول leupeptin با استفاده از هموژنایزر برقی تنظیم شده بر روی ۸۰۰ دور در دقیقه هموژنایز شد. سپس، نمونه‌های هموژنایزه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رویی برای سنجش زیر واحد کاسپاز-۸ استفاده شد. میزان

جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد وزن بدن (گرم) حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	پیش‌آزمون	پس‌آزمون
H		$220 \pm 23$
2H		$210 \pm 19$
HD		$231 \pm 16$
2HD		$238 \pm 28$
HE		$229 \pm 21$
2HE	$220 \pm 20$	$222 \pm 24$
HDE		$219 \pm 30$
2HDE		$226 \pm 23$
DMSO		$226 \pm 20$
C		$228 \pm 20$



\* ( $p < 0.05$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل؛ # ( $p < 0.05$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه H؛ ¥ ( $p < 0.05$ ) اختلاف آماری معنی‌دار با گروه 2H

نمودار ۱- میزان پروتئین کاسپاز-۸ اندازه‌گیری شده در بافت کبد.

کمک نماید. در مطالعه حاضر از ویتامین D برای کنترل میزان آپوپتوز استفاده شد که به صورت تزریق روزانه درون صفاقی صورت می‌پذیرفت. سودمندی ویتامین D بر سلامت کبد توسط مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. اخیراً، ارتباط بین کمبود ویتامین D3 و میزان وقوع بیماری‌های کبدی گزارش شده است (۱۷ و ۱۸). ویتامین D می‌تواند تولید واسطه‌های ضدالتهابی را ارتقا بخشد و به نظر می‌رسد که در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی نقش دارد (۲۵). با این حال، در مطالعه حاضر تزریق روزانه درون صفاقی ویتامین D به موش‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه با دوزهای مختلف، تأثیری بر میزان پروتئین کاسپاز-۸ و آپوپتوز کبدی نداشت. این یافته با نتایج برخی از مطالعات ناهمخوان است. برای مثال، کمبود ویتامین D و کاهش میزان گیرنده آن در بیماران مبتلا به HCV (ویروس هپاتیت C) و سرطان کبدی مشاهده شد. آنان بیان داشتند که اختلال در محور ویتامین D - گیرنده ویتامین D، که هم اتوفاژی و هم آپوپتوز را تعدیل می‌کند، ممکن است دلیل این مشاهده باشد (۲۶). به علاوه، ژنگ و همکاران گزارش کردند که فقدان گیرنده ویتامین D در سرطان‌های پستان و پروستات انسان به طور چشمگیری آپوپتوز سلولی را از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ Wnt /  $\beta$ -catenin موجب می‌شود (۲۷). دلایل این اختلاف در نتایج را می‌توان در دوز مصرفی

HE و HDE در مقایسه با گروه H و گروه‌های 2HE و 2HDE در مقایسه با گروه 2H میزان کمتری از پروتئین کاسپاز-۸ را در بافت کبد نشان دادند ( $p < 0.001$ ) (نمودار ۱).

### بحث

در مطالعه حاضر، تاثیر القای استرس اکسیداتیو برونزاد، تمرین هوازی منظم و مصرف ویتامین D بر سطح پروتئین کاسپاز-۸ کبدی در موش‌های نرنژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس یافته‌های این پژوهش، قرار گرفتن موش‌ها در معرض آب اکسیژنه با دوزهای ۱ و ۲ میلی‌مول/کیلوگرم موجب تنظیم مثبت آپوپتوز کبدی می‌شود، به طوری که میزان بالای پروتئین کاسپاز-۸ در گروه‌های H و 2H در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، قرار دادن موش‌ها در معرض آب اکسیژنه با دوز بالاتر (۲ میلی‌مول/کیلوگرم در برابر ۱ میلی‌مول/کیلوگرم) این اثر را مضاعف نمود؛ به طوری که در گروه 2H میزان پروتئین کاسپاز-۸ به طور معنی‌داری بیشتر از گروه H بود. عدم وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های C و DMSO در میزان پروتئین کاسپاز-۸ حاکی از این امر بود که تغییرات مشاهده شده در این متغیر و القای آپوپتوز ناشی از قرار گرفتن موش‌ها در معرض آب اکسیژنه بوده و روش القای آن (تزریقات متعدد) بی‌اثر است. این مشاهده می‌تواند به تعمیم یافته‌های حاصل

در تمرینات ورزشی هوازی، آبشاری از مولکول‌ها و عوامل آنتی‌آپوپتوزی و آنتی‌اکسیدانی به راه می‌اندازد تا با تمرین هوازی در جهت کنترل القای آپوپتوزیس در بافت‌ها به ویژه کبد سازگاری ایجاد کند.

یکی دیگر از یافته‌های مطالعه حاضر این بود که تمرین هوازی منظم در ترکیب با مکمل ویتامین D توانست آپوپتوز کبدی موش‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه را تعدیل نماید. با این حال، با توجه به نتایج دیگر این پژوهش (عدم تأثیر مکمل‌گیری ویتامین D و تأثیر چشمگیر تمرین هوازی دویدن روی نوارگردان بر شاخص آپوپتوز کبدی) می‌توان اینگونه بیان داشت که تنظیم منفی آپوپتوز کبدی در رت‌های گروه‌های HDE و 2HDE ناشی از تمرین ورزشی بوده و مکمل‌گیری ویتامین D تأثیر چندانی بر آن نداشته است. تمرین هوازی از نقاط قوت تحقیق حاضر بود؛ چراکه این نوع تمرین، پاسخ‌ها و سازگاری‌های متفاوتی نسبت به برنامه‌های تمرینی دیگر می‌تواند به همراه داشته باشد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قرار دادن موش‌ها در معرض آب اکسیژنه موجب القای آپوپتوز در بافت کبد می‌شود. با این حال، ورزش منظم تردمیل توانست تا حدود زیادی این اثر را تعدیل نماید اما مصرف مکمل ویتامین D چنین اثری به دنبال نداشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود انجام تمرینات هوازی منظم به منظور کاهش آپوپتوز کبدی مورد توجه قرار گیرد.

محدودیت‌هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به مطالعه بر روی نمونه‌های حیوانی اشاره کرد. از دیگر محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری دیگر فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز اشاره کرد. اندازه‌گیری فاکتورهای پیش‌آپوپتوزی (Bid و Bax) و ضد آپوپتوزی (Bcl-XL) نیز می‌تواند در تبیین و تفسیر بهتر نتایج به ویژه در بافت کبد کمک نماید. این نقطه ضعف پژوهشی پیشنهادی به مطالعات آینده به منظور اندازه‌گیری این فاکتورها در بافت کبد است.

ویتامین D جستجو کرد که در مطالعات مذکور بیشتر از مطالعه حاضر بود. ضمن اینکه باید در نظر داشت، مطالعات مذکور از روش آزمایشگاهی (in vitro) و کشت سلولی استفاده کرده‌اند، در حالی که روش مداخله ما داخل بدن موجود زنده (in vivo) بود. علاوه بر این، روش مصرف ویتامین D که در مطالعه حاضر به صورت تزریق درون صفاقی صورت پذیرفت، می‌تواند به عنوان یکی از دلایل توجیه‌کننده این اختلاف در نظر گرفته شود.

در مطالعه حاضر، ۸ هفته تمرین هوازی منظم توانست آپوپتوز کبدی موش‌های قرار گرفته در معرض آب اکسیژنه را تعدیل نماید، به طوری که، کاهش سطح پروتئین کاسپاز-۸ در حیوانات گروه‌های ورزشی در مقایسه با گروه‌های H و 2H مشاهده شد. این مشاهده با نتایج فرناندز و همکاران و چن و همکاران همسو است (۱۶ و ۱۵). فرناندز و همکاران نشان دادند که ۱۰ هفته تمرین منظم شنا در موش‌های نر باعث افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوز (Bcl-2 و Bcl-x) و کاهش پروتئین‌های آپوپتوز (BAD) می‌شود که در نهایت با فسفریلاسیون BAD و کاهش نسبت BAD به Bcl-2 همراه است (۱۵). در همین راستا، چن و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که ۱۱ هفته دویدن روی نوارگردان در موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری مزمن کلیوی تحت القای دوکسوروبیسین باعث افزایش Bcl-2 و سیتوکروم C میتوکندریایی شد، در حالی که سطوح Bax، سوپراکسید دسموتاز، مالون دی‌آلدهید و کاسپازهای ۹، ۳، ۱۲ و ۸ کاهش یافت (۱۶). به خوبی نشان داده شده است که تمرین ورزشی منظم وضعیت آنتی‌اکسیدانی را در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد بهبود می‌بخشد (۲۸). آنزیم‌های ضد اکسایشی از جمله سوپراکسید دسموتازها و خانواده وابسته به گلوتاتیون‌ها در مقابله با استرس اکسایشی نقش مهمی داشته و در تنظیم آپوپتوزیس دخیل هستند (۲۹). از آنجایی که برای ایجاد سازگاری در اثر تمرین استقامتی، عوامل مختلفی باید به صورت موضعی و سیستمی با هم فعالیت کنند، افزایش فعالیت احتمالی آنزیم‌های ضد اکسایشی (در مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشده است)، می‌تواند به عنوان یکی از سازوکارهای کنترل آپوپتوز در حیوانات تمرین کرده باشد (۳۰). احتمالاً شرکت منظم



## References

- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016; 90:1-37.
- Görlach A, Dimova EY, Petry A, Martínez-Ruiz A, Hernansanz-Agustín P, Rolo AP, et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: problems solved? *Redox Biol* 2015; 6:372-85.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 2013.
- Granger DN, Kvietyš PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015; 6:524-51.
- Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucso J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch BiochemBiophys*. 2000; 376:248-51.
- Puri N, Zhang F, Monu SR, Sodhi K, Bellner L, Lamon BD, et al. Antioxidants condition pleiotropic vascular responses to exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of modulation of vascular TP receptors and the heme oxygenase system. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(5): 471-480.
- Schattenberg JM, Schuchmann M. Diabetes and apoptosis: liver. *Apoptosis* 2009; 14(12): 1459-71.
- Karimi M N, Abbasalipourkabar R, Arab Sadeghabadi Z, Ziamajidi N. The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic. *JSSU*. 2017; 25 (7) :547-555
- Afzalpour ME, Taheri Chadorneshin H. Physical activity and oxidative pressure. Tehran, Iran: BamdadKetab; 2014; 23-95.
- Aoi W, Ichiishi E, Sakamoto N, Tsujimoto A, Tokuda H, Yoshikawa T. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. *Life Sciences*. 2004; 75(29): 3117-28.
- Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sciences*. 2010; 86(1-2): 39-44.
- Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmunity Reviews*. 2003; 2(1): 36-42.
- Mikami T, Sumida S, Ishibashi Y, Ohta S. Endurance exercise training inhibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of mice [correction of rats] exposed to stress by induction of heat shock protein 70. *Journal of Applied Physiology*. 2004; 96(5): 1776-81.
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 128(2): 336-74.
- Fernandes T, Magalhaes FC, Everton CC. aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertensive rats. *Exercise and Sports Sciences* 2012; 18(6): 412-418.
- Chen KC, Peng CC, Hsieh CI, Robert Y, Peng C. Exercise Ameliorates Renal Cell Apoptosis in Chronic Kidney Disease by Intervening in the Intrinsic and the Extrinsic Apoptotic Pathways in a Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 368450.
- Norman P E, Powell J T. Vitamin d and cardiovascular disease. *Circ Res* 2014; 114: 379-93.
- Reddy Vanga S, Good M, Howard P A, Vacek JL. Role of vitamin d in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2010; 106:798-805.
- Przybylski R, McCune S, Hollis B, Simpson RU. Vitamin d deficiency in the spontaneously hypertensive lung failure [shhf] prone rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20:641-6.
- Li SF, Liu HX, Zhang YB, Yan YC, Li YP. The protective effects of alpha-ketoacids against oxidative stress on rat spermatozoa in vitro. *Asian J Androl* 2010; 12:247-56.
- Halder SK, Sharan C, Al-Hendy A. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> treatment shrinks uterine leiomyoma tumors in the Eker rat model. *Biol Reprod* 2012; 86:116.
- Makino A, Skelton MM, Zou AP, Cowley AW. Increased renal medullary H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to hypertension. *Hypertension* 2003; 42:25-30.
- Husain K, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *BiochimBiophys Acta* 2002; 1587:75-82.
- Plant DR, Gregorevic P, Warmington SA, Williams DA, Lynch GS. Endurance training adaptations modulate the redox-force relationship of rat isolated slow-twitch skeletal muscles. *Clin Exp PharmacolPhysiol* 2003; 30:77-81.
- Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol*. 2008; 4:404-412.
- Abdel-Mohsen MA, Ahlam Abd-Allah EB, Abeer G, El-Rahim A, Shamsya MM. Autophagy, apoptosis, vitamin D, and vitamin D receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Medicine*: March 2018; 97(12):e0172.
- Zheng Y, Trivedi T, Lin RCY, Fong-Yee C, Nolte R, Manibo J, et al. Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers

strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Bone Research volume 5, Article number: 2017; 1:17023-38.

28. Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K., Wu MC, Hou CW, et al. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. Alcohol. 2010; 44(6):523-9.

29. Ufer C, Wang CC. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2011; 4:1-14.

30. Mirdar Sh, Asgharzadeh H, Gholamreza H. The Effect of Endurance Swimming Practice on Liver Apoptosis Index in Neonatal Rats. Journal of Research in Sport Medicine and Technology. Fourth Year (Twelfth consecutive). 2014; 8 (24): 12-25.